

Untersuchungen zum Einfluss der GPI- Verankerung auf das Faltungsverhalten des Prion Proteins

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
des Fachbereiches Chemie
der Technischen Universität Dortmund

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

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Miria Christin Schumacher

aus Soest

Dortmund, im Dezember 2010

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2006 bis Dezember 2010 am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund, in der Abteilung Physikalische Biochemie von Prof. Dr. R. S. Goody, unter der Leitung von Prof. Dr. M. Engelhard angefertigt.

Erstgutachter : Prof. Dr. M. Engelhard

Zweitgutachter : Prof. Dr. H. Mootz

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

(Miria Schumacher)

Dortmund, Dezember 2010

Meiner Familie

Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig:
Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas,
in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat,
wieder wegzuwerfen.

(Albert Einstein, 1879-1955)

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

Schumacher, M. C. *et al.* (2010) *Synthesis of a GPI anchor module suitable for protein post-translational modification*; Peptide Science (Biopolymers) , 94, 4, 457-464.

1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL	14
2.1.	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	14
2.2.	Instrumentation	15
2.3.	Stämme und Zelllinien	17
2.3.1.	<i>Escherichia coli</i> - Stämme	17
2.3.2.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme	17
2.3.3.	Zelllinien	17
2.4.	Plasmide	18
2.5.	Oligonukleotide	18
2.6.	Antikörper	19
2.7.	Puffer	20
3.	METHODEN	22
3.1.	Nährmedien und Anzuchtbedingungen für <i>E. coli</i>	22
3.1.1.	Nährmedien für <i>E. coli</i>	22
3.1.2.	Anzucht von <i>E. coli</i> -Kulturen	22
3.2.	Nährmedien und Anzuchtbedingungen für <i>S. cerevisiae</i>	23
3.2.1.	Nährmedien für <i>S. cerevisiae</i>	23
3.2.2.	Anzucht von <i>S. cerevisiae</i> - Kulturen	24
3.3.	Nährmedien und Anzuchtbedingungen für murine Neuroblastomazellen (N2a)	24
3.3.1.	Nährmedien für N2a-Zellen	24
3.3.2.	Anzuchtbedingungen für N2a-Zellen	25
3.4.	Molekularbiologische Methoden	26
3.4.1.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	26
3.4.2.	Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	26
3.4.3.	Amplifikation von DNA-Fragmenten	27
3.4.4.	Isolierung und Analyse von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese	28
3.4.5.	UV-photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	28

3.4.6.	Restriktion von DNA	28
3.4.7.	Ligation	29
3.4.8.	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i> durch Elektroporation	29
3.4.9.	Transformation von Plasmid-DNA in <i>S. cerevisiae</i> durch Elektroporation	29
3.4.10.	DNA-Sequenzierung	30
3.5.	Proteinchemische Methoden	31
3.5.1.	Proteinexpression und – aufreinigung in <i>E.coli</i>	31
3.5.1.1.	Tobacco etch virus Protease (TEV-Protease)	31
3.5.1.2.	RBD-Mxe-CBD	32
3.5.1.3.	PrP-90-230-Mxe-CBD	34
3.5.1.4.	PrP-Int ^N	36
3.5.2.	Proteinexpression und – aufreinigung in <i>S. cerevisiae</i>	37
3.5.2.1.	Kre-GFP-Gas1p	37
3.5.2.2.	Kre-PrP-Gas1p	39
3.5.2.3.	Kre-Int ^C -Gas1p	39
3.5.3.	Herstellung eines Proteingesamtextraktes aus Hefen	39
3.5.4.	Faltung von PrP-GPI und PrP-Int ^N	39
3.5.5.	Endoglykosidase H Verdau	39
3.5.6.	TEV-Protease-Verdau	40
3.5.7.	Phospholipase C Verdau	40
3.5.8.	Oligomerisierung und <i>in vitro</i> Aggregation von PrP-GPI	41
3.5.9.	Gelfiltration mittels Biosep-SEC 3000	41
3.5.10.	Thioflavin-T-Test	42
3.5.11.	Fibrillogenese	42
3.5.12.	Fluoreszenzmarkierung von PrP-GPI	43
3.5.13.	Immunofluoreszenzanalysen von Hefezellen	43
3.5.14.	Darstellung von rPrP-GPI mittels Protein <i>trans</i> -Spleißen	44
3.5.14.1.	<i>Trans</i> -Spleißreaktion von PrP-Int ^N an <i>S. cerevisiae</i> <i>in vivo</i>	44
3.5.14.2.	<i>Trans</i> -Spleißreaktion von PrP-Int ^N an Neuroblastomazellen <i>in vivo</i>	45
3.5.15.	SDS-PAGE	46
3.5.16.	Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen	47
3.5.17.	Western Blot	47
3.5.18.	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	48
3.6.	Chemische Methoden	50
3.6.1.	Covalent Capture Beads	50
3.6.2.	Festphasensynthese des Peptids H-CGK _(NBD) GH ₆ OH	52
3.6.3.	<i>Expressed Protein Ligation</i> der Peptide	53
3.6.4.	Massenspektrometrie	54

3.7.	Biophysikalische Methoden	55
3.7.1.	Dynamische Lichtstreuung	55
3.7.2.	CD-Spektroskopie	55
3.7.3.	Fluoreszenzspektrometrie	55
4.	ERGEBNISSE	56
4.1.	Festphasensynthese des Peptids H-CGK _(NBD) GH ₆ OH	56
4.2.	Herstellung der Cystein Covalent Capture Beads	57
4.3.	Isolation des GPI-Ankers aus Kre5p-GFP-Gas1p	60
4.3.1.	Aufbau des Expressionsvektors	60
4.3.2.	Expressionskinetik in <i>S. cerevisiae</i>	61
4.3.3.	Proteinaufreinigung	63
4.3.4.	Charakterisierung der GPI-Verankerung des GFP	66
4.3.5.	Proteolyse mit TEV-Protease	68
4.4.	Lokalisationsuntersuchung des GFP-GPI	73
4.5.	Isolation des GPI-Ankers aus Kre5p-PrP-Gas1p	76
4.5.1.	Aufbau des Expressionsvektors	76
4.5.2.	Expressionskinetik in <i>S. cerevisiae</i>	77
4.5.3.	Proteinaufreinigung	79
4.5.4.	Faltung des rekombinanten Prion-Proteins	81
4.5.5.	Analyse der Glykosylierung des PrP-GPI	83
4.5.6.	Proteolyse des PrP-GPI mit TEV-Protease	85
4.5.7.	Aufreinigung des GPI-verankerten Peptids mittels Cystein Covalent Capture Beads	86
4.5.8.	Charakterisierung des isolierten GPI-Peptides mittels MALDI-MS	90
4.5.9.	<i>Expressed Protein Ligation</i> des GPI-Peptids	92
4.6.	Lokalisationsuntersuchungen von PrP-GPI	97
4.6.1.	Immunofluoreszenzanalyse und PI-PLC Verdau des PrP-GPI	97
4.6.2.	Untersuchung der zellulären Aufnahme des Bodipy [®] -markiertem PrP-GPI	100
4.7.	Untersuchung des Aggregationsverhaltens von PrP-GPI	103
4.8.	Darstellung von rPrP-GPI mittels Protein <i>Trans</i> -Spleißen	112
4.8.1.	<i>Trans</i> -Spleißreaktion von PrP-Int ^N an <i>S. cerevisiae</i> <i>in vivo</i>	113
4.8.2.	<i>Trans</i> -Spleißreaktion von PrP-Int ^N an N2a-Zellen <i>in vivo</i>	116

5.	DISKUSSION	119
5.1.	Semisyntese von GPI-verankertem Prion-Protein	119
5.1.1.	Isolation des GPI-Ankers	119
5.1.2.	<i>Expressed Protein Ligation</i>	122
5.1.3.	Protein <i>Trans</i> -Spleißreaktion des PrP-Int ^N <i>in vivo</i>	124
5.2.	Charakterisierung von PrP-GPI	127
5.2.1.	GPI-Verankerung und Protein-Internalisierung	127
5.2.2.	Untersuchung des Aggregationsverhaltens des PrP-GPI	133
6.	ZUSAMMENFASSUNG	136
7.	LITERATURVERZEICHNIS	138
8.	ANHANG	148

A

Abb.	Abbildung
ad	addiere
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AS	Aminosäure
Äq	Äquivalente

B

BCA	Bicinchoninsäure
BME	2-Mercaptoethanol
Boc	<i>tert</i> -Butylcarbammat
BSA	Kälberserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie
bp	Basenpaar

C

CCB	Kovalent bindende Partikel (<i>covalent capture beads</i>)
CD	Circulardichroismus
CDI	1,1-Carbonyl-diimidazol
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung (<i>Creutzfeldt Jacob Disease</i>)
COPII	Hüllenprotein II (<i>Coat protein II</i>)
cps	Photonen pro Sekunde (<i>counts per second</i>)

D

DCM	Dichlormethan
DHPE	1, 2-Dihexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylethanolamin
DIC	Differential-Interferenzkontrast (<i>differential interference contrast</i>)
DIPEA	Diisopropylethylamin
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMEM	Dulbecco modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxy ribonucleic acid</i>)
DOPC	1, 2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DRM	Detergenz-resistente Membran

DTT Dithiothreitol

E

E. coli *Escherichia coli*

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure

EPL Expressed Protein Ligation

ER Endoplasmatisches Retikulum

EYFP Gelbfluoreszierendes Protein (*enhanced yellow fluorescent protein*)

ϵ Extinktionskoeffizient

F

Fmoc 9-Fluorenylmethoxycarbonyl

FCS Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

FCS Fötales Kälberserum (*fetal calf serum*)

G

GdnHCl Guanidiniumhydrochlorid

GFP Grünfluoreszierendes Protein (*green fluorescent protein*)

GFC Gelfiltrationsäule (*gel filtration column*)

GPI Glycosylphosphatidylinositol

GSH Glutathion

GSS Gerstmann-Sträussler-Scheinker

GSSG Glutathion-Dimer

GST Glutathion-S-Transferase

H

h Stunde (*hour*)

HAc Essigsäure

HBTU 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat

HFIP Hexafluoroisopropanol

hmPrP Chimäres Prion Protein (Hamster und Maus)

HOBt Hydroxybenzotriazol

HPLC Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
(*high pressure liquid chromatographie*)

HRP Meerrettich peroxidase (*horse reddish peroxidase*)

I

IF	Immunofluoreszenz
IPL	Intein-vermittelte Protein-Ligation (<i>intein-mediated protein ligation</i>)
IPTG	Isopropylthiogalactosid
ivDde	1-(4,4-Dimethyl-2,6-dioxocyclohexylidene)-3-methylbutyl

K

kDa	Kilodalton
-----	------------

L

LMW	Marker für SDS-PAGE (<i>low molecular weight</i>)
-----	---

M

MEM	Modifiziertes Eagle Medium (<i>modified eagle's medium</i>)
MESNA	2-Mercaptoethansulfonat-Natrium
MM	Minimalmedium
MWCO	Molekulargewicht-Ausschlussgrenze (<i>molecular weight cut off</i>)

N

NaOAc	Natriumacetat
NBD-Cl	4-Chlor-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol
NC	Nitrocellulose
NCL	Native chemische Ligation
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NMR	Nuklear Magnet Resonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)

O

OD	optische Dichte
ORD	optische Rotationsdispersion

P

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phosphoethanolamin
PEG	Polyethylenglykol
PEGA	Polyethylenglykol-Polyacrylamid-Copolymer

PI	Phosphatidylinositol
PI-PLC	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C
PK	Proteinase K
PNK	Polynukleotidkinase
POM	PrP-spezifischer monoklonaler Antikörper
PrP	Prion Protein
PSM	Marker für Western Transfer (<i>prestained marker</i>)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	
RP	Umkehrphase (<i>reversed phase</i>)
rpm	Runden pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
S	
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SPPS	Festphasenpeptidsynthese (<i>solid phase peptide synthesis</i>)
SRP	Signalerkennungspartikel (<i>signal recognition particle</i>)
T	
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N',N' Tetramethylethylendiamin
TEV	Tobacco Etch Virus
TIS	Triisopropylsilan
TFA	Trifluoressigsäure
ThT	Thioflavin T
T _m	Schmelztemperatur (<i>melting temperature</i>)
TRIS	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin-5-isothiocyanat
Trt	Trityl
TSE	Übertragbare spongiforme Enzephalopathie (<i>transmissible spongiform encephalopathy</i>)

U

ü.N. über Nacht

V

VÄ Volumen-Äquivalent

(v/v) Volumenprozent

W

WB Western Blot

(w/v) Gewichtsprozent

Für die 20 natürlichen Aminosäuren wurde der Dreibuchstaben- oder Einbuchstabencode nach IUPAC-IUB-Vereinbarung (1969) verwendet.

1. Einleitung

Neurodegenerative Erkrankungen gewinnen, aufgrund der steigenden Lebenserwartung in unserer heutigen Gesellschaft, immer mehr an Bedeutung. Neben Morbus Alzheimer, welches mit 50 - 60 % den größten Anteil an den neurodegenerativen Erkrankungen einnimmt, zählen dazu unter anderem auch Morbus Parkinson, Chorea Huntington, Multiple Sklerose und die Prion-Erkrankungen. Sie alle sind durch die Ablagerung filamentöser Proteine charakterisiert, wobei diese intra- oder extrazellulär auftreten. Obwohl die genannten Krankheiten morphologische Gemeinsamkeiten zeigen, sind die beteiligten Proteine nicht miteinander verwandt.

Die Prion-Erkrankungen grenzen sich durch ein weiteres Merkmal von den anderen neurodegenerativen Erkrankungen ab. Sie sind übertragbar und werden aufgrund ihrer Transmissibilität, sowie ihrer Neuropathologie auch als transmissible spongiforme Enzephalopathie (TSE) bezeichnet. Inzwischen konnte auch für Morbus Alzheimer eine Transmissibilität nachgewiesen werden. So zeigen Studien von Eisele *et al.*, dass die interperitoneale Injektion von A β -Extrakten zur Ausbildung einer β -Amyloidose im Gehirn führt¹.

Die bekanntesten TSE sind die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) beim Rind, Scrapie beim Schaf, sowie verschiedene Formen der Creutzfeld-Jakob-Krankheit (CJD) beim Menschen (vgl. Tabelle 1). Von diesen Krankheiten ist Scrapie seit über 200 Jahren unter verschiedenen Namen beschrieben worden und seine Übertragbarkeit ist seit ca. 100 Jahren dokumentiert². Allerdings wurde dies nicht mit der Infektiosität humaner neurodegenerativer Erkrankungen in Verbindung gebracht. Erst durch die Entdeckung der Kuru-Krankheit im Jahr 1957 bei einem kannibalischen Volksstamm in Neu Guinea konnte Gajdusek zeigen, dass es zu einer Übertragung der Krankheit kommen kann³. Dazu hatte er Schimpansen Gehirnmateriale von verschiedenen infizierten Kuru-Patienten intrazerebral verabreicht, welche nach einer längeren Inkubationszeit alle typischen Symptome einer Kuru-Erkrankung aufwiesen.

Die Krankheit beginnt, sowohl beim Menschen als auch bei Tieren, nach einer durchschnittlichen Inkubationszeit von Jahren oder Jahrzehnten, meist schleichend und endet immer tödlich. Betroffene zeigen Änderungen in ihrem Verhalten und ihren Bewegungen. So treten bei infizierten Rindern neben Muskelzuckungen und

Gleichgewichtsstörungen zusätzlich Licht- und Lärmempfindlichkeiten auf. Auch bei Menschen sind derartige Symptome zu beobachten. Die Patienten verlieren schnell ihre geistigen und motorischen Fähigkeiten. Motorisch zeigen sich Myoklonien und Ataxien. Die Störung der geistigen Fähigkeiten reicht von Gedächtnisstörungen über Halluzinationen und Verwirrtheit bis hin zur Demenz. Zusätzlich kommt es zu Persönlichkeitsveränderungen, welche sich unter anderem in einer gesteigerten Aggressivität äußern können.

Tabelle 1: Wichtige Prion-Erkrankungen in Menschen und Tieren.

Krankheit	Manifestation	Wirt
Creutzfeld-Jakob-Krankheit (CJD)	sporadisch, genetisch, infektiös	Mensch
Neue Variante der Creutzfeld-Jakob-Krankheit (vCJD)	infektiös	Mensch
Gerstmann-Sträussler- Scheinker-Syndrom (GSS)	genetisch, sporadisch	Mensch
Kuru	infektiös	Mensch
Fatale Familiäre Insomnie (FFS)	genetisch	Mensch
Scrapie (Traberkrankheit)	sporadisch, infektiös	Schaf, Ziege
Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE)	infektiös	Rind
Chronic Wasting Disease (CWD)	infektiös	Hirscharten
Feline Spongiforme Enzephalopathie (FSE)	infektiös	Katze
Transmissible Mink Enzephalopathie (TME)	infektiös	Nerz

Die Gehirne Erkrankter zeigen nach ihrem Tod auf den ersten Blick, bis auf eine leichte Abnahme der Gehirnmasse, keine starken Anomalien. Betrachtet man das Hirngewebe jedoch mikroskopisch, so erkennt man die typischen Anzeichen einer TSE-Erkrankung. Zum einen kommt es zu einer Vakuolisierung der Neuropil in der grauen Substanz, welche dem Gehirn ein schwammartiges (spongiformes) Aussehen und somit der Krankheit ihren Namen gibt.

Obwohl die Vakuolen im Gehirn deutlich zu erkennen sind, ist ihr Einfluss auf den Krankheitsverlauf noch nicht eindeutig geklärt. Sicher ist, dass der Verlust der Neuronen durch Apoptose, ein weiteres Kennzeichen der TSE, zu den verschiedenen Fehlfunktionen des Gehirns führt⁴. Zusätzlich treten Entzündungsreaktionen auf, welche durch die übermäßige Aktivierung der Hirnzellen (Astrozyten und Microglia) zustande kommen⁵.

Bei allen Betroffenen sind anormale Ablagerung von Prion Proteinen unterschiedlicher Ausprägung im Gehirn zu finden. Es handelt sich hierbei um Proteinaggregate welche, ähnlich wie bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen, in Form von amyloiden Plaques nachzuweisen sind⁶⁻⁹. Sie gelten als Auslöser für die neuronale Apoptose, die Entzündungsreaktion (Astrogliosis) und die schwammartige Zersetzung des Gehirns (Abbildung 1). Eine besondere Eigenschaft der TSE-Neuropathologie ist die starke Variation in der Verteilung und dem Ausmaß der Anomalien^{6,9}.

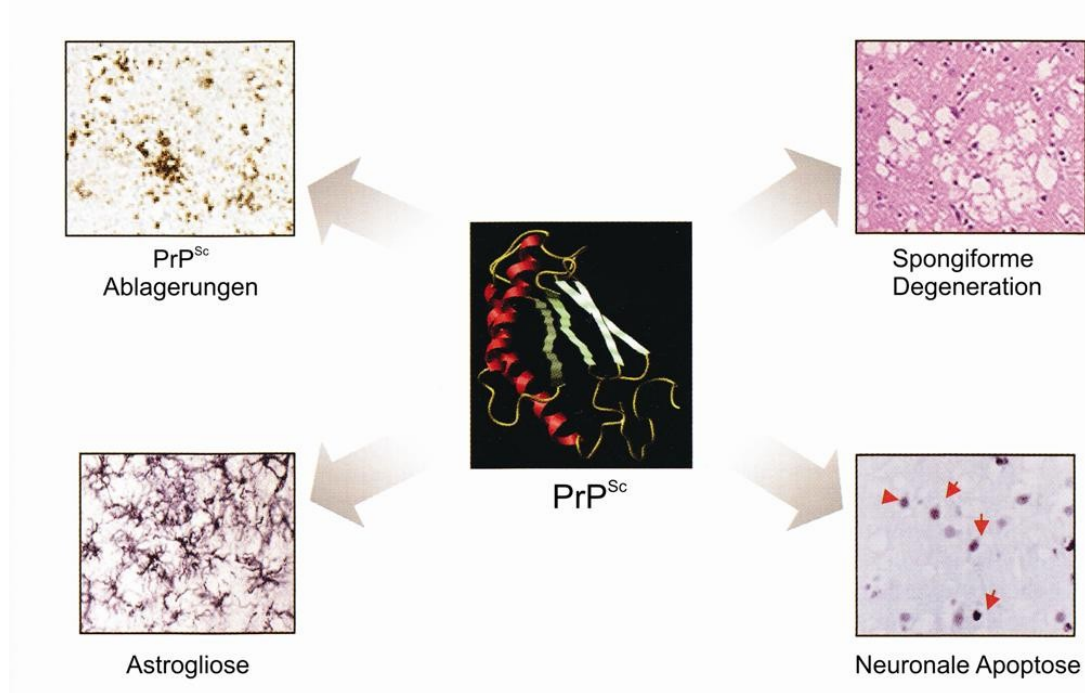


Abbildung 1: Neuropathologische Eigenschaften der TSE. Der zentrale Prozess in der Entstehung der Prion-Erkrankung ist die Umfaltung von PrP^{C} in die pathogene Isoform PrP^{Sc} , welches manchmal in Form von amyloiden Ablagerungen im Gehirn zu finden ist. Dieser Prozess ist für die anschließende neuronale Apoptose, spongiforme Degeneration des Gehirns, sowie die Astrogliose verantwortlich. Der genaue Mechanismus ist bis jetzt noch nicht bekannt (Abbildung entnommen aus Soto¹⁰).

Anfangs wurde angenommen, dass es sich bei dem Erreger um einen „langsamen Virus“ handelt, da zwischen Infektion und Ausbrechen der Erkrankung eine lange Inkubationszeit lag¹¹. Allerdings konnten weitere Studien zeigen, dass ein solcher Erreger sich in seinen Eigenschaften stark von einem Virus oder anderen möglichen Auslösern wie kleiner DNA, Viren, Membranfragmenten oder Polysacchariden unterschied.

Alper und seine Mitarbeiter widerlegten im Jahr 1966 die Theorie des langsamen Virus, indem sie das minimale Molekulargewicht des infektiösen Scrapie-Auslösers bestimmten, welches mit einer Größe von $\sim 2 \times 10^5$ Da zu klein für einen Virus war¹². Nur ein Jahr später zeigten ihre Untersuchungen, dass der Erreger eine hohe Resistenz gegenüber ultravioletter und ionisierender Strahlung besitzt, welche normalerweise zur Inaktivierung von Nukleinsäuren führt¹³.

Diese Beobachtungen und weitere Forschungen legten den Schluss nahe, dass es sich bei dem Erreger um ein oder mehrere Proteine handeln musste. Somit wurde die „Protein-Only“-Hypothese im Jahr 1967 von J. S. Griffith, unter Berücksichtigung der Untersuchungen von Alper *et al.*, aufgestellt¹⁴. Diese Hypothese besagte, dass es sich um ein Protein handelt, welches in der Lage ist sich selbst im Körper zu replizieren. Diese Theorie wird seit 1980 von Stanley Prusiner durch zahlreiche, wichtige Untersuchungen unterstützt. Er war es auch, der dem Prion (**proteinaceous infectious particle**) Protein seinen Namen gab.

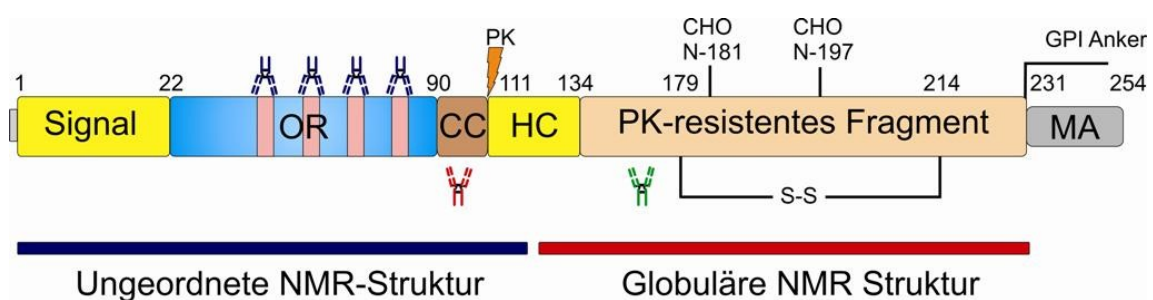


Abbildung 2: Überblick über die Primärstruktur des zellulären Prion Proteins und der post-translationalen Modifikationen. Einer ER-Signalsequenz am N-Terminus folgt eine Sequenz bestehend aus fünf Oktapeptid-Wiederholungen. CC steht für eine geladene Sequenz und HC definiert den hydrophoben Kern. Die Proteinase K Schnittstelle in PrP^{Sc} wird durch den Pfeil angezeigt, welche nach Proteolyse zu dem PK-resistenten Fragment führt. MA steht für die GPI-Anker-Region. Die Epitope, welche durch die POM Antikörper erkannt werden sind ebenfalls dargestellt (POM2:blau, POM3:rot, POM5:grün). Die Zahlen entsprechen den Aminosäuren des Maus-PrP^C (geändert nach Aguzzi und Heikenwalder¹⁵).

Aufgrund einer fehlenden Immunantwort während der Erkrankung wurde angenommen, dass es sich um ein wirtseigenes Protein handeln muss, welches später von McKinley *et al.* als fehlgefaltete Variante des membranständigen Proteins PrP^C identifiziert werden konnte. PrP^C ist das Produkt eines einzelnen Gens, *Prnp*, welches für das 253 Aminosäuren umfassende Präprotein (in einigen Spezies 252 Aminosäuren) codiert. Es besitzt neben dem Signal für die Sekretion, fünf Octapeptid-Wiederholungen nahe dem N-Terminus, zwei Glykosylierungsstellen und eine Disulfidbrücke (Abbildung 2)^{15,16}.

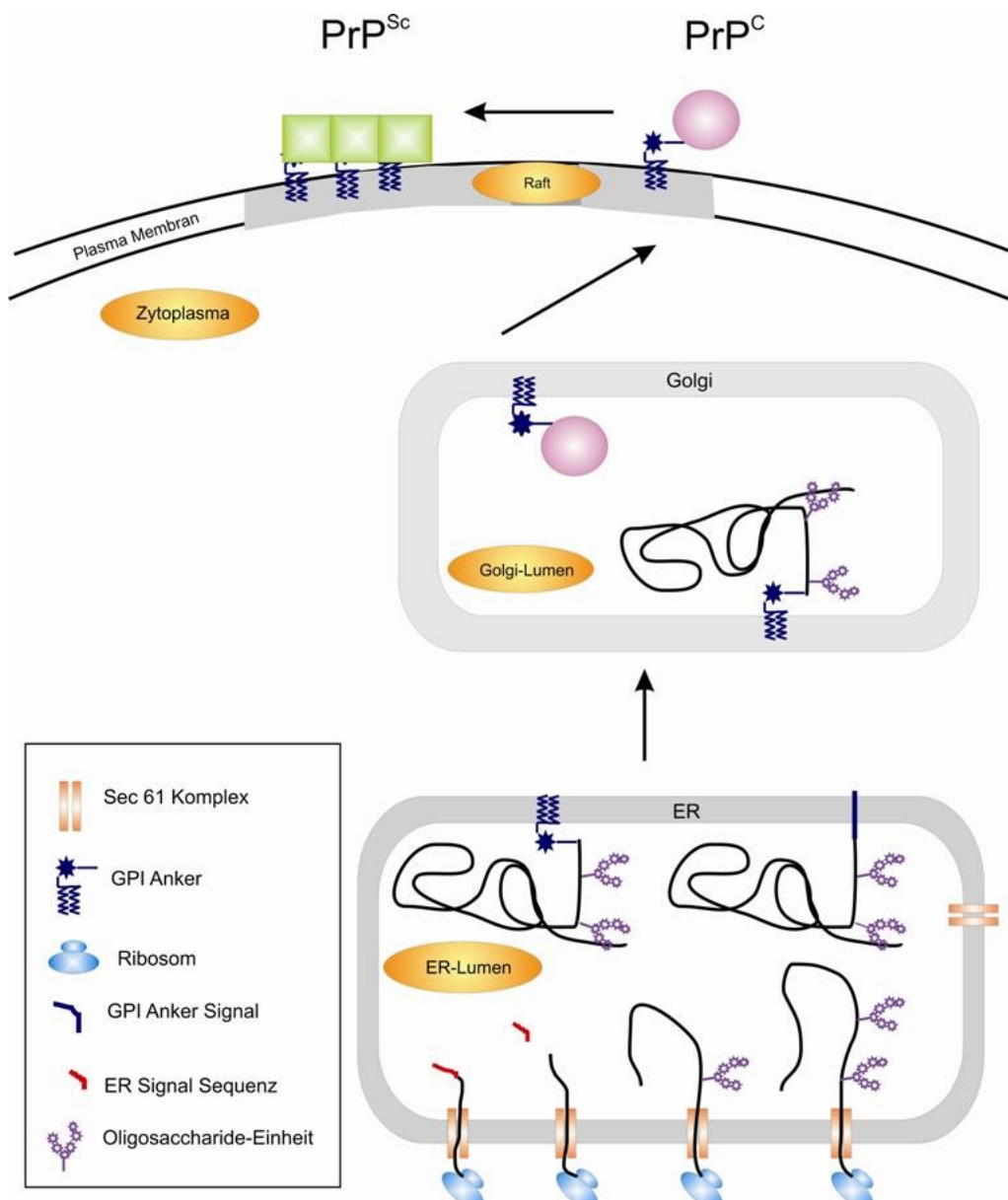


Abbildung 3: Biosynthese des zellulären Prion Proteins.

Die Synthese des PrP^C beginnt an freien Ribosomen im Zytosol (Abbildung 3). Diese binden die mRNA und starten die Translation. Die translatierte hydrophobe N-terminale Signalsequenz (ER-Signalsequenz) führt dazu, dass das Prion Protein cotranslational über den Sec61-Komplex ins ER importiert wird¹⁷⁻¹⁹. Das gesamte Protein wird ins ER-Lumen abgegeben, wobei die 22 AS lange Signalsequenz abgespalten wird²⁰⁻²². Im ER erfolgt nun die weitere Modifikation des Prion Proteins, welches an den Aminosäuren Asn180 und Asn196 glykosyliert wird. Es kann somit, abhängig von Spezies und Stamm, in drei verschiedenen Glykoformen (mono-, di- oder unglykosyliert) vorkommen^{23,24}. Die hydrophobe 23 AS lange C-terminale Signalsequenz fungiert als Erkennungssequenz für den GPI-Anker, welcher auf Serin231 übertragen wird. Anschließend wird das Protein vom ER über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportiert, wo das Protein mittels GPI-Anker an die äußere Zellmembran verankert wird. Hier kann es internalisiert werden, wobei die N-terminale Domäne des Proteins beteiligt ist²⁵⁻²⁷. Das internalisierte PrP^C wird letztendlich von den Lysosomen vollständig abgebaut.

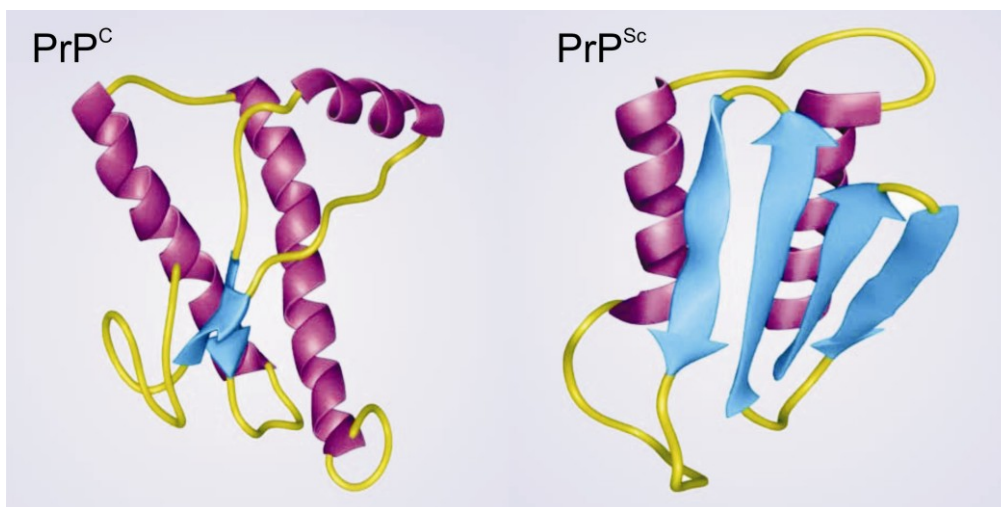


Abbildung 4: Struktur von PrP^C und PrP^{Sc}. Das PrP^C besitzt eine strukturierte C terminale Domäne bestehend aus drei α -Helices und zwei kleineren β -Faltblattstrukturen. Bei der Umfaltung in PrP^{Sc} kommt es zur Ausbildung antiparalleler β Faltblätter. Der N-Terminus ist bei den Isoformen flexibel und unstrukturiert (nicht dargestellt). (Abbildung entnommen von Prusiner²⁸).

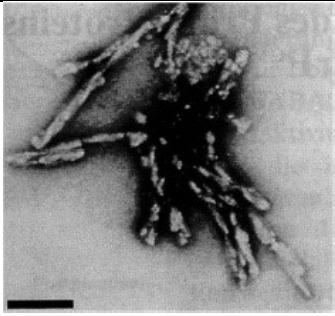
Verschiedene Studien konnten zeigen, dass das PrP in zwei alternativen Konformationen vorkommen kann, dem normalen zellulären Protein PrP^C und der pathologischen Isoform PrP^{Sc} ²⁹⁻³¹. PrP^C besteht aus zwei strukturellen Domänen. Einem flexiblen ungeordneten N-terminalen Fragment, welcher bis zur Aminosäure 128 reicht (vgl.

Abbildung 2) und einer globulären C-terminalen Domäne, bestehend aus drei α -Helices und zwei kleineren β -Faltblattstrukturen (Abbildung 4).

Die dreidimensionale Struktur für verschiedene Spezies wurde mittels NMR bestimmt, und zeigte, dass die Struktur trotz einiger Unterschiede in der Primärsequenz der verschiedenen Spezies stark konserviert ist. Bei der Umfaltung des PrP^C zu PrP^{Sc} kommt es zu einer radikalen Änderung der Sekundär- und Tertiärstruktur, wobei der α -helikale Anteil des zellulären PrP abnimmt und sich gleichzeitig der β -Faltblattanteil erhöht³². So zeigten CD-Messungen, dass PrP^C einen α -helikalen Anteil von 43 % besitzt, welcher während der Umfaltung in PrP^{Sc} auf 20 % reduziert wird und der β -Faltblattanteil auf 34 % ansteigt³³.

Auffallender Weise besitzt PrP^{Sc} neben der identischen Primärstruktur auch die gleichen posttranslationalen Modifikation wie das PrP^C. Jedoch unterscheiden sie sich vollständig in ihren biochemischen und physikochemischen Eigenschaften, wie Proteinase K (PK)-Resistenz, Löslichkeit, Denaturierungsresistenz und Aggregatbildung (Tabelle 2)³⁴.

Tabelle 2: Vergleich der Eigenschaften von PrP^C und PrP^{Sc} (modifiziert nach Cohen und Prusiner³³).

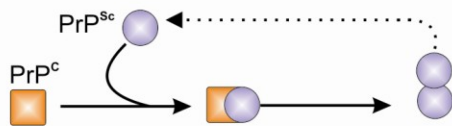
PrP^C	PrP^{Sc}	Aggregiertes Prion Protein
α -helikal	β -Faltblatt	
löslich	unlöslich	
PK sensitiv	PK resistent	
Monomer	Aggregation	
nicht infektiös	infektiös	

Die Umfaltung des endogenen PrP^C in PrP^{Sc} stellt den entscheidenden Schritt der „Protein-Only“-Hypothese dar. Aus verschiedenen Studien haben sich drei Modelle für die PrP^C-PrP^{Sc}-Umwandlung entwickelt (Abbildung 5).

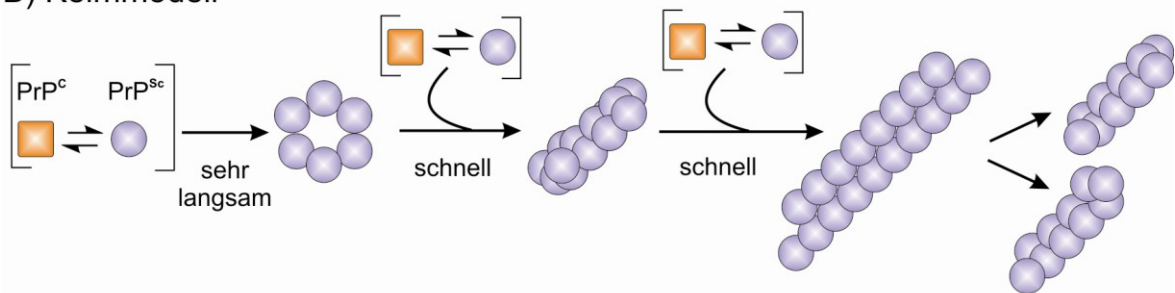
Beim Umfaltungsmodell (Abbildung 5A) geht man davon aus, dass die Konformationsänderung kinetisch kontrolliert ist. Eine hohe Aktivierungsenergie sorgt dafür, dass es in der Regel zu keiner spontanen Bildung von PrP^{Sc} kommt. Die Induktion der Umfaltung findet also erst nach der Interaktion von PrP^C mit exogen eingeführtem PrP^{Sc} statt³⁵. Bei der direkten Umfaltung von PrP^C in PrP^{Sc}, entweder spontan (sCJD)

oder durch Mutationen im *Prnp*-Gen (GSS), handelt es sich um sehr seltene Ereignisse, welche in der Lage sind, die Aktivierungsenergie herabzusetzen und so die direkte Umfaltung des PrP^C zu begünstigen.

A) Umfaltungsmodell



B) Keimmodell



C) Unterstütztes Keimmodell

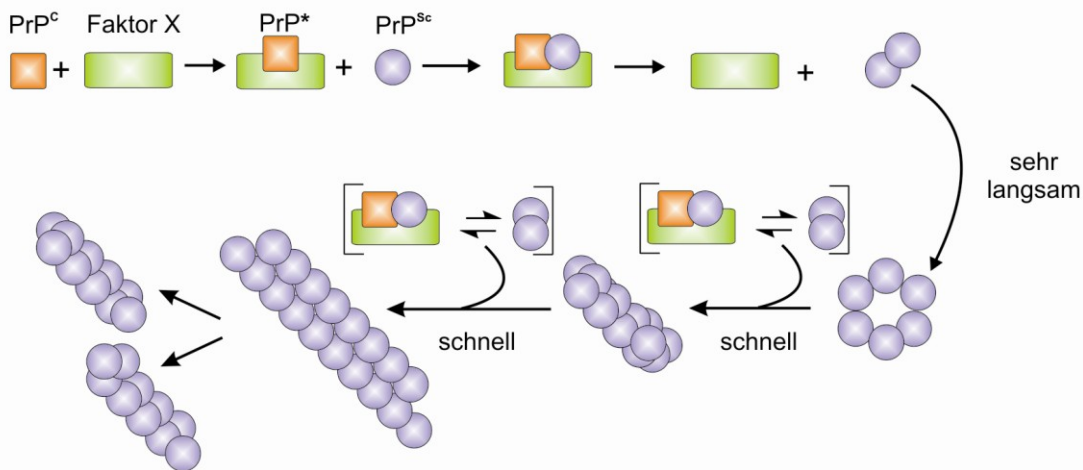


Abbildung 5: Modelle für die Umwandlung von PrP^C zu PrP^{Sc}. (A) Beim Umfaltungsmodell dient das PrP^{Sc} als Templat für die Umfaltung. (B) Beim Keimmodell steht PrP^C im Gleichgewicht mit dem instabilen PrP^{Sc}-Monomer, welches erst durch die Oligomerisierung stabilisiert wird und mit dem fehlgefalteten PrP^C interagiert. (C) Beim unterstützten Keimmodell wird das PrP^C zunächst von einem Faktor X gebunden, wodurch es zu einer Konformationsänderung kommt. Diese bewirkt, dass die hydrophobe Domäne des PrP^C für die Reaktion mit PrP^{Sc} frei zugänglich wird (modifiziert nach Weissmann et al.³⁵ und Soto^{10,36}).

Bei dem Modell der Keimbildung (Abbildung 5B) geht man davon aus, dass sich PrP^C und PrP^{Sc} im thermodynamischen Gleichgewicht befinden. Das PrP^{Sc} Monomer ist instabil und wird erst durch die Reaktion mit anderen PrP^{Sc} Molekülen in Form von kristallähnlichen Keimen oder Aggregaten stabilisiert^{37,38}. Diese Aggregate begünstigen die Umwandlung des PrP^C durch die Bindung an das monomere PrP^{Sc}. Das Gleichgewicht wird dabei in Richtung des pathogenen Konformers verschoben. In diesem Modell ist nicht das monomere PrP^{Sc} das infektiöse Partikel, sondern die multimeren, hochgeordneten Aggregate (Aggregationskeime oder Nuklei) des PrP^{Sc}. Diese werden in einem langsamen Prozess gebildet und dienen zur weiteren Stabilisierung des PrP^{Sc}.

Beim Modell der unterstützten Keimbildung (Abbildung 5C) nimmt man an, dass es zur Bildung eines Intermediats (PrP*) kommt, welches aus einem Cofaktor X (z. B. Chaperone) und einem fehlgefalteten PrP^C besteht. Durch die Bindung an den Cofaktor wird die hydrophobe Domäne für die Interaktion mit PrP^{Sc} (monomer oder oligomer) exponiert. Auf diese Weise wird die Bindung und Inkorporation des PrP^{Sc} erleichtert und es kommt zur Umwandlung³⁶. Ebenso wie beim Keimmodell wächst das PrP^{Sc}-Polymer stetig, bis es eine kritische Länge erreicht und in kleinere Fragmente zerbricht. Dies erfolgt entweder durch mechanische Kräfte oder wird durch einen noch unbekanntem Prozess katalysiert.

Die „Protein-Only“-Theorie wird durch neueste Untersuchungsergebnisse weiter gestützt. So haben Wang *et al.*³⁹, sowie Makarava *et al.*⁴⁰ rekombinant hergestelltes Prion Protein (recPrP) in die β -faltblattreiche amyloide Isoform überführt und in Hamster oder Mäuse inokuliert. Alle Tiere zeigten die Entstehung einer Prion Erkrankung, welche jedoch erst bei der zweiten Passage des Proteins und nach längeren Inkubationszeiten auftrat^{40,41}. Zwar konnte anhand dieser Untersuchungen gezeigt werden, dass die fehlgefaltete Form des Prion Proteins an der Krankheitsentstehung beteiligt ist, allerdings ist der genaue Mechanismus dadurch nicht geklärt.

Anhand von Computersimulationen und Analysen von Peptidfragmenten konnte schon früh gezeigt werden, dass besonders die C-terminale Domäne an der Umfaltung des zellulären Prion Proteins in das pathologische PrP^{Sc} beteiligt ist^{34,42-44}. Nisbet *et al.* zeigten, dass die Inkorporation der C-terminalen Domäne des Prion Proteins aus Kaninchen in das Maus Prion Protein (MoPrP-RbGPI) die Ausbildung einer TSE verhindern konnte⁴⁵. Hierbei waren beide Proteine, sowohl das Rb-PrP als auch das MoPrP-RbGPI, GPI-verankert und in Lipid Rafts lokalisiert. Viele Studien postulieren, dass die Lokalisation der Proteine in Lipid Rafts eine entscheidende Rolle im

Umfaltungsprozess von PrP^C zu PrP^{Sc} spielt^{46,47}. So gibt es Hinweise darauf, dass die Entfernung von Cholesterin oder Sphingolipiden zu einer Neuverteilung des PrP^C innerhalb der Membran führt, wodurch es zu einer verringerten PrP^{Sc}-Bildung in den infizierten Zellen kommt⁴⁸⁻⁵⁰.

Bei der Lokalisation der Prion Proteine in Lipid Rafts spielt die GPI-Verankerung eine bedeutende Rolle und stellt nach Baron *et al.* einen entscheidenden Schritt in der Pathologie des Prion Proteins dar⁵¹. Er postulierte, dass nur das Lipid Raft assoziierte PrP^C durch PrP^{Sc} umgefaltet werden kann und die infektiöse Spezies durch Membranaustausch zwischen den Zellen weitergegeben wird. Ähnliche Beobachtungen wurden von anderen Arbeitsgruppen gemacht. So kam es nach Deletion des GPI-Ankers des PrP^C (PrP Δ GPI) weiterhin zur Propagation und Deposition des PrP^{Sc}, jedoch waren weder Neurotoxizität noch die Ausbildung der klassischen Symptome einer TSE zu erkennen⁵²⁻⁵⁴.

Aguzzi stellte die Theorie auf, dass es durch die Assoziation in den Lipid Rafts zum Clustering und/oder einer Konformationsänderung des zellulären Prion Proteins kommt. Durch diese Konformationsänderung kann Apoptose induziert oder die zelluläre Toxizität, durch die Aufnahme des Proteins in Lysosomen, vermittelt werden. Hierbei wurde vermutet, dass die späten Endosomen oder Lysosomen aufgrund ihres niedrigen pH-Wertes die Ent- und Rückfaltung des Proteins vereinfachen, wodurch diese anschließend den Zelltod induzieren können⁵⁵⁻⁵⁷. Um dies zu gewährleisten, muss das Prion Protein nach Bindung an die Zelloberfläche wieder in die Zelle internalisiert werden, wobei der genaue Mechanismus noch umstritten ist. Die Internalisierung erfolgt entweder über den Clathrin-, Caveolae oder Raft-abhängigen Signalweg^{27,58-61}. Paquet *et al.* konnten zeigen, dass PrP^{Sc} trotz der Abwesenheit von PrP^C in die Zellen internalisiert wird, jedoch eine Replikation des Proteins auch bei anschließender Expression des PrP^C in den Zellen nicht erfolgte. Dies legte den Schluss nahe, dass die PrP^C-PrP^{Sc}-Interaktion entweder sehr früh in einem Zellkompartiment oder an der Zelloberfläche erfolgen muss⁶². Das Prion Protein muss somit, neben der Bindung an die Zellmembran mittels GPI-Anker, auch in der Lage sein in die Zelle zu internalisieren, um eine TSE auszulösen. Für die Internalisierung des Proteins ist der unstrukturierte N-Terminus des Proteins verantwortlich²⁶. Hierbei konnte von Frankenfield *et al.* zusätzlich gezeigt werden, dass der N-Terminus einen Einfluss auf die Aggregationseigenschaften des Prion Proteins hat⁶³. Er vermittelt unter anderem die Oligomerisierung des Prion Proteins und interagiert bei Alzheimer mit A β -Oligomeren⁶⁴.

Alle diese Studien weisen darauf hin, dass der Mechanismus, welcher zur Entstehung der Prion-Erkrankung führt, sehr komplex ist und es viele Faktoren zu berücksichtigen gibt. Zum einen spielen die posttranslationalen Modifikationen wie die GPI-Verankerung und die Seitenkettenglykosylierungen eine Rolle. Zum anderen ist auch der N-Terminus an der Entstehung von Oligomeren und Aggregaten beteiligt. Daher ist es wichtig das Prion Protein, bezüglich seiner Aggregationseigenschaften, Toxizität und Infektiosität, in seiner Gesamtheit zu untersuchen.

Aufgrund der geringen Ausbeute an homogenem, posttranslational modifiziertem PrP^C bei Verwendung eukaryontischer Expressionssysteme, wurden die meisten Untersuchungen zur Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} mit rekombinanten Prion Proteinen ohne posttranslationale Modifikationen und verkürzten N-Termini durchgeführt⁶⁵⁻⁶⁸. Dadurch sind Rückschlüsse auf die *in vivo* Konversion nur bedingt bis gar nicht möglich. Mehrere Arbeitsgruppen haben bis jetzt versucht, rekombinant hergestelltes Prion Protein chemisch zu modifizieren, um den Einfluss der Membranverankerung, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, genauer untersuchen zu können.

Hierzu kann man sich verschiedene semisynthetische Methoden zu Nutze machen, um membranassoziierte Proteine herzustellen. Als besonders leistungsfähige Methode hat sich dabei die native chemische Ligation (NCL) herausgestellt⁶⁹. Hierbei werden zwei größere Peptide unter Ausbildung einer nativen Peptidbindung miteinander verknüpft. Weitere Methoden zur Modifikation rekombinant hergestellter Proteine stellen die *Expressed Protein Ligation* (EPL) und das Protein *Trans-Spleißen* dar⁷⁰⁻⁷⁴.

Olschewski und Becker modifizierten hierzu das Prion mit zwei Palmitoyl-Resten, welches in der Lage war, an die Membran artifizierender SUVs zu binden⁷⁵. Auch andere Arbeitsgruppen verfolgten diesen Ansatz. Breydo *et al.* verwendeten anstelle der Palmitoyl-Reste eine N-Myristoylamidomaleimidyl-Gruppe, um das Prion Protein an Membranen zu binden⁷⁶. Im Gegensatz zu den Experimenten von Eberl *et al.*, welche ihre Untersuchungen mit einem GPI-Analogen bestehend aus Gly5-Cys-DHPE durchführten, zeigten diese Varianten jedoch Unterschiede im Fibrillierungsverhalten gegenüber unlipidiertem Protein. So wurde sowohl der Gehalt an Fibrillen reduziert, als auch die Zusammenlagerung der Oligomere zu komplexen Fibrillen durch Störung der lateralen Assoziation verhindert^{76,77}. Paulick *et al.* hingegen waren nicht nur an der Verankerung des Proteins an die Zellmembran mittels Fettsäuren interessiert, sondern wollten zusätzlich den Einfluss der Zuckereinheiten auf die Bindung untersuchen. Dazu modifizierten sie einen PEG-Linker mit ein oder zwei Mannoseresten⁷⁸. Sie konnten mit

diesem Experiment zeigen, dass die Mobilität des GPI-Ankers in der Membran durch die Monosaccharide stark beeinflusst wurde. So nahm die laterale Diffusion durch die Lipiddoppelschicht mit zunehmender Anzahl an Mannosen deutlich zu. Dagegen ermöglichte das Fehlen des starren Zuckergerüsts eine stärkere Interaktion des gebundenen Proteins mit der Lipiddoppelschicht, wodurch es zu einer Verlangsamung der lateralen Diffusion kam. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass ein Protein, welches an einen nativen GPI-Anker, mit einem Zuckergerüst bestehend aus vier Mannosen und einem rigiden *myo*-Inositol, gebunden ist, sich noch schneller durch die Lipiddoppelschicht bewegen kann.

Da die Pathologie des Prion Proteins maßgeblich von seiner Verankerung an die Membran, sowie seines N-Terminus beeinflusst wird, muss eine Möglichkeit gefunden werden, um rekombinant hergestelltes Prion Protein (23-231) mit einem nativen GPI-Anker zu modifizieren. Hierzu kann die Hefe als eukaryontisches Modellsystem genutzt werden. Sie liefert im Vergleich zu anderen eukaryontischen Systemen hohe Proteinausbeuten und ermöglicht zusätzlich die posttranslationale Modifikation der Proteine. Die Grundstruktur des GPI-Ankers, wie er in *S. cerevisiae* zu finden ist, ist in Abbildung 6 zu sehen^{79,80}.

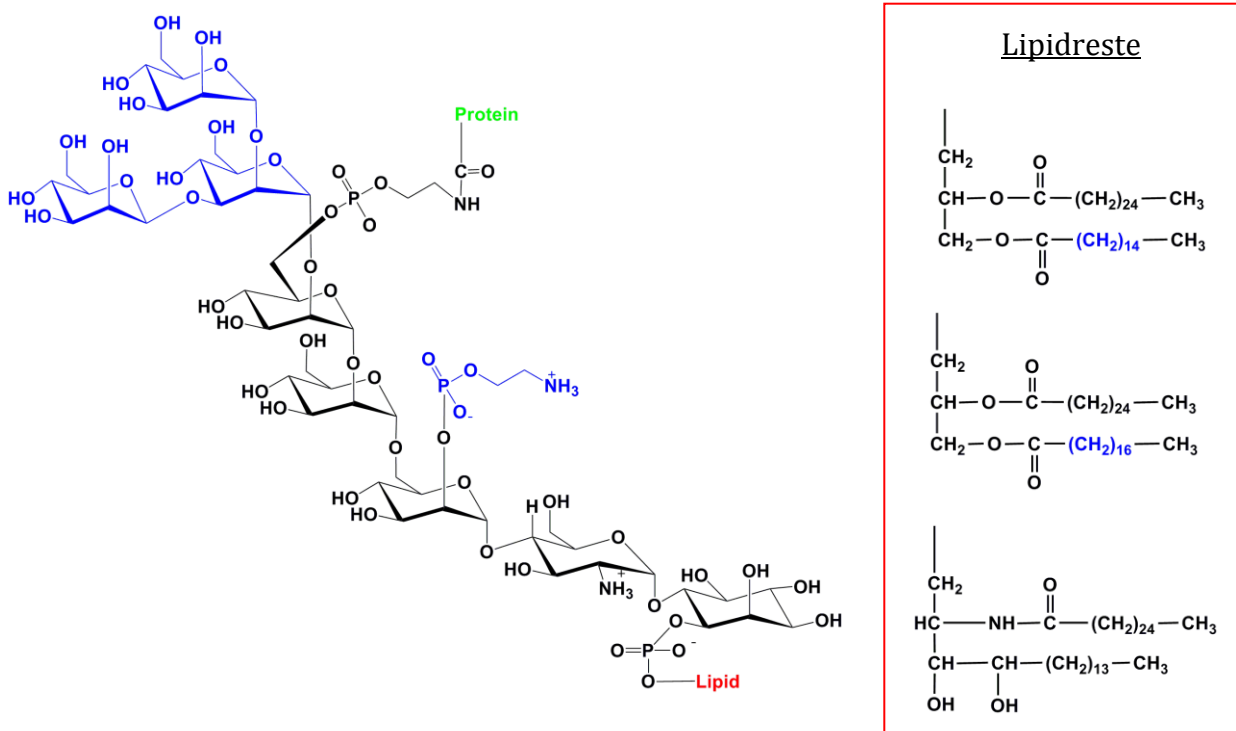


Abbildung 6: Die Grundstruktur des GPI-Ankers aus Hefen ist in schwarz dargestellt, wohingegen zusätzliche Modifikationen blau gekennzeichnet sind. Als Lipidreste können sowohl Diacylglycerin als auch Ceramid vorkommen (roter Kasten).

Die Modifikation des Prion Proteins mit einem nativen GPI-Anker aus Hefen gewährleistet, im Gegensatz bei der Verwendung von GPI-Analoga, die Verankerung des Proteins über zwei Fettsäurereste an die Membran. Außerdem besitzen Hefen, im Gegensatz zu mammalischen Systemen, kein homologes Prion. Dadurch kann bei späteren Reaktionen eine Kontamination mit zellulärem Prion Protein ausgeschlossen werden. Zusätzlich bietet die Kombination von rekombinant in *E. coli* hergestelltem Prion Protein mit einem nativen GPI-Anker aus Hefen, die Möglichkeit den Einfluss der GPI-Verankerung unabhängig von den Seitenketten-Glykosylierungen zu untersuchen, ohne dass eine vorherige enzymatische Behandlung des Proteins erfolgen muss.

Zielsetzung der Arbeit:

Eine grundlegende Voraussetzung für die biophysikalische und zellbiologische Charakterisierung des Prion Proteins ist die Verfügbarkeit ausreichender Proteinmengen an posttranslational modifiziertem Protein. Dies wird sowohl durch die geringe Syntheserate des Prion Proteins in mammalischen Zellen, sowie die aufwendige Aufreinigung GPI-verankerter Proteine erschwert. In dieser Arbeit werden semisynthetischen Methoden verwendet, um rekombinant exprimiertes Prion Protein mit einem nativen GPI-Anker zu modifizieren. Dabei steht neben der Verwendung der *Expressed Protein Ligation* auch die Semisynthese des Proteins *in vivo* durch *Trans-Spleißen* im Vordergrund. Ziel dieser Arbeit ist unter anderem die Isolation eines in Hefen exprimierten C-terminalen GPI-Anker Synthons, welches direkt in der *Expressed Protein Ligation* mit einem rekombinant exprimierten Prion Protein eingesetzt werden kann. Dadurch können Untersuchungen bezüglich der Struktur, dem Aggregationsverhalten und der Stabilität der Membraninsertion des GPI-verankerten Prions im Vergleich zu nicht modifizierten rekombinanten Prion Proteinen untersucht werden.

Zusätzlich soll die Umfaltungsreaktion des Prion Proteins *in vitro* und *in vivo* untersucht werden. Hierzu wird das Aggregationsverhalten des GPI-verankerte Prion Proteins (23-231) biophysikalisch charakterisiert. Außerdem wird das Protein mit einem Fluoreszenzmarker modifiziert, welcher es ermöglichen soll, die Umfaltung mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie an Zellen direkt zu untersuchen.

2. Material

2.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Chemikalien sind von p.A.-Qualität und stammen von den Firmen Acros (Geel), Baker (Groß-Gronau), Bio-Rad (München), Fluka (Neu-Ulm), Gibco-BRL (Neu Isenburg), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Steinheim).

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA, sowie die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, erfolgt über die jeweiligen Kits der Firma Qiagen (Hilden).

Enzyme werden von New England Biolabs (Schwalbach), Fermentas (St. Leon-Rot) und von Boehringer (Mannheim) bezogen.

Die für die *E. coli*- Zellanzucht verwendeten Nährmedien Trypton 140 und Hefeextrakt stammen von der Firma Gibco BRL (Neu Isenburg).

Die Aminosäuren für den Drop-out-Mix für die Zellanzucht von *S. cerevisiae* stammen von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt) und Sigma (Steinheim). Das Stickstoffmedium ohne Aminosäuren, sowie Pepton und Hefeextrakt stammen von der Firma Becton Dickinson (Heidelberg).

Alle für die Zellkultur benötigten Nährmedien und Zusätze stammen von der Firma Invitrogen (Darmstadt) oder Pan Biotechnologie (Aidenbach).

<i>Chemikalien und Verbrauchsmaterialien</i>	<i>Hersteller</i>
Amersham ECL Plus Western Blotting Reagenz	GE Healthcare, München
Amersham Hyperfilm ECL	GE-Healthcare, München
Amicon Centriplus	Millipore, Schwalbach
BCA	Novagen, Darmstadt
Bodipy® FL N-(2-aminoethyl)maleimid	Invitrogen, Darmstadt
Chitin Beads	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Dialysekassetten Slide-A Lyzer	Thermo Fisher, Bonn

<i>Chemikalien und Verbrauchsmaterialien</i>	<i>Hersteller</i>
DNA Marker	New England Biolabs, Frankfurt am Main
EndoH	New England Biolabs, Frankfurt am Main
FluorSave™ Reagenz	Calbiochem®, Darmstadt
Kodak X-Omat-Blue-Filme	PerkinElmer, Massachusetts
Lipofectamine LTX	Invitrogen, Darmstadt
LMW Marker	GE Healthcare, München
Lyticase aus <i>Arthrobacter luteus</i>	Sigma, Steinheim
Magic Mark™ Western Protein Standard	Invitrogen, Darmstadt
Membrane Lipid-Stripes™	MoBiTec, Göttingen
Ni-NTA Superflow Agarose	Qiagen, Hilden
PD10 -Säulen	GE Healthcare, München
Phospholipase C aus <i>Bacillus cereus</i>	Sigma, Steinheim
Poly-L-Lysin Lösung	Sigma-Aldrich, München
Protease Inhibitor	Roche, Penzberg
Proteinase K	Promega, Mannheim
SeeBlue®Plus2 Pre-stained Standard	Invitrogen, Darmstadt
Strep-Tag® Protein Marker	IBA, Göttingen
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Thioflavin T	Calbiochem®, Darmstadt
Zip-Tip C18 und C4	Millipore, Schwalbach

2.2. Instrumentation

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
CD-Spektrometer J-815	Jasco Easten, USA
DLS Titan	DynaPro, Dernbach

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
ABI Prism®3130xL Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Lincoln
Dot-Blot Apperatur	Carl Roth, Karlsruhe
Elektrophorese Sub-cell® GT	BioRad®, München
Elektroporationsküvetten	Invitrogen , Karlsruhe
ESI-MS LCQ Advantage Max	Thermo, Erlangen
Fluoreszenzmikroskop Leica TCS SP5	Leica Microsystems, Wetzlar
Fluoreszenzspektrometer Fluoromax-3®	Jobin Yvon Horiba Kyoto, Japan
Gelfiltrationssäule BioSep SEC-S3000	Phenomenex, Aschaffenburg
GenePulser®	BioRad, München
HPLC-Säulen	Bischoff (Leonberg), Grace Vydac (Worms)
HPLC-Anlage	Waters, Eschborn
HPLC-Anlage (System Gold)	Beckman Coulter, Krefeld
Inkubator CO ₂ Auto Zero	Heraeus , Hamburg
Gefriertrockner	Martin Christ GmbH, Osterode am Harz
Microfluidicer M-110S	Microfluidics, Newton, USA
Mini-Protean Tetra Elektrophorese-System	Biorad, München
NuAir CO ₂ Inkubator	NuAir, Eurasburg
NuAir Sicherheitswerkbank	NuAir, Eurasburg
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Potter-Homogenisator	Braun, Melsungen
Schüttler	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Trans-Blot SD Semi-Dry-Apparatur	Biorad, München
Ultrazentrifuge L-80XP	Beckman Coulter™, Krefeld
UV/Vis-Spektrometer DU-650	Beckman, Krefeld
Voyager-DE Pro MALDI-Massenspektrometer	PerSeptive Biosystems, Weiterstadt
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge RC28S	Sorval, Hamburg

2.3. Stämme und Zelllinien

2.3.1. *Escherichia coli*-Stämme

Name	Genotyp	Herkunft
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96(Nal^r) thi-1 hsdR17 (r_k⁻ m_k⁺) supE44 relA1 lac [F⁻ proA⁺B⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15 Tn10 (Tet^r)]</i>	Stratagene
BL21-CodonPlus® (DE3)-RIL	B F ⁻ <i>ompT hsdS(rB⁻ mB⁻) dcm⁺ Tetr gal λ(DE3) endA Hte [argU ileY, leuW Camr]</i>	Stratagene
BL21(DE3)	B F ⁻ <i>dcm ompT hsdS(rB⁻ mB⁻) gal λ(DE3)</i>	Stratagene

2.3.2. *Saccharomyces cerevisiae* -Stämme

Name	Genotyp	Herkunft
YPH501	<i>MAT a/α ura3-52 lys2-801^{amber} ade2-101^{ochre} trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1</i>	Stratagene

2.3.3. Zelllinien

Zelllinie	Typ	Herkunft
N2a	Neuroblastomazellen aus einem spontanen Gehirntumor einer Stamm A Albino-Maus	Tulika Dhar, AG Mootz, TU Dortmund

2.4. Plasmide

Plasmid		Herkunft
p425Cup1	Hefeexpressionsvektor mit Kupferpromotor,	R. P. Seidel
pTXB3	<i>E. coli</i> Expressionsvektor mit GyrA-Intein, lac-Promotor,	Invitrogen
pcDNA3.1/Zeo(+)	Mammalischer Expressionvektor mit CMV-Promotor und zusätzlicher Zeocin-Resistenz	Invitrogen
pTD047	pVS01-Vektor mit Kre-Int ^C -Gas1p-Fragment	AG Mootz, TU Dortmund
pVS24	pVS09-Vektor mit NpuDnaE-Int ^N -Fragment	AG Mootz, TU Dortmund

2.5. Oligonukleotide

Die im Folgenden aufgeführten Oligonukleotide werden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen.

Name	Sequenz 5'-.....-3'	Verwendung
PrP-23-231-NheI_for	GCA TAC CCG CTA GCA AAA AGC GGC CAA A	Primer zur Klonierung von PrP 23-231 in Transsplicingvektor pVS24
PrP-23-231-Nhe_rev	GTG GTG GTG GTG GCT AGC GGA TCT TCT CC	Primer zur Klonierung von PrP 23-231 in Transsplicingkonstrukt pVS24
Gas1p-PstI_for	TGT ACA AGC TGC AGC ACC ACC	Mutageneseprimer zur Verlängerung der Gas1p-Sequenz
Gas1p-XhoI_rev	A ATT ACA TGA CTC GAG TTA AAC CAA	Mutageneseprimer zur Verlängerung der Gas1p-Sequenz

<i>Name</i>	<i>Sequenz 5'-.....3'</i>	<i>Verwendung</i>
Gas1p-512-559_for	GAT GAC GAC GAC AAG AGT TCT TCT TCT TCT TCT TCA GCT TCA TCT TCA TCT TCT AGC AAG AAG AAT GCT GCC AC	Mutageneseprimer zur Ver- längerung der Gas1p-Sequenz
Gas1p_for	AAA CAC AGC TAA ATC TCA ACA ATG	Primer zur Isolation von Gas1p aus genomischer DNA
Gas1p_rev	ATC GAG TTA TTA TGT ATG TGT CGA	Primer zur Isolation von Gas1p aus genomischer DNA
hmPrP_23-EcoRI_for	ACT GAT GTC GGC GAA TTC AAA AAG CGG	Primer zur Mutagenese und Amplifikation von hmPrP
hmPrP_231-PstI_rev	A AAG CAC GGT CTG CAG GGA TCT TCT CCC	Primer zur Mutagenese und Amplifikation von hmPrP
p425Cup1_for	GTT AGT GCA ATA TCA TAT AG	Sequenzierungsprimer für Hefvektor p425Cup1
p425Cup1_rev	CCT TCC TTT TCG GTT AGA GC	Sequenzierungsprimer für Hefvektor p425Cup1
T7-Promotor	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	Sequenzierungsprimer
T7-Terminator	CTA GTT ATT GCT CAG CGG TGG	Sequenzierungsprimer

2.6. Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Verdünnung</i>		<i>Herkunft</i>
	<i>WB</i>	<i>IF</i>	
<i>Primäre Antikörper</i>			
Maus anti-PrP 3F4	1:10000	1:50	Jörg Tatzelt München
Maus anti-PrP 4H11	1:10000	1:50	Jörg Tatzelt, München

<i>Antikörper</i>	<i>Verdünnung</i>		<i>Herkunft</i>
	<i>WB</i>	<i>IF</i>	
<i>Primäre Antikörper</i>			
Monoklonaler Maus Anti-FLAG® M2	1:1000	1:50	Sigma-Aldrich, München
Monoklonaler Maus Anti-His	1:2500	1:50	Sigma-Aldrich, München
Polyklonaler Kaninchen Anti-DYKDDDDK-Tag (Flag-Tag)	1:1000		Cell Signaling, Frankfurt a. M.
Polyklonaler Kaninchen Anti-GFP	1:10000	1:50	Acris Antibodies, Hiddenhausen
<i>Sekundäre Antikörper</i>			
Ziege Anti-Kaninchen IgG HRP-konjugiert	1:2500		Invitrogen, Darmstadt
Ziege Anti-Maus IgG HRP-konjugiert	1:2500		Sigma-Aldrich, München
Ziege Anti-Kaninchen IgG TRITC-konjugiert		1:50	
Ziege Anti-Maus IgG (H+L), TRITC-konjugiert		1:50	Invitrogen, Darmstadt
Ziege Anti-Kaninchen IgG Alexa633-konjugiert		1:50	Invitrogen, Darmstadt

2.7. Puffer

<i>TE-Puffer</i>	<i>TBE-Puffer</i>
10 mM Tris/HCl pH 8.0	89 mM Tris/HCl pH 8.9
1 mM EDTA	89 mM Borsäure
	0,99 mM EDTA

<i>PBS-Puffer</i>	<i>TBS-Puffer</i>
140 mM NaCl	50 mM Tris/HCl pH 7.4
2,7 mM KCl	150 mM NaCl
10 mM Na ₂ HPO ₄	
1,8 mM KH ₂ PO ₄	
pH 7.2	

3. Methoden

3.1. Nährmedien und Anzuchtbedingungen für *E. coli*

3.1.1. Nährmedien für *E. coli*

LB-Medium	2 TY-Medium
10 g/L Bacto Trypton Pepton	16 g/L Pepton
5 g/L Hefe-Extrakt	10 g/L Hefe-Extrakt
10 g/L NaCl	5 g/L NaCl
pH 7.2 (NaOH)	pH 7.2

Die Medien werden 20 min. bei 121°C autoklaviert. Zur Herstellung von Agarplatten werden dem Medium 15 g/L Agar zugesetzt und die fertigen Platten bei 4°C gelagert.

3.1.2. Anzucht von *E. coli*-Kulturen

Zur Kultivierung von Transformanden wird mit einer sterilen Impföse ein Teil einer Dauerkultur auf einer Agarplatte, welche ein geeignetes Antibiotikum enthält, ausgestrichen und ü. N. bei 37°C inkubiert. Anschließend wird ein Reagenzglas mit 2 mL LB-Medium (und entsprechendem Antibiotikum) mit einer Einzelkolonie dieser Platte inokuliert und bei 37°C und 160 rpm inkubiert.

Dauerkulturen werden angelegt, indem 0,7 mL einer Flüssigkultur in der exponentiellen Wachstumsphase mit 0,3 mL sterilem 80%igem Glycerin gemischt werden. Diese werden anschließend bei -80°C gelagert.

3.2. Nährmedien und Anzuchtbedingungen für *S. cerevisiae*

3.2.1. Nährmedien für *S. cerevisiae*

SC-Medium	YPD-Medium
6,7 g/L Bacto-Hefe Stickstoffbase ohne AS	10 g/L Bacto-Yeast Extract
2,0 g/L " Drop-out" Mix	20 g/L Bacto-Peptide
20 g/L Glucose	20 g/L Glucose
pH ~ 5.8	

Leucin-Drop-Out Mix für Selektionsmedium

Adenin	0,5 g	Lysin	2,0 g
Alanin	2,0 g	Methionin	2,0 g
Arginin	2,0 g	p-Aminobenzoesäure	0,2 g
Asparagin	2,0 g	Phenylalanin	2,0 g
Asparaginsäure	2,0 g	Prolin	2,0 g
Cystein	2,0 g	Serin	2,0 g
Glutamin	2,0 g	Threonin	2,0 g
Glutaminsäure	2,0 g	Thryptophan	2,0 g
Glycin	2,0 g	Tyrosin	2,0 g
Histidin	2,0 g	Uracil	2,0 g
Inositol	2,0 g	Valin	2,0 g
Isoleucin	2,0 g		

Die Medien werden 20 min. bei 121°C autoklaviert. Zur Herstellung von Agarplatten werden dem Medium 15 g/L Agar zugesetzt und die fertigen Platten bei 4°C gelagert.

3.2.2. Anzucht von *S. cerevisiae*- Kulturen

Der verwendete Hefestamm YPH501 wird normalerweise auf YPD-Medium, bei Notwendigkeit zur Selektion auf SC-Medium angezogen. Selektioniert wird hierbei auf eine Prototrophie, welche dem Stamm durch einen Marker auf dem transformierten Plasmid (LEU2) verliehen wird. Hefekulturen werden aus einer Dauerkultur oder von einer Einzelkolonie in Flüssigkultur angeimpft, welche zusätzlich mit 0,1 mg/mL Adenin versetzt ist und bei 30°C und 200 rpm inkubiert. Das zusätzliche Adenin in der Flüssigkultur verhindert, dass sich aufgrund der *ade2-101*-Mutation ein rotes Zwischenprodukt der Purin-Biosynthese (p-Ribosyl-Aminoimidazol) anreichert. Agarplatten werden nicht zusätzlich mit Adenin angereichert, so dass die Hefezellen nach Inkubation für 3-5 Tage bei 30°C rot erscheinen^{81,82}.

Dauerkulturen werden von einer Platte mit frisch transformierten Hefezellen angesetzt. Hierzu wird 1 mL 15 %iges Glycerol auf die Zellen gegeben, das Zellmaterial vorsichtig mit einem sterilem Glasstab von der Platte abgekratzt und in ein steriles Kryogefäß überführt. Die Zellen werden resuspendiert und zügig in Trockeneis gestellt, um die Sedimentation der Hefezellen zu verhindern, bevor sie bei -80°C gelagert werden können.

3.3. Nährmedien und Anzuchtbedingungen für murine Neuroblastomazellen (N2a)

3.3.1. Nährmedien für N2a-Zellen

MEM	Vollmedium
Eagle's Balanced Salz Lösung	MEM
2,2 g/L NaHCO ₃	10 % fötales Kälberserum
Phenolrot	1 U/mL Penicillin G
	1 µg/mL Streptomycin
	2 mM Glutamin

3.3.2. Anzuchtbedingungen für N2a-Zellen

Murine Neuroblastomazellen (N2a) werden als adhärenter Einzelzellrasen in MEM (*Modified Eagle's 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. Für die Subkultur der adhären-wachsenden Zellen werden diese mit Hilfe von 2 mL Trypsin-EDTA-Lösung enzymatisch von der Kulturschale abgelöst. Hierzu werden die Zellen mit der Lösung für 3 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und die Zellen durch leichtes Klopfen vom Boden der Kulturschale abgelöst. Um das Trypsin und das EDTA zu inaktivieren werden die Zellen in der doppelten Menge des Vollmediums aufgenommen und resuspendiert. Nach der anschließenden Zentrifugation bei 1000 x g für 15 min. bei 4°C wird das Pellet in 1 mL Vollmedium resuspendiert. Die Zellen werden bei einer wöchentlichen Subkultivierung in einem Verhältnis von 1:40 oder 1:50 bzw. 1:10 oder 1:20 bei zweimaliger Subkultivierung pro Woche in frisches Vollmedium passagiert. In manchen Fällen ist eine vorherige Zellzählung mit Vitalitätstest notwendig. Hierzu wird ein Aliquot mit einer 0,5 %igen Trypanblaulösung versetzt (1:2), für 2 Minuten inkubiert und anschließend in einer Neubauerkammer ausgezählt und in dem entsprechendem Verhältnis passagiert.

Bestimmung der Gesamtzellzahl:

$$Z \times T \times V \times 10^4 = \text{Gesamtzellzahl} / \text{mL} \quad (1)$$

Z: Mittelwert der ausgezählten Zellen aus 8 Großquadraten

T: Verdünnung der Zellen mit Trypanblau

V: Volumen in dem die auszählende Zellsuspension resuspendiert wurde

10⁴: Kammerfaktor

Berechnung der Vitalitätsrate:

$$\% \text{ lebende (ungefärbte) Zellen} = \frac{\text{ungefärbte Zellen}}{\text{gefärbte} + \text{ungefärbte Zellen}} \cdot 100 \quad (2)$$

Sollte die Vitalitätsrate unter 80 % liegen, so ist die Kultur zu verwerfen.

3.4. Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Methoden werden, soweit nicht anders erwähnt, nach Sambrook⁸³ und Ausubel⁸⁴ angewendet.

3.4.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgt nach alkalischer Lyse der *E. coli* Zellen nach der Methode von Birnboim⁸⁵.

Die präparative Isolierung von Plasmid-DNA erfolgt unter Verwendung von Anionenaustauscher-Säulen der Firma Qiagen (Qia-Tip-20 und Qia-Tip-100). Abweichend vom Protokoll des Herstellers wird vor dem Auftrag des Lysates auf die Säulen ein RNaseA Verdau (10 µg/mL, 1 h bei 37°C) mit anschließender Zentrifugation (10 min., 5000 rpm) durchgeführt.

3.4.2. Isolierung von chromosomaler DNA aus *S. cerevisiae*

Die Zellen aus einer 50 mL Kultur von *S. cerevisiae* werden in der späten exponentiellen Wachstumsphase durch Zentrifugation bei 5000 x g geerntet und das Pellet in PBS/Sorbitol resuspendiert. Die Zellen werden durch Zugabe von 10U Lytikase/OD und anschließender Inkubation der Probe bei 30°C unter leichtem Schütteln bis zur vollständigen Sphäroblastierung inkubiert. Anschließend werden die sphäroblastierten Zellen für 10 min. bei 300 x g zentrifugiert, das Pellet in 10 mL PK-Puffer aufgenommen und zur vollständigen Lyse über Nacht bei 40°C inkubiert.

Die Extraktion der genomischen DNA erfolgt durch zweimalige Zugabe von einem Volumenäquivalent Phenol. Dabei wird jeweils 2h unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend in einem Corex-Glas bei 10000rpm (SS34-Rotor, Sorvall) zentrifugiert. Die erhaltene wässrige Phase wird in einem 14kD-Dialyseschlauch mindestens fünfmal gegen 2L Dialysepuffer dialysiert. Nachdem evtl. vorhandenes Phenol durch die Dialyse entfernt wurde, wird die Lösung mit 100 µL aufgekochter RNase A (2 mg/mL) versetzt und 30 min. bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgt die Überführung der DNA-Lösung in einen neuen Dialyseschlauch und die Dialyse gegen TE-Puffer (6 x 2L). Die

Konzentration und Qualität der erhaltenen DNA wird mittels Agarosegel-Elektrophorese bestimmt.

PBS/Sorbitol

1,4 M NaCl
 27 mM KCl
 100 mM Na₂HPO₄
 18 mM KH₂PO₄
 10 % Sorbitol
 pH 7.2

PK-Puffer

TE-Puffer
 0,5 % SDS
 0,1 mg/mL Proteinase K

Dialysepuffer

10 mM Tris/HCl pH 7.4
 1 mM EDTA pH 8.0
 100 mM NaCl

3.4.3. Amplifikation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente werden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert⁸⁶. In 50 µL Ansätzen werden 10 ng DNA-Matrize, 20 pmol Primer, 5 nmol jedes dNTP's und 0,5 U Pfu-Polymerase (Promega, Madison, USA) verwendet. Die Amplifikation der DNA im Thermocycler erfolgt durch „Hot-start“ PCR in zwei Schritten:

1 min.	bei	96°C	} x 5	→ Zugabe der Polymerase
15 s	bei	96°C		
30 s	bei	T _m - 5°C		
45 s	bei	72°C		
<hr/>				
15 s	bei	96°C	} x 15	
30 s	bei	T _m		
45 s	bei	72°C		
<hr/>				
4 min.	bei	72°C		

3.4.4. Isolierung und Analyse von DNA-Fragmenten mittels Agarosegelelektrophorese

Die Analyse und Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte über eine horizontale Agarose-Gelelektrophorese. Dazu werden die entsprechenden Proben in Probenpuffer (TBE-Puffer, 10 % Ficoll, 0,025 % Bromphenolblau und 0,025 % Xylencyanol) aufgenommen und auf 0,7 – 2 %ige Agarosegele in TBE-Puffer aufgetragen. Als Elektrophorese-Puffer dient ebenfalls TBE. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wird parallel ein entsprechender Standard aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Proben erfolgt in einem elektrischen Feld mit einer Spannung zwischen 70 und 120 Volt (4 V/cm). Die DNA wird im Agarosegel durch Ethidiumbromid 0,6 mg/L angefärbt und unter UV-Licht fotografiert. Die Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgt unter Verwendung eines Gel-Extraktions-Kits der Firma Qiagen (Hilden). Dazu werden die entsprechenden Banden unter UV-Licht (360 nm) aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA nach dem Protokoll des Herstellers aus dem Agarosegel extrahiert.

3.4.5. UV-photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA wird durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Dabei gilt für doppelsträngige DNA:

1 OD_{260nm} entspricht 50 µg DNA/mL (bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm)

Der Nullabgleich wird mit dem reinen Lösungsmittel durchgeführt. 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 OD_{260nm}/OD_{280nm} ~1,8.

3.4.6. Restriktion von DNA

Die Restriktion der DNA erfolgt nach den Angaben des Herstellers durch Inkubation für 1-3 h bei 37°C.

3.4.7. Ligation

Für alle Ligationsreaktionen wird die Bakteriophagen T4-DNA-Ligase in der Konzentration 1U/ μ L verwendet. Die Ligation erfolgt nach Anleitung des Herstellers. Dabei werden pro Ligationsansatz 50 ng Vektor-DNA verwendet. Die Insert-DNA-Mengen werden in molaren Verhältnissen 5:1 von Insert zu Vektor eingesetzt. Mit dem Ligase-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7.6, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 5 % (w/v) PEG 8000) werden 20 μ L Ansätze 4-7 h bei RT inkubiert. Anschließend wird die Salzkonzentration durch Zugabe von 20 μ L Wasser herabgesetzt und die Probe bis zur Transformation bei $-20^\circ C$ gelagert.

3.4.8. Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* durch Elektroporation

Die Transformation von Plasmid-DNA in kompetente *E. coli* Zellen erfolgt durch Elektroporation nach der Methode von Dower *et al.*⁸⁷. Dazu werden 20 μ L des verdünnten Ligationsansatzes mit 80 μ L einer 10 %igen Glycerinsuspension kompetenter Zellen ($OD_{578} \approx 100$) vermischt und in eine Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 2 mm gegeben. Die Transformation erfolgt mittels GenePulsers® (BioRad, München) durch einen Puls von 1,5 kV, 800 Ω , 25 μ F. Die Zeitkonstante liegt dabei in einem Bereich von 10 ± 2 ms. Die transformierten Zellen werden in 0,9 mL LB-Medium ohne Antibiotikum aufgenommen, 30 min. bis 1 h bei $37^\circ C$ und 200 rpm geschüttelt und anschließend auf antibiotikahaltigen LB-Agar-Platten ausplattiert.

3.4.9. Transformation von Plasmid-DNA in *S. cerevisiae* durch Elektroporation

Das Pellet der zu transformierende *S. cerevisiae* -Zellen wird in 40 μ L eiskaltem 1M Sorbitol resuspendiert und mit 2-5 μ L der zu transformierenden DNA für 5 min. auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgt in Elektroporationsküvetten mit einem Elektrodenabstand von 2mm (Biorad, München) bei 1,5 kV, 200 Ω und 25 μ F im GenePulser® (Biorad, München). Anschließend werden die Zellen direkt in 1 mL eiskaltem 1 M Sorbitol aufgenommen, in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 17900 x g

für 30 sec. in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und das Pellet in 100 µL eiskaltem 1 M Sorbitol resuspendiert und auf SC-Medium-Platten ausplattiert. Die Inkubation erfolgt für 3-5 Tage bei 30°C.

3.4.10. DNA-Sequenzierung

Durch die DNA-Sequenzierung wird die Nukleotid-Sequenz einer DNA bestimmt. Dies geschieht nach der sog. Zyklus-Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden nach Sanger et al.⁸⁸. Dabei werden in 20 µL Reaktionsansätzen 500 ng Plasmid-DNA, 4 µL Big-Dye-Terminator-Mix (Applied Biosystems, ABI), 3,2 pmol Primer-Oligonukleotid und 4 µL Sequenzierungs-Puffer gemischt. Die gesamte Reaktion basiert auf drei Teilschritten, die bei jeweils unterschiedlichen Temperaturen ablaufen und deren Zyklus 25-mal wiederholt wird:

10	s	bei	96°C	} 25 x
5	s	bei	55°C	
4	min.	bei	60°C	

Anschließend werden zu dem Reaktionsprodukt 1 µL 125 mM EDTA, 2 µL 3 M Na-Acetat und 50 µL Ethanol zugegeben und 15 min. auf Eis gefällt. Nach der Zentrifugation (10 min., 10000 rpm, 4°C) wird das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Die elektrophoretische Analyse erfolgt an einem ABI Prism®3130xL Genetic Analyzer.

3.5. Proteinchemische Methoden

3.5.1. Proteinexpression und -aufreinigung in *E.coli*

3.5.1.1. Tobacco etch virus Protease (TEV-Protease)

Zur Expression der TEV-Protease in *E. coli* werden ausschließlich Transformanten des Stammes BL21(DE3) eingesetzt. Die Hauptkultur wird in LB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin, sowie 34 µg/mL Chloramphenicol mittels einer gesättigten Vorkultur auf eine optische Dichte OD_{578nm} von 0,05 angeimpft und bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Nach der Vermehrung der Zellen auf einen OD_{578nm} -Wert von 0,8-1 erfolgt die Induktion mit IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) auf eine Endkonzentration von 1 mM. Die Expression erfolgt bei 30°C und 150rpm. 4h nach Induktion werden die Zellen durch Zentrifugation bei 5000 x g und 4°C für 15 min. geerntet. Das Zellpellet wird mit Zellwaschpuffer (ZWP) gewaschen und kann anschließend bei -80°C gelagert oder nach Resuspension im ZWP weiterverarbeitet werden. Die in ZWP resuspendierten Zellen werden mit einem Microfluidizer mechanisch bei 1200 bar aufgeschlossen. Durch Zentrifugation (60 min., 100000 x g, 4°C) werden die Zellmembranen und Zelltrümmer sedimentiert und die erhaltene Zytoplasmafraktion wird über eine Ni-NTA-Säule aufgereinigt.

Ni-NTA-Aufreinigung

Dazu wird das Zytoplasma auf eine mit etwa drei Säulenvolumen Puffer A äquilibrierte Ni-NTA-Säule (Qiagen, Hilden) aufgetragen und mit zehn Säulenvolumen Puffer B gewaschen. Die Elution des Proteins von der Säule erfolgt mit Puffer C. Nach dem Ankonzentrieren des Proteins bei 3000 x g in einem 10kD-Konzentrator (Millipore, Schwalbach), wird das Protein zur Entfernung des Imidazols über Nacht bei 4°C in einem 14kD-Dialyseschlauch (Roth, Karlsruhe) gegen Puffer D dialysiert und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt über die Messung der Absorption bei 280 nm (ExpASy: $A_{280nm} = 1,162$ entspricht einer Konzentration von 1mg/mL). Dazu wird das Protein 1:10 mit 6 M GdnHCl, 100 mM NaPi pH 7.5 verdünnt, da das im Dialysepuffer

vorhandene DTT die Messung bei 280 nm beeinflusst. Die Effizienz der TEV-Protease wird mit Hilfe eines Testproteins bestimmt.

ZWP	Puffer A
500 mM NaCl	50 mM NaP _i pH 8.0
25 mM NaP _i pH 7.5	300 mM NaCl
10 % Glycerin	2 mM BME
1 mM MgCl ₂	
1 Tbl. Proteaseinhibitor (Roche)	
Puffer B	Puffer C
50 mM NaP _i pH 8.0	50 mM NaP _i pH 8.0
300 mM NaCl	300 mM NaCl
2 mM BME	2 mM BME
30 mM Imidazol	200 mM Imidazol
Puffer D	
500 mM NaCl	
25 mM NaP _i pH 7.5	
5 mM DTT	
10 % Glycerin	

3.5.1.2. RBD-Mxe-CBD

Eine Expressionskultur (LB-Medium, 100 µg/mL Ampicillin) wird mit einer ü.N. der Transformanten in *E.coli* BL21(DE3)-Zellen auf eine OD_{578nm} von 0.1 inokuliert und bei 37°C und 160 rpm bis zur exponentiellen Wachstumsphase inkubiert. Die Expression (OD_{578nm}: 0,8-1) wird durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert. Die Zellernte erfolgt 3 h nach Induktion durch Zentrifugation bei 5000 x g für 15 min. Die Zellen werden mit ZWP resuspendiert und mittels Microfluidizer mechanisch bei 1200 bar aufgeschlossen. Durch Zentrifugation (60 min., 100000 x g, 4°C) werden die Zellmembranen sedimentiert und die erhaltene Zytoplasmafraktion über eine Ni-NTA-Säule aufgereinigt.

Ni-NTA-Aufreinigung:

Das Zytoplasma wird auf eine mit etwa drei Säulenvolumen Puffer A äquilibrierte Ni-NTA-Säule (Qiagen, Hilden) aufgetragen und mit zehn Säulenvolumen Puffer B gewaschen. Die Elution des Proteins von der Säule erfolgt mit Puffer C. Nach dem Ankonzentrieren des Proteins bei 3000 x g in einem 3kD-Konzentrator (Millipore, Schwalbach), wird das Protein zur Entfernung des Imidazols über Nacht bei 4°C in einem 14kD-Dialyseschlauch (Roth, Darmstadt) gegen Puffer A dialysiert. Anschließend wird es in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt über die Messung der Absorption bei 280 nm (ExPASy: $A_{280\text{nm}} = 1,10$ entspricht einer Konzentration von 1 mg/mL).

ZWP

50 mM Tris-HCl pH 8.0
100 mM NaCl
2 mM EDTA
0,05 % Triton-X-100

Puffer A

50 mM Tris-HCl pH 7.4
100 mM NaCl
5mM MgCl₂

Puffer B

50 mM Tris-HCl pH 7.4
100 mM NaCl
5mM MgCl₂
10 mM Imidazol

Puffer C

50 mM Tris-HCl pH 7.4
100 mM NaCl
5mM MgCl₂
250 mM Imidazol

Generierung des C-terminalen Thioesters:

Chitin-Beads (NEB, Darmstadt) werden mit Puffer A äquilibriert. Anschließend das zuvor mittels Ni-NTA aufgereinigte RBD-Protein auf die Säule aufgetragen und für 1 h unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert. Danach wird die Säule mit fünf Säulenvolumen Puffer A gewaschen. Die Abspaltung des C-terminalen Thioesters erfolgt durch die Zugabe von Puffer B und Inkubation für 1-3 h unter leichtem Schütteln bei RT. Das Protein wird von der Säule eluiert und die Säule mit Puffer B nachgewaschen. Nachdem das Protein in einem 3kD-Konzentrator bei 3000 x g auf maximal 8 mg/mL ankonzentriert wurde, wird die Konzentration mittels Absorptionsspektrometrie bestimmt.

Puffer A	Puffer B
50 mM Tris-HCl pH 8.0	50 mM Tris-HCl pH 8.0
100 mM NaCl	100 mM NaCl
	250 mM MESNA

3.5.1.3. PrP-90-230-Mxe-CBD

Eine Expressionskultur (LB-Medium, 100 µg/mL Ampicillin) wird mit einer über Nacht-Kultur der Transformanten in *E.coli* BL21(DE3)-RIL-Zellen auf eine OD_{578nm} von 0.1 inokuliert und bei 37°C und 160 rpm bis zur exponentiellen Wachstumsphase inkubiert. Die Expression wird in der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{578nm}: 0,8-1) durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Zellernte erfolgt 4 h nach Induktion durch Zentrifugation bei 5000 x g für 15 min.. Die Zellen werden in Aufschlusspuffer resuspendiert und mittels Microfluidizer mechanisch bei 1200 bar aufgeschlossen.

Proteinreinigung unter denaturierenden Bedingungen:

Die Trennung der löslichen zytoplasmatischen Bestandteile von den aggregierten Bestandteilen (Einschlusskörper: „Inclusion bodies“) erfolgt durch eine einstündige Zentrifugation bei 100000 x g (4°C). Das erhaltene Pellet wird in IB-Puffer gewaschen und anschließend zentrifugiert (15 min., 20000 x g, 4°C). Dieser Waschschrift wird dreimal durchgeführt. In dem letzten Waschschrift wird das Pellet, zur Entfernung des Detergenz, in Aufschlusspuffer gewaschen, zentrifugiert und das erhaltene Pellet mit den Inclusion bodies ü. N. in Solubilisierungspuffer unter Rühren solubilisiert.

Die übrigen Zellbestandteile werden durch Zentrifugation von den im Puffer gelösten Proteinen getrennt (1h, 100000 x g, 20°C). Die anschließende Aufreinigung erfolgt mittels Ni-NTA Superflow (Qiagen, Hilden). Das Säulenmaterial wird mit Puffer A äquilibriert und nach Auftragen des Solubilisats mit zehn Säulenvolumen Puffer B gewaschen. Das mit Puffer C eluierte Protein wird in einem 30kD-Konzentrator (Millipore, Schwalbach) bei 3000 x g ankonzentriert und anschließend zur Entfernung des Imidazols gegen Puffer D über Nacht dialysiert.

Aufschlusspuffer

500mM NaCl
 100 mM Tris/HCl pH 7.5
 0,5 mM EDTA
 1 mM TCEP

IB-Puffer

Aufschlusspuffer
 0,5 % Triton X-100 (v/v)

Puffer A

8M GdnHCl
 50 mM Tris/HCl pH 8.0
 5 mM Imidazol

Puffer B

6 M GdnHCl
 50 mM Tris/HCl pH 8.0
 30 mM Imidazol

Puffer C

6 M GdnHCl
 50 mM Tris/HCl pH 8.0
 200 mM Imidazol

Puffer D

6 M GdnHCl
 50 mM Tris/HCl pH 8.0

Generierung des C-terminalen Thioesters:

Zur Generierung des Thioesters muss das im Puffer enthaltene GdnHCl gegen Harnstoff ausgetauscht werden. Dazu wird das Protein in mehreren Schritten gegen 4 M Harnstoff, 50 mM Tris/HCl pH 8.0 in einer 10kD-Dialysekassette (Pierce, Bonn) bei RT dialysiert. Für den *Trans*-Spleiß-Ansatz wird das Protein mit 50 mM MESNA versetzt und die Reaktion mit Hilfe einer SDS-PAGE überprüft. Die Aufreinigung des Ansatzes erfolgt mittels RP-HPLC. Dazu wird der Ansatz auf eine präparative C4-Säule (250 x 20 mm) mit Vorsäule (50 x 20mm) (Vydac, Worms) bei einem Fluss von 4 mL/min. aufgetragen und mit Hilfe eines linearen Gradienten von 20 % Puffer B bis 60 % Puffer B in Puffer A in 60 min. und einer Flussrate von 8 mL/min. eluiert. Die das Protein enthaltenden Fraktionen werden vereinigt, lyophilisiert. In 8 M Harnstoff, 50 mM Tris/HCl pH 7.2 und 300 mM NaCl gelöst wird es bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Puffer A

Wasser
 0,1 % TFA

Puffer B

Acetonitril
 0,08 % TFA

3.5.1.4. PrP-Int^N

Die Expressionskultur (LB-Medium mit 50 µg/mL Kanamycin) wird mit einer über Nacht gewachsenen Vorkultur des entsprechenden Transformanden in *E. coli* BL21(DE3) auf eine OD_{578nm} von 0,1 inokuliert und bis zur mittleren exponentiellen Wachstumsphase (OD_{578nm} von ~1) bei 37°C und 160 rpm geschüttelt. Die heterologe Expression des Proteins erfolgt durch die Zugabe von 1 mM IPTG für 4h. Anschließend werden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (15 min., 6000 rpm, 4°C) und in Zellwaschpuffer (ZWP) resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgt mechanisch bei 1200 bar mittels Microfluidizer. Zur Isolierung der Einschlusskörper (Inclusion bodies) werden die aufgeschlossenen Zellen für 1 h bei 45000 rpm (Ti45, Beckman) zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wird in Triton-IB-Puffer homogenisiert und bei 25000 x g für 10 min. zentrifugiert. Dieser Waschschrift wird dreimal wiederholt. Zur Entfernung des Detergenz wird das Pellet in einem letzten Waschschrift mit ZWP gewaschen und zentrifugiert (15 min., 46000 x g, 4°C). Die Solubilisierung der Einschlusskörper (Inclusion bodies) erfolgt durch Homogenisieren des Pellets in Solubilisierungspuffer und Inkubation unter Rühren bei RT über Nacht. Die übrigen Zellbestandteile werden vor der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Chromatographie durch Zentrifugation bei 45000 rpm (Ti45, Beckman) für 1 h von den im Puffer gelösten Proteinen getrennt. Für die Aufreinigung wird das Ni-NTA Superflow Material mit Puffer A äquilibriert und der Zentrifugationsüberstand aufgetragen. Das Protein wird mit Puffer B gewaschen und anschließend mit Puffer C eluiert. Das Protein wird in einem 10kD-Konzentrator (Millipore, Schwalbach) bei 3000 x g ankonzentriert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

ZWP

50 mM NaP_i pH 8.0
300 mM NaCl

Triton-IB-Puffer

50 mM NaP_i pH 8.0
300 mM NaCl
0,5 % Triton X-100 (v/v)

Solubilisierungspuffer

8 M GdnHCl
50 mM Tris/HCl pH 8.0
150 mM NaCl

Puffer A

6 M GdnHCl
50 mM Tris/HCl pH 8.0
150 mM NaCl

Puffer B	Puffer C
6 M GdnHCl	6 M GdnHCl
50 mM Tris/HCl pH 8.0	50 mM Tris/HCl pH 8.0
150 mM NaCl	150 mM NaCl
10 mM Imidazol	200 mM Imidazol

3.5.2. Proteinexpression und -aufreinigung in *S. cerevisiae*

3.5.2.1. Kre-GFP-Gas1p

Für die Expression in Hefezellen wird zur Selektion SC-Medium ohne Leucin verwendet. Hierzu werden Hefekulturen steril aus einer Dauerkultur oder eine Einzelkolonie von einer Mediumplatte in eine 1 mL Flüssigkultur, welche zusätzlich mit 0,1 mg/mL Adenin versetzt ist, überführt. Das Wachstum erfolgt bei 30°C und 200 rpm über Nacht. Um ein optimales Wachstum zu gewährleisten, wird mit der 1 mL-Vorkultur zunächst eine 50 mL- und anschließend eine 500 mL-Vorkultur angeimpft, welche ebenfalls über Nacht bei 30°C und 200 rpm inkubiert werden. Die eigentliche Expressionskultur wird mit 0,1 mg/mL Adenin versetzt und mit der 500 mL-Vorkultur auf eine OD_{578nm} von 0,2-0,3 inokuliert. Das Wachstum erfolgt bis zur exponentiellen Phase bei 30°C und 160rpm. Durch die Zugabe von 0,4 mM CuSO₄ x 5H₂O bei einer OD_{578nm} von 0,8-1 erfolgt die Induktion des Kupferpromotors. Die Zellen werden 3 h nach Induktion mittels Zentrifugation bei 5000 x g für 15 min. geerntet, in ZWP resuspendiert und die Zellwand durch Lytikase verdaut. Hierzu werden die Zellen mit 10U Lytikase/OD_{600nm} versetzt und bis zur vollständigen Sphäroblastierung bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgt der mechanische Aufschluss der Zellen bei 1200 bar im Microfluidzer (Cycle-Mode) und die Zellmembranen, welche das Protein enthalten, werden durch Zentrifugation (90 min., 100000 x g, 4°C) sedimentiert.

Native Aufreinigung:

Für die native Aufreinigung wird das Pellet in Puffer AN resuspendiert, mit Hilfe eines Potter-Homogenisators (Braun/Melsungen) homogenisiert und über Nacht bei RT unter Rühren inkubiert. Um das solubilisierte Protein von den Zelltrümmern zu trennen wird

es erneut zentrifugiert (100000 x g, 1h, 4°C) und der Überstand mit Hilfe einer Ni-NTA-Säule aufgereinigt. Zunächst wird die Säule mit Puffer BN äquilibriert, der Überstand aufgetragen und mit zwanzig Säulenvolumen Puffer AN und zehn Säulenvolumen Puffer BN gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgt mit Puffer CN. Um das Imidazol zu entfernen wird ein Pufferaustausch über einen 10kD-Konzentrator (Millipore, Schwalbach) bei 3000 x g (4°C) gegen Puffer AN durchgeführt.

ZWP	AN
50 mM Tris/HCl pH 8.0	50 mM Tris/HCl pH 8.0
150 mM NaCl	150 mM NaCl
0,6 M Sorbitol	0,1 mM γ -Cyclodextrin
Proteaseinhibitor	
BN	CN
50 mM Tris/HCl pH 8.0	50 mM Tris/HCl pH 8.0
150 mM NaCl	150 mM NaCl
0,1 mM γ -Cyclodextrin	0,1 mM γ -Cyclodextrin
10 mM Imidazol	200 mM Imidazol

Denaturierende Aufreinigung:

Für die denaturierende Aufreinigung wird das Pellet, welches nach Aufschluss der Zellen mittels Fluidizer die Zelltrümmer und das Protein enthält, in Solubilisierungspuffer homogenisiert und über Nacht bei RT unter Rühren inkubiert. Um das nun gelöste Protein von den Zelltrümmern zu trennen, wird die Probe 1 h bei 100000 x g zentrifugiert und der Überstand auf eine mit Puffer AD äquilibrierte Ni-NTA-Säule aufgetragen, mit Puffer BD gewaschen und das Protein durch Puffer CD eluiert.

Solubilisierungspuffer	AD
8 M GdnHCl	6 M GdnHCl
50 mM Tris/HCl pH 8.0	50 mM Tris/HCl pH 8.0
300 mM NaCl	300 mM NaCl

BD	CD
6 M GdnHCl	6 M GdnHCl
50 mM Tris/HCl pH 8.0	50 mM Tris/HCl pH 8.0
300 mM NaCl	300 mM NaCl
10 mM Imidazol	200 mM Imidazol

3.5.2.2. Kre-PrP-Gas1p

vgl. denaturierende Aufreinigung Kre-GFP-Gas1p (Kapitel 3.5.2.1)

3.5.2.3. Kre-Int^c-Gas1p

vgl. denaturierende Aufreinigung Kre-GFP-Gas1p (Kapitel 3.5.2.1)

3.5.3. Herstellung eines Proteingestamtextraktes aus Hefen

Die Herstellung eines Proteinextraktes zur Expressionskontrolle erfolgt nach der Methode von Printen und Sprague⁸⁹.

3.5.4. Faltung von PrP-GPI und PrP-Int^N

Die denaturierend aufgereinigten Proteine, welche in 6 M GdnHCl, 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl gelöst sind, werden zur Rückfaltung in einem Redoxsystem bestehend aus 5 mM GSH und 0,5 mM GSSG für 1h inkubiert. Die Entfernung der Chaotrope und des Redoxsystems erfolgt mit G25-Gelfiltrationssäulen (PD10-Säulen, GE Healthcare) durch Umpuffern in 20 mM NaOAc pH 5.5 mit 20 mM OG.

3.5.5. Endoglykosidase H Verdau

Das Enzym EndoH stammt aus *Streptomyces plicatus* und spaltet neben hochglykosylierte Mannosen (n=2-150) auch einige Oligosaccharide von N-verknüpften

Glycoproteinen. Für die Reaktion werden 1-20 µg des Glycoproteins und 1 µL 10 x Denaturierungspuffer auf ein Gesamtvolumen von 10 µL mit H₂O aufgefüllt. Das Protein wird anschließend für 10 min. bei 100°C denaturiert, bevor es durch Zugabe von 2 µL 10 x G5 Reaktionspuffer, 1-5 µL EndoH und Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µL aufgefüllt wird. Der Reaktionsmix wird für 1 – 2 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird entweder mit PMSF oder 2x SDS-Probenpuffer (vgl. 3.5.15) gestoppt und mittels Massenspektrometrie oder SDS-PAGE analysiert.

3.5.6. TEV-Protease-Verdau

Zur Proteolyse müssen die Proteine zunächst einmal gegen den TEV-Proteasepuffer dialysiert werden. Hierzu werden die denaturierend aufgereinigten Proteine zuerst bei RT gegen 8 M Harnstoffpuffer (Harnstoff, 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl) in einer Dialysekassette (Thermo Fisher, Bonn) mit einem MWCO von 2-10 kDa dialysiert und die Harnstoffkonzentration schrittweise von 8 M zu 6 M auf 4 M erniedrigt. Bei einer Konzentration von 4 M Harnstoff wird das Protein mit TEV-Protease, sowie 5 mM DTT versetzt und erneut über Nacht gegen 2 M Harnstoff, 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl und 5 mM DTT dialysiert. Anschließend erfolgt die Aufreinigung des abgespalteten Peptids mittels Cystein Covalent Capture Beads.

TEV-Proteasepuffer

50 mM Tris/HCl pH 8.0

150 mM NaCl

0,5 mM EDTA

Harnstoffpuffer

TEV-Proteasepuffer

8-2 M Harnstoff (variabel)

3.5.7. Phospholipase C Verdau

Der Phospholipase Verdau erfolgt in PBS-Puffer mit Mg²⁺ und Ca²⁺ nach den Angaben des Herstellers für 3 h bei 37°C. Der Überstand wird mittels Western Blot analysiert. Bei Reaktionen auf der Zelle, werden die Zellen vor der Lyse zwei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen, von der Kulturschale abgekratzt und in PBS-Puffer, 0,5 % Triton X-100 und 0,5 % Natriumdesoxycholat lysiert.

3.5.8. Oligomerisierung und *in vitro* Aggregation von PrP-GPI

Zur Oligomerisierung und späteren Fibrillenbildung wird das Prion Protein mittels G25-Gelfiltrationssäule (PD10-Säule, GE Healthcare) in verschiedene Puffer (A, B, C) nach Bocharova *et al.* umgepuffert⁹⁰. Die Proben werden bei 37°C 1-4 Tage inkubiert und der Fortschritt der Aggregation entweder mittels Gelfiltration (Kapitel 3.5.9), Thioflavin T-Test (Kapitel 3.5.10) oder DLS (Kapitel 3.7.1) analysiert.

Puffer A

1 M GdnHCl
3 M Harnstoff
150 mM NaCl
20 mM NaOAc pH 3.7

Puffer B

1 M GdnHCl
3 M Harnstoff
150 mM NaCl
20 mM NaOAc pH 5.5

Puffer C

1M GdnHCl
3 M Harnstoff
150 mM NaCl
PBS pH 6.8

3.5.9. Gelfiltration mittels Biosep-SEC 3000

500 µL der Probe werden mit 500 µL Laufpuffer gemischt und davon 500 µL auf einer Biosep-SEC-3000 Gelfiltrationssäule (Phenomenex, Aschaffenburg) isokratisch bei einem Fluss von 0,5 mL/min. analysiert. Die Probe wird fraktioniert gesammelt und mittels ThT-Test (Kapitel 3.5.10) oder DLS (Kapitel 3.7.1) weiter untersucht.

Laufpuffer

20 mM NaOAc pH 3.7
1 M Harnstoff
200 mM NaCl

3.5.10. Thioflavin-T-Test

ThT ist ein ursprünglich in der Histologie genutzter Thiazolfarbstoff, der durch Interaktion mit einer Reihe von Zellkomponenten zu spezifischen Färbemustern in den untersuchten Geweben in Abhängigkeit von Färbebedingungen und Gegenfärbung führt. Zu den anfärbbaren Strukturen gehören Mucopolysaccharide, Nukleinsäuren und insbesondere eine Reihe von Einschlußstrukturen amyloider Fibrillen. ThT weist durch seine Bindung an amyloide Proteinstrukturen charakteristische Änderungen seines Fluoreszenzspektrums auf. Diese zeichnen sich durch batho- und hyperchrome Verschiebung der Fluoreszenz des ThT/Amyloidkomplexes gegenüber der des freien Farbstoffs aus⁹¹.

Die Fluoreszenzmessungen erfolgen an einem Fluoreszenzspektrometer Fluoromax-3 der Firma Jobin Yvon, Horiba in einer Quarzküvette der Firma Hellma mit einer Schichtdicke von 10 mm. Alle Messungen werden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Ansatz mit folgenden Endkonzentrationen:

20 ng/ μ L Protein in H₂O + 0,1 % TFA

10 μ M ThT in H₂O

Es wird die Fluoreszenzemission bei 485 nm bei einer Anregungswellenlänge von 445 nm aufgenommen.

3.5.11. Fibrillogenese

Die solubilisierten Proteine werden in einer Konzentration von 10-100 μ M in TBS-Puffer verdünnt und für 3 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die erfolgreiche Fibrillogenese wird mit Hilfe eines ThT-Tests (Kapitel 3.5.10), sowie DLS (Kapitel 3.7.1) verifiziert.

3.5.12. Fluoreszenzmarkierung von PrP-GPI

Die Markierung des Prion-Proteins erfolgt mit Bodipy® FL N-(2-aminoethyl)maleimid (λ_{Ex} : 502nm, λ_{Em} : 510nm) und wurde von Melanie Wulff durchgeführt⁹².

Hierzu wird das native Prion Protein mit TCEP, sowie dem Markierungsreagenz nach Herstellerangaben versetzt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur bzw. für 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von β -Mercaptoethanol gestoppt und die Probe mittels PD10-Säule (G25-Sepharose) aufgereinigt.

3.5.13. Immunfluoreszenzanalysen von Hefezellen

Die Immunfluoreszenzanalysen erfolgen nach der Methode von Schröder *et al.*⁹³. Entsprechende Transformanten werden über Nacht in geeignetem Selektivmedium angezüchtet und am nächsten Morgen in frisches Medium mit einer $OD_{600\text{nm}}$ von 0.3 überführt. Die Zellen werden bis zu einer $OD_{600\text{nm}}$ von 0.8 bei 30°C, 200rpm wachsen gelassen. Die Expression wird mit 0,4 mM $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ induziert und die Zellen bis zur Ernte bei 30°C, 200 rpm inkubiert. Die Zellen werden durch Zentrifugation bei 4500 x g und 4°C geerntet, mit PBS/Sorbitol gewaschen und erneut zentrifugiert. Jeweils 5.4 $OD_{600\text{nm}}$ werden in 1 mL Fixativ resuspendiert und für 2 h bei RT inkubiert. Die fixierten Zellen werden bei 15000 rpm (Eppendorfszentrifuge RC 5100) für 5 min. abzentrifugiert. Anschließend werden die Zellen zur Entfernung des Formaldehyds dreimal mit 1 mL PBS/Sorbitol gewaschen und zum Verdau der Zellwand in 800 μL Lytikase-Puffer aufgenommen. Durch Inkubation der Suspension unter leichtem Schütteln bei 30°C werden die Zellen sphäroblastiert (Mikroskopkontrolle). Die generierten Sphäroblasten werden durch Zentrifugation bei 500 x g für 5 min. geerntet, mit 1 mL PBS/Sorbitol gewaschen (3x) und das Zellpellet in 100 μL PBS/Sorbitol aufgenommen. Es werden 25 μL der Suspension auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen (DG) aufgetragen, wobei die Beschichtung der Deckgläschen nach Angabe des Herstellers (Sigma-Aldrich, München) erfolgt, und 15 min. bis zur vollständigen Anheftung der Zellen bei RT inkubiert. Nach abgeschlossener Inkubation wird der Überstand abgenommen und die DG mit PBS/Sorbitol gewaschen. Optional wird die Zellmembran vor der eigentlichen Immunofärbung durch Inkubation mit 0,1 % Triton X-

100 in PBS/Sorbitol permeabilisiert und erneut mit PBS/Sorbitol gewaschen, um das Triton X-100 zu entfernen. Für die Immunfärbung werden die Zellen mit dem entsprechenden ersten Antikörper (eingesetzte Konzentrationen siehe Kapitel 2.6) in PBS/Sorbitol für 1h bei RT inkubiert, die Antikörperlösung abgenommen und die DG dreimal mit PBS/Sorbitol gewaschen. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper in PBS/Sorbitol, welcher fluoreszenzmarkiert ist, erfolgt ebenfalls für 1h bei RT jedoch im Dunkeln. Der Antikörper wird abgenommen, die DG 5x mit PBS/Sorbitol gewaschen und mit Fluorsave Reagent™ (Merck, Darmstadt) auf den Objektträgern fixiert. Bis zur mikroskopischen Analyse an einem konfokalen Mikroskop können die Proben bei 4°C im Dunkeln gelagert werden.

PBS/Sorbitol

140 mM NaCl
 2,7 mM KCl
 10 mM Na₂HPO₄
 1,8 mM KH₂PO₄
 10% (w/v) Sorbitol
 pH 7.2

Fixativ

PBS/Sorbitol
 3,5 % Paraformaldehyd

Lytikasepuffer

400 µL Lytikase (1000U/mL)
 28 µL BME
 1,532 mL PBS/Sorbitol

3.5.14. Darstellung von rPrP-GPI mittels Protein *trans*-Spleißen

3.5.14.1. *Trans*-Spleißreaktion von PrP-Int^N an *S. cerevisiae* *in vivo*

Die Präparation der Zellen erfolgt zunächst wie in Kapitel 3.5.13 beschrieben. Sobald die Zellen auf den Deckgläsern fixiert sind, wird das Protein mit dem N-terminalen Intein zu den Zellen gegeben. Hierzu wird das PrP-Int^N zunächst mittels PD10-Säule in 20 mM NaOAc + 20 mM OG umgefaltet (vgl. Kapitel 3.5.4) und gegebenenfalls anschließend über

Nacht bei 4°C gegen Spleißpuffer dialysiert. Die verwendeten Kontrollpeptide werden ebenfalls vor der Reaktion gegen Spleißpuffer dialysiert. Die Reaktion selbst erfolgt in Spleißpuffer oder 20 mM NaOAc pH 5.5 mit einer Proteinkonzentration von 5 µM und 2 mM DTT. Nach einer Inkubationszeit von 1h bei 37°C wird der Überstand abgenommen und die Zellen wie im Kapitel 3.5.13 beschrieben weiter behandelt.

Spleißpuffer

50 mM Tris/HCl pH 8.0

300 mM NaCl

1 mM EDTA

10 % Glycerin (v/v)

3.5.14.2. *Trans*-Spleißreaktion von PrP-Int^N an Neuroblastomazellen *in vivo*

Es werden ungefähr 50000 Zellen/Mat-Tek Zellkulturschale in Vollmedium gesplittet und bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Sobald die Zellen zu 80-90 % konfluent (meist nach 24 h) gewachsen sind, werden sie mit 1 µg Plasmid (kodiert für Int^C-Fragment) nach Herstellerangaben mit Hilfe von Lipofectamin (Invitrogen, Darmstadt) transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 24h bei 37°C und 5 % CO₂ wird das Medium entfernt und die Zellen mit DMEM oder MEM ohne FCS gewaschen. Für die *Trans*-Spleißreaktion werden 5 µM des Int^N-Proteins, welches über Nacht gegen Spleißpuffer dialysiert wurde, mit 2 mM DTT auf ein Gesamtvolumen von 300 µL mit MEM aufgefüllt, die Reaktionslösung auf die Zellen gegeben und für 30 min. bis zu 1h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Reaktionslösung wird entfernt und die Zellen zweimal mit MEM gewaschen. Für die anschließende Immunofärbung werden die Zellen mit 3 % Paraformaldehyd in PBS für 10 min. bei 37°C und 5 % CO₂ fixiert, das Fixativ entfernt und die Zellen zweimal mit MEM gewaschen. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper in PBS erfolgt für 1h bei RT. Nach Entfernung des Antikörpers werden die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen und mit dem zweiten TRITC-markierten Antikörper ebenfalls für 1h inkubiert. Die eingesetzten Konzentrationen sind in Kapitel 2.6 zu finden. Nach Entfernung des zweiten Antikörpers und Waschen der Zellen mit PBS, werden die Zellen mit 300 µL DMEM überschichtet und mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Leica SP5 TCS) analysiert.

3.5.15. SDS-PAGE

Die analytische SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) von Proteinen wird in 0,75 mm Flachgelen nach der Methode von Lämmli durchgeführt⁹⁴. Die Gele haben eine Acrylamidkonzentration im Trenngel von 15 % oder 18 % und im Sammelgel von 4 % bei einem Quervernetzungsgrad von 3% bzw. 0,8 %.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Lämmli-SDS-Gele

	Sammelgel 4%		Trenngel 15%		Trenngel 18%	
	4 Gele	2 Gele	4 Gele	2 Gele	4 Gele	2 Gele
Wasser	3,6 mL	1,8 mL	3,6 mL	1,8 mL	2,1 mL	1,05 mL
Acrylamid	0,9 mL	0,45 mL	7,5 mL	3,75 mL	9 mL	4,5 mL
Puffer	0,7 mL	0,35 mL	3,9 mL	1,95 mL	3,9 mL	1,95 mL
10% SDS	53 µL	26,5 µL	157 µL	78,5 µL	157 µL	78,5 µL
10% APS	53 µL	26,5 µL	157 µL	78,5 µL	157 µL	78,5 µL
TEMED	5,3 µL	5 µL	5µL	5 µL	5µL	5 µL

Nach der elektrophoretischen Trennung bei 40 mA wird das Gel für 10 min. mit Coomassie-BrillantBlue-Färbelösung gefärbt und anschließend über mehrere Stunden entfärbt. Die verwendeten Puffer haben folgende Zusammensetzung:

Acrylamid-Stammlösung	30 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) N,N-Methylenbisacrylamid
Trenngel-Puffer	1,5 M Tris/HCl, 0,4 % SDS, pH 8,0
Sammelgel-Puffer	0,5 M Tris/HCl, 0,4 % SDS, pH 6,8
10 % SDS	10 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) in H ₂ O
10 % APS	10 % (w/v) Ammoniumperoxidisulfat in H ₂ O
2 x Probenpuffer	0,2 M Tris/HCl, pH 6.8, 6 % SDS, 30 % Glycerin, 0,3 M BME, 0,05 % Bromphenolblau
Laufpuffer	25 mM Tris, 0,2M Glycin, 0,1 % SDS (w/v)
Färbelösung	2,5 g Coomassie Blue R-250, 500 mL Ethanol, 70 mL Essigsäure, H ₂ O ad 1000 mL
Entfärberlösung	500 mL Ethanol, 70 mL Essigsäure, H ₂ O ad 1000 mL

3.5.16. Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Die Silberfärbung der Polyacrylamidgele wird nach der Methode von Merrill *et al.* durchgeführt.⁹⁵ Hierbei bildet das Ag⁺-Ion Komplexe mit den Glu-, Asp- und Cys-Resten der Proteinseitenketten aus, welches anschließend durch alkalisches Formaldehyd zu elementarem Silber reduziert wird.

Zunächst werden die Proteine für 30 min. in Fixierlösung im Gel fixiert und anschließend für 10 min. mit Inkubationslösung behandelt. Nach dreimaligem Waschen mit ddH₂O für 5 min. wird das Gel für 10 min. in Silbernitratlösung inkubiert. Überschüssiges Silber wird durch dreimaliges Waschen mit Wasser für max. 20 sec. entfernt und das Gel anschließend bis zur deutlichen Färbung der Banden in Entwicklerlösung geschüttelt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 10 % Glycerin gestoppt.

Fixierlösung

40 % Methanol
10 % Essigsäure

Inkubationslösung

15 mL EtOH
0,1 g Na₂S₂O₃ x 5H₂O
3,4 g NaOAc

auf 50 mL mit ddH₂O auffüllen

Silbernitratlösung

0,05 g AgNO₃
30 µL 36 % Formaldehyd

auf 50 mL mit ddH₂O auffüllen

Entwicklerlösung

1 g Na₂CO₃ x 1H₂O
15 µL 36 % Formaldehyd

auf 50 mL mit ddH₂O auffüllen

3.5.17. Western Blot

Die durch SDS-PAGE getrennten Proteine werden auf eine Nitrocellulose (Schleicher& Schuell, Dassel) oder Porablot PVDF-Membran (Macherey-Nagel, Düren) mit einem Semi-Dry-Blotter (Biorad, München) für 20 min. bei 5 mA/cm² transferiert. Als Marker werden entweder der Prestained SeeBluePlus Marker (Invitrogen, Darmstadt) oder MagicMark™ XP Western Protein Standard (Invitrogen, Darmstadt) verwendet. Um freie

Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wird diese über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln in Blockierlösung inkubiert. Zur Detektion der Proteine wird die Membran mit den entsprechenden Antikörpern (Konzentration vgl. Kapitel 2.6) inkubiert. Hierzu wird der erste Antikörper in 10 mL Blockierlösung verdünnt und die Membran 1h bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wird die Membran dreimal mit TBST gewaschen, bevor der zweite Antikörper verdünnt in TBST auf die Blotmembran gegeben wird. Nach einer einstündigen Inkubation bei RT unter leichtem Schütteln wird der Blot erneut dreimal mit TBST gewaschen und mit 4 mL ECLplus Chemilumineszenzlösung (Amersham, München) für 2 min. inkubiert. Die Detektion erfolgt mit Hilfe eines Röntgenfilms (Kodak X-Omat blue oder ECL Hyperfilm), welcher zwischen 15 sec. und 30 min. belichtet wird.

Blockierlösung	TBST
50 mM Tris/HCl pH 7.2	50 mM Tris/HCl pH 7.2
150 mM NaCl	150 mM NaCl
5 % (w/v) Milchpulver	1 % (v/v) Tween-20
Anodenblotpuffer	Kathodenblotpuffer
300 mM Tris/HCl pH 8.7 - 8.8	30 mM Tris/HCl pH 8.6 - 8.7
100 mM Tricin	300 mM 6-Amino- ϵ Aminocapronsäure

3.5.18. Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Bradford-Messung

Bei der Konzentrationsbestimmung mit Hilfe des Bradford-Reagenz binden die Proteine an den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250. Bei Bindung kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nm (freier Farbstoff) zu 595 nm. Die Zunahme der Absorption ist somit ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Als Standard dient BSA.

BCA-Messung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt mit Hilfe eines BCA-Tests (Pierce Biotechnology). Im alkalischen Milieu bildet das Protein mit den in der Lösung vorhandenen Cu^{2+} -Ionen einen Komplex (Biuret-Reaktion). Die Cu^{2+} -Ionen des Komplexes werden anschließend zu Cu^+ -Ionen reduziert, die mit der Bicinchonininsäure einen violetten Farbkomplex bilden, dessen Absorption bei 562 nm detektiert werden kann. Als Standard dient BSA.

Absorption bei 280 nm: Lambert Beer'sches Gesetz

Proteine lassen sich spektrophotometrisch nachweisen, da die aromatischen Aminosäurereste bei 280 nm und die Peptidbindung bei 205 nm absorbiert. Hierzu wird der molare Extinktionskoeffizient des jeweiligen Proteins mit der von Pace et al.⁹⁶ aufgestellten Formel berechnet, der die Arbeiten von Gill und Hippel⁹⁷, sowie Edelhoch⁹⁸ zugrunde liegen:

$$\epsilon_{280} = 5500 \cdot n_{\text{Trp}} + 1490 \cdot n_{\text{Tyr}} + 125 \cdot n_{\text{Cystin}} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \quad (3)$$

Dieser Algorithmus zur Berechnung des molaren Absorptionskoeffizienten ϵ wird auch von dem Onlineprogramm ProtParam des ExPASy Proteomic Servers verwendet.

Erfolgt die Messung in Puffern, welche chaotrope Salze wie 6 M GdnHCl oder 8 M Harnstoff enthalten, ändern sich die molaren Extinktionskoeffizienten für Tyrosin, Tryptophan und Cystein geringfügig und es liegt folgende Formel zu Berechnung des molaren Absorptionskoeffizienten zugrunde:

$$\epsilon_{280} = 5450 \cdot n_{\text{Trp}} + 1265 \cdot n_{\text{Tyr}} + 125 \cdot n_{\text{Cystin}} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \quad (4)$$

3.6. Chemische Methoden

3.6.1. Covalent Capture Beads

Präparation der Covalent Capture Beads

Die Herstellung erfolgt nach der Methode von Villain *et al.*⁹⁹.

Hierzu wird Amino-PEGA-Harz (Beladung 0,41 mmol/g) eingewogen, mit DMF gewaschen und für 1 h in DMF gequollen. Anschließend erfolgt die Beladung des Harzes über Nacht durch Zugabe von Bernsteinsäureanhydrid/HOBt/DIPEA (10/10/10) in DMF.

Überschüssiges Lösungsmittel wird abfiltriert und das Harz mit DMF gewaschen. Dieser Waschschrift wird bei allen nachfolgenden Schritten beibehalten. Die Carbonylfunktion des Harzes wird durch Zugabe von 40 Äq CDI für 1 h aktiviert, gewaschen und mit 30 Äq 2-Amino-Acetaldehyd Diethylacetal in Gegenwart von 20 Äq HOBt in DMF funktionalisiert. Die Aldehydgruppen werden durch Inkubation mit TFA:H₂O (1:1) für 1h vom Acetal freigesetzt und anschließend wird das funktionalisierte Harz mit H₂O:Acetonitril (1:1) gewaschen. Bei 4°C gelagert bleiben die Beads bis zu 5 Monate stabil.

Bestimmung der Aldehydfunktionalisierung des Harzes:

Die Aldehydsubstitution wird mit Hilfe von Dansylhydrazin nach der Methode von Bing und Wenbao¹⁰⁰ bestimmt. Dazu werden 3-11 mg Beads in ein 1 mL Reaktionsgefäß eingewogen, mit 0,5 mL DMF versetzt und 30 min. unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend werden die Proben an der SpeedVac getrocknet. Dansylhydrazin (ungefähr 2:1 molares Verhältnis in Bezug auf die Harzbeladung) wird in 0,2 mL DMF:HAc (2:1) gelöst, zu den trockenen Beads gegeben und bei RT am Rotator (16 rpm) inkubiert. 20 µL des Überstandes werden abgenommen und mit DMF auf 200 µL aufgefüllt. Von dieser Lösung werden 10 µL in 2 mL DMF zur Fluoreszenzmessung verdünnt. Die Fluoreszenzmessungen erfolgen an einem Fluoreszenzspektrometer Fluoromax-3 der Firma Jobin Yvon in einer Quarzküvette der Firma Hellma mit einer

Schichtdicke von 1 cm. Alle Messungen werden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Probe wird bei 345 nm angeregt und entweder die Fluoreszenzintensität durch Bestimmung ihres Maximums bei 525 nm oder die Fluoreszenzfläche durch Peakintegration von 400-680 nm bestimmt. Als Kontrolle wird unmodifiziertes Amino-PEGA-Harz verwendet und die Aldehydbeladung (mmol/g) nach folgender Formel bestimmt:

$$C = \left[\frac{10 - M_s}{10} - \frac{\left(F_s - \frac{M_s F_c}{10} \right) (10 - k M_c)}{10 F_c} \right] C_0 / M_s \quad (5)$$

M_c : Masse der Kontrollpartikel

F_c : Fluoreszenzfläche oder Intensität bei 525 nm für die Kontrolle

M_s : Masse der Probe

F_s : Fluoreszenzfläche der Probe oder Intensität bei 525 nm

C_0 : Molare Gesamtmenge an Dansylhydrazin

k : Korrekturfaktor (für TentaHarz 0 und Polystyren Harz 0,11 bei 10 mg Partikeln)

Aufreinigung des GPI - Peptides mit N-terminalem Cystein:

Das funktionalisierte Harz wird mit 2 M Harnstoff, 50 mM Tris/HCl pH 7.8, 150 mM NaCl gewaschen und zu dem GPI-Peptid (nach dem TEV-Protease Verdau) gegeben, welches zuvor mit 10 mM TCEP versetzt worden ist. Das Volumen des Harzes beträgt ein Viertel der Peptidlösung. Hierbei werden entweder äquimolare Mengen an harzgebundenem Aldehyd und Peptid benutzt oder ein Überschuss von 2 Äquivalenten Aldehyd zu Peptid. Anschließend werden die Peptide mit dem Harz über Nacht unter leichtem Schütteln inkubiert. Verunreinigungen, ungeschnittenes Protein und die TEV-Protease werden durch dreimaliges Waschen für 10 Minuten mit 2 M Harnstoff, 50 mM Tris/HCl pH 7.8, 150 mM NaCl entfernt. Die Elution des GPI-Peptides erfolgt durch 400 mM O-Methylhydroxylamin/HCl in H₂O/CH₃CN (1:1) für 1 h unter leichtem Schütteln bei RT bzw. über Nacht.

3.6.2. Festphasensynthese des Peptids H-CGK_(NBD)GH₆OH

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Peptid wurde sowohl manuell als auch automatisiert an einem modifizierten 433 A Peptidsynthesegerät (Applied Biosystems, Darmstadt) mittels Festphasensynthese hergestellt. Dabei wird das *in situ* Neutralisations- und Aktivierungsprotokoll nach Schnölzer *et al.* verwendet¹⁰¹. Es werden Überschüsse von Boc und Fmoc geschützten Aminosäuren und Base verwendet, um hocheffiziente Kopplungen zu erreichen. Die funktionellen Seitengruppen der verwendeten Fmoc-Aminosäuren sind wie folgt geschützt: Lys(ivDde). Die funktionellen Seitenketten der verwendeten Boc-Aminosäuren sind wie folgt geschützt: Cys(Trt). Alle nicht aufgeführten Aminosäuren werden ungeschützt verwendet. Die Synthesen werden im Maßstab 0,2 oder 0,4 mmol durchgeführt. Als Reaktionsgefäße dienen Glasfritten der Porengröße 2.

Fmoc-Chemie:

Das mittels Fmoc-Strategie hergestellte Peptid wird an einem Fmoc-AS-Wang-Harz synthetisiert. Das Polystyrolharz wird vor Beginn der Synthese 60 min. in DMF gequollen. Die Entschützung des N-Terminus der ersten Aminosäure erfolgt durch Zugabe von ca. 10 mL 20 % (v/v) Piperidin in DMF für zuerst 3 min. und dann 7 min. Anschließend wird das Harz zur Entfernung des Piperidins 1 min. mit DMF gewaschen. Für einen 0,2 mmol Ansatz werden 1 mmol der entsprechenden Fmoc geschützten Aminosäure mit 2,38 Äq einer 0,5 M HBTU Lösung in DMF versetzt und 2 min. inkubiert. Anschließend werden 5 Äq DIPEA zugegeben und 1 min. inkubiert. Die aktivierte Aminosäure wird für 30 min. zum Harz gegeben. Nach jedem Kopplungsschritt wird das Harz für 1 Minute mit DMF gewaschen.

Die Kopplung des NBD-Fluoreszenzmarkers erfolgt an die Seitenkettenaminofunktion des Lysinrestes. Die ivDde-Gruppe wird durch Waschen des Harzes mit ca. 500 mL einer 1 %igen (v/v) TFA-Lösung in DCM und anschließendem Waschen mit ca. 500 mL einer 1 %igen (v/v) TFA-Lösung, die 2,5 % (v/v) TIS enthält, in DCM entfernt. Die Kopplung erfolgt durch Zugabe von 15 Äq DIPEA und anschließender Zugabe von 10 Äq NBD-Cl zum Resin. Das Harz wird 30 min. inkubiert und die N-terminalen Fmoc-Schutzgruppen werden unter den bereits beschriebenen Bedingungen abgespalten. Vor der Abspaltung des Peptids wird das Harz mit DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Peptid wird mit 5 % TIS und 2,5 % H₂O in TFA für 3 h bei RT abgespalten. Das Peptid wird

durch Zugabe von eiskaltem Diethylether gefällt und die Lösung 1 h auf Eis gekühlt. Das Rohpeptid wird abzentrifugiert und dreimal mit kaltem Diethylether gewaschen. Das Pellet wird in Wasser:Acetonitril (1:1) mit 0,1 % (v/v) TFA aufgenommen und lyophilisiert.

Die Aufreinigung des Rohpeptids erfolgt im präparativen Maßstab mittels RP-HPLC mit C4-Säulen (250 x 22 mm) bei einer Flussrate von 8 mL/min. Zur Aufreinigung wird das Peptid in einer Konzentration von 1 mg/mL in 6 M GdnHCl, 50 mM Tris/HCl pH 8.0 aufgenommen und mit einem Fluss von 6 mL/min. auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgt durch einen zweistufigen linearen Gradienten, wobei der erste Gradient von 5 % Puffer B (Acetonitril + 0,08 % TFA) bis 15 % Puffer B in Puffer A (Wasser + 0,1 % TFA) in 10 min. und der zweite Gradient von 15% B bis 65% B in A in 80 min. verläuft.

Die das Peptid enthaltenen Fraktionen werden vereinigt, lyophilisiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.6.3. Expressed Protein Ligation der Peptide

Die *Expressed Protein Ligation* wird nach unterschiedlichen Protokollen durchgeführt.

Zum einen werden native Bedingungen für die Ligation gewählt. Für die Reaktion werden äquimolare Mengen der zu ligierenden Reaktanden eingesetzt und diese über Nacht bei 16 rpm am Rollrad in 50mM Tris/HCl pH 8.0, 100 mM NaCl und 250 mM MESNA miteinander ligiert.

Bei der Ligation unter denaturierenden Bedingungen wird die Ligation des Peptids mit dem C-terminalem Thioester entweder in 8 M Harnstoff oder 6 M GdnHCl in 50 mM Tris/HCl pH 7.2, 100 mM NaCl und 5% Thiophenol durchgeführt. Die Ansätze werden für 24 h unter Argon leicht gerührt. Nach Inkubation wird die Probe mit 10 % (v/v) BME gestoppt und entweder mit einer analytischer RP-C₄-HPLC-Säule bei einem Fluss von 1 mL/min. mittels eines linearen Gradientens von 5 % Puffer B zu 95 % Puffer B in Puffer A oder mittels SDS-Page und anschließendem Western Transfer analysiert.

3.6.4. Massenspektrometrie

Für die Massenspektrometrie wird ein LC-ESI-MS der Firma Finnigan verwendet. Die Proben werden in 50 % Puffer B in Puffer A aufgenommen und injiziert. Bei Proben, welche in salzhaltigen Puffern gelöst sind, erfolgt vor der direkten Injektion ein Entsalzungsschritt mit Hilfe von C4- oder C18-Zip-Tips (Millipore, Schwalbach) nach Angaben des Herstellers. Bei der Erstellung eines LC-MS werden die Proben ohne eine vorherige Entsalzung zuerst auf eine C4-Säule injiziert.

Bei der Bestimmung der Masse mit Hilfe eines MALDI-TOF der Firma Voyager werden die Proben gegebenenfalls vorher mittels C4- oder C18-Zip Tips entsalzt. Als Matrix für die MALDI-Proben wird eine Mischung von 10 mg/mL 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) in 80 % Puffer A in Acetonitril und 5-Methoxysalicylsäure (MSA) mit einer Konzentration von 10 mg/mL in Wasser:Acetonitril (1:1) in einem Verhältnis von 9:1 verwendet. Die Aufnahme der Spektren erfolgt hierbei im Negativ-Modus.

Puffer A

Wasser

0,1 % TFA

Puffer B

Acetonitril

0,08 % TFA

3.7. Biophysikalische Methoden

3.7.1. Dynamische Lichtstreuung

Die Oligomerisierung und das Aggregationsverhalten des Prion Proteins wird mittels dynamischer Lichtstreuung an einem DynaPro System (Wyatt, Dernbach) analysiert. Hierzu werden die Proben zeitabhängig gemessen. Für die Puffer werden 10 und für die Proteine 20 Messungen akkumuliert und anschließend gemittelt. Alle Messungen werden in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 0,1 cm durchgeführt.

3.7.2. CD-Spektroskopie

Die CD-Spektren werden bei Raumtemperatur an einem J - 720 Spektrometer (Jasco, Tokio, Japan) in einer 0,1 cm Quarzküvette aufgenommen. Die Messungen werden in einem Wellenlängenbereich von 170 nm – 260 nm mit einer Scangeschwindigkeit von 50 nm/min., 1 nm Bandbreite, 100 mdeg Empfindlichkeit, 0,1 nm Auflösung und einer Zeitkonstante von 0,5 s durchgeführt. Für das Pufferspektrum werden 10 und für die Proteinproben 20 Messungen akkumuliert. Die Proteinspektren werden um das Spektrum des reinen Lösungsmittels korrigiert.

3.7.3. Fluoreszenzspektrometrie

Zur Aufnahme von Emissionsspektren in Lösung werden Quarz-Küvetten (Hellma) mit Schichtdicken von 1 cm verwendet. Alle Spektren werden an einem LS55-Spektrometer (Perkin Elmer, Rodgau) bei Raumtemperatur aufgenommen. Die Anregung erfolgt mit einer Xenon-Lampe.

4. Ergebnisse

4.1. Festphasensynthese des Peptids H-CGK_(NBD)GH₆OH

1 H-CGKGHHHHHH-OH 10

M_w = 1350 g/mol (mit K₃(NBD))

Das hier synthetisierte Peptid wird zur einfachen und schnellen Überprüfung der Cystein Covalent Capture Beads, sowie bei den durchgeführten EPL in Kontrolligationen verwendet. Es besitzt, neben einem N-terminalen Cystein, einen His-Tag zur Vereinfachung der Aufreinigung bzw. Detektion mittels Antikörpern. Zusätzlich ist es mit NBD als Fluoreszenzmarker modifiziert und ermöglicht so eine einfache Detektion zum Beispiel im Fluoreszenzscan.

Zur Synthese des kurzen NBD markierten Peptids wird ein Boc-CGKHHHHHH-Wang-PS verwendet, dessen Lysinseitengruppe mittels ivDde selektiv geschützt ist. Die ivDde-Schutzgruppe wird dabei durch dreimalige Zugabe von ca. 10 mL einer 3 %igen (v/v) Hydrazin-Lösung in DMF für je 10 min. entfernt. Für die anschließende Kopplung werden 15 Äq DIEA in DMF zum Harz gegeben und danach 10 Äq NBD-Cl in DMF hinzugefügt. Das Harz wird 30 min. inkubiert und anschließend 1 min. mit DMF gewaschen. Das Peptid wird mit 5 % (v/v) TIS und 2,5 % (v/v) H₂O in TFA vom Harz abgespalten. Die Reinigung des NBD markierten Peptids erfolgt durch C₄-RP-HPLC (250 x 22 mm) mit einem Gradienten von 5 % (v/v) Puffer B nach 70 % (v/v) Puffer B in Puffer A über 80 min. mit einer Flussrate von 10 mL/min. Hierbei wird bei den Wellenlängen 214 nm und 465 nm detektiert, wobei der NBD-Marker bei einer Wellenlänge von 465 nm sein Absorptionsmaximum besitzt.

Der Peak des Chromatogramms (Abbildung 7) bei 9.6 min. entspricht dem gereinigten NBD markierten Peptid, welches sowohl die NBD charakteristische Absorption bei 465 nm, als auch die Absorption des Peptidrückgrats bei 214 nm aufweist. Die mittels ESI-MS ermittelte Masse von 1349,7 g/mol stimmt mit der berechneten Masse von 1350 g/mol im Rahmen der Messungenauigkeiten überein. Die Ausbeute der Synthese beträgt 50 % (20 mg) bezogen auf den verwendeten Synthesemaßstab.

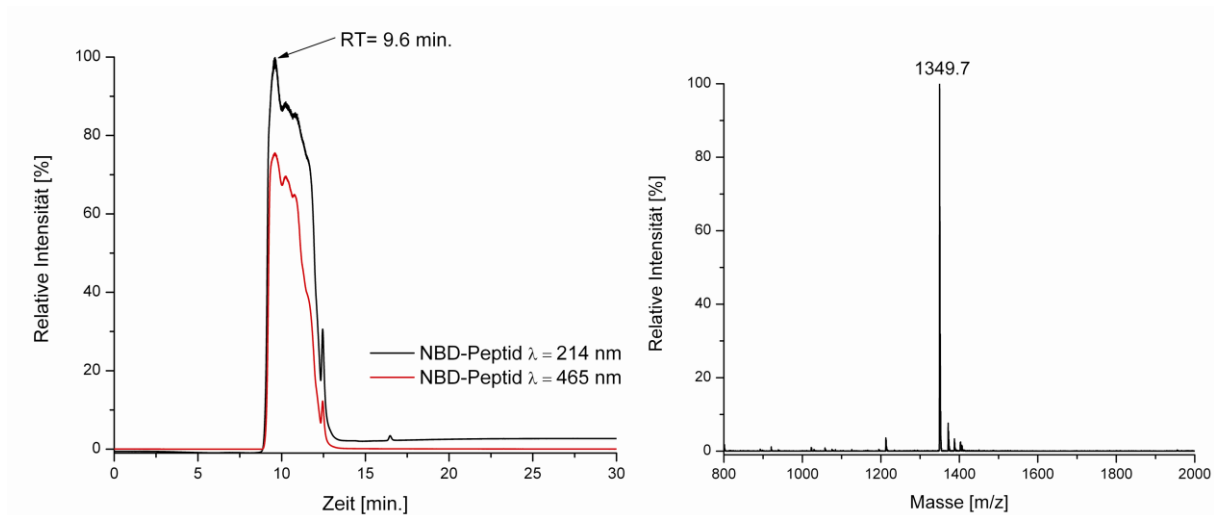


Abbildung 7: HPLC-Chromatogramm über eine analytische C4-Säule mit einem Gradienten von 5 % Puffer B nach 7 0% Puffer B in 30 min. (links). Es werden die Wellenlängen 214 nm und 465 nm detektiert. ESI-MS des aufgereinigten Peptids CGK_(NBD)GH₆ (rechts).

4.2. Herstellung der Cystein Covalent Capture Beads

Zur Herstellung der Cystein kovalent bindenden Partikel (Covalent Capture Beads: CCB) wird ein Amino-PEGA-Harz mit einer Aldehydgruppe funktionalisiert, welche in der Lage ist N-terminales Cystein kovalent zu binden. Die Beladung des Harzes wird über die kovalente Bindung von Dansylhydrazin an den Aldehyd bestimmt. Hierfür wird die Konzentrationsabnahme von Dansylhydrazin im Überstand photometrisch gemessen. Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 8 dargestellt.

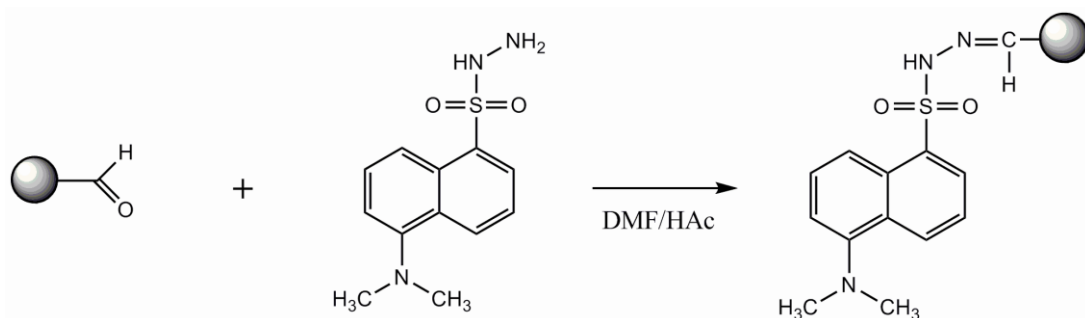


Abbildung 8: Reaktionsmechanismus der Bindung von Dansylhydrazin an die Aldehydfunktion des Harzes.

Als Kontrolle dient das unfunktionalisierte Amino-PEGA-Harz, welches ebenfalls mit dem Dansylhydrazin inkubiert wird. Die Überstände werden mit Hilfe eines Fluoreszenzspektrometers Fluoromax-3 der Firma Jobin Yvon, Horiba analysiert. Hierbei wird die Probe mit einer Wellenlänge von 345 nm angeregt und die Emission in einem Bereich von 380-700 nm detektiert. Das Spektrum ist in Abbildung 9 dargestellt. Das Lösungsmittel selbst zeigt keine Fluoreszenz (Abbildung 9, schwarz). Das unfunktionalisierte Harz kann das Dansylhydrazin nicht binden und es kommt zu keiner Abnahme der Fluoreszenzintensität im Überstand (Abbildung 9, grün). Der Überstand der Probe des funktionalisierten Harzes (Abbildung 9, rot) zeigt eine deutlich geringere Fluoreszenzintensität als der Überstand des unfunktionalisierten Harzes. Das Dansylhydrazin bindet somit an den Aldehyd und zeigt die erfolgreiche Funktionalisierung des Amino-PEGA-Harzes. Mit Hilfe der Formel 5 (Kapitel 3.6.1) wird die Aldehydbeladung des Amino-PEGA Harzes auf 50-80 % bestimmt.

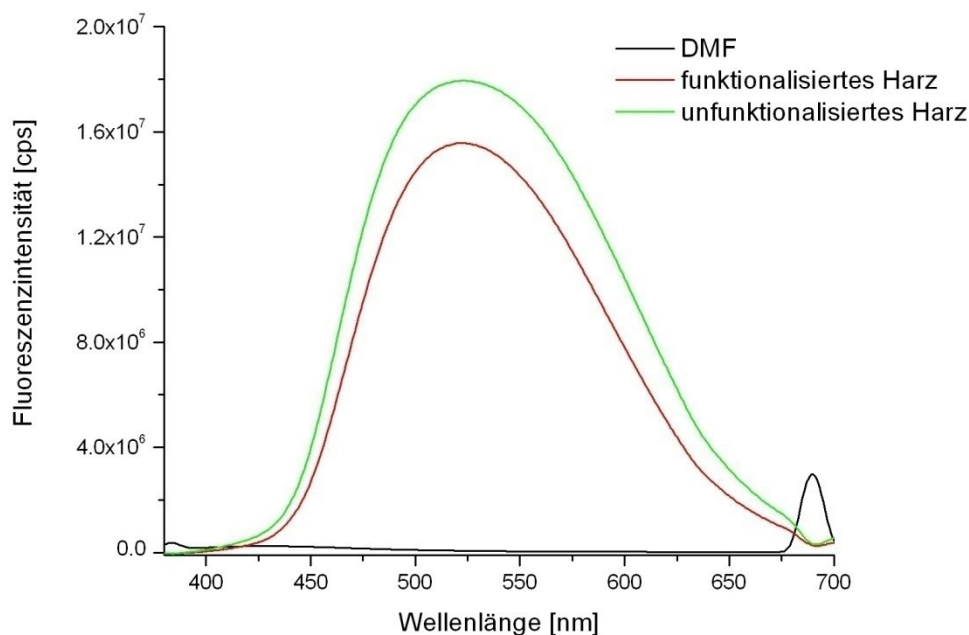


Abbildung 9: Spektrum der Fluoreszenzmessung zur Bestimmung des Funktionalisierungsgrads des Amino-PEGA Harzes mit Hilfe von Dansylhydrazin; schwarz: verwendetes Lösungsmittel DMF; rot: mit Aldehydgruppe funktionalisiertes Harz; grün: unfunktionalisiertes Amino-PEGA Harz.

Um die Funktionalität der CCB zu kontrollieren wird das zuvor synthetisierte NBD-markierte Peptid (Kapitel 3.6.2) nach der in Kapitel 3.6.1 beschriebenen Methode an die

CCB gebunden und aufgereinigt. Das Ergebnis der Bindung des Peptids und der anschließenden Aufreinigung ist in Abbildung 10 in Form eines Fluoreszenzscans (λ_{Ex} : 473 nm; λ_{Em} : 575 nm) des 18 %igen SDS-Gels dargestellt. Der Fluoreszenzscan zeigt neben dem Signal für das eingesetzte NBD-Peptid, auch ein Signal im Überstand, sowie in der Waschfraktion 1. In den nachfolgenden Waschschrritten 2 und 3 kann kein Peptid mehr detektiert werden. Anschließend wird das Peptid durch die Inkubation mit O-Methylhydroxylamin für 10 min. (Eluat 1) bzw. über Nacht (Eluat 2) von den Cystein Covalent Capture Beads eluiert, wobei beide Eluate ein deutliches Signal im Fluoreszenzscan zeigen.

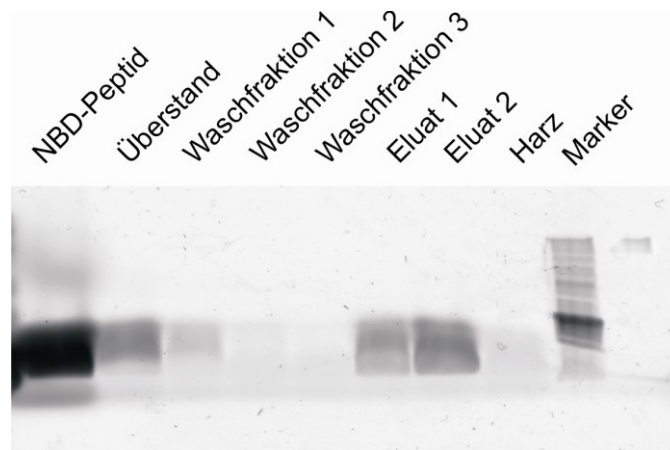


Abbildung 10: Fluoreszenzscan (λ_{Ex} : 473 nm; λ_{Em} : 575 nm) der NBD-Peptid Aufreinigung mittels Cystein Covalent Capture Beads; Marker: Low Molecular Weight Marker (Invitrogen).

Allerdings ist zu erkennen, dass die Bande des Eluats 2 eine stärkere Fluoreszenzintensität aufweist als die Bande des Eluats 1. Somit scheint die Elution des Peptids über Nacht effektiver zu sein. Um sicherzustellen, dass das gesamte Peptid mit dieser Methode vom Harz eluiert wird, wird dieses ebenfalls analysiert. Das Ergebnis des Fluoreszenzscans zeigt für das Harz lediglich ein sehr schwaches Signal. Mit Hilfe der Cystein Covalent Capture Beads können Peptide mit einem N-terminalen Cystein effektiv isoliert und aufgereinigt werden.

4.3. Isolation des GPI-Ankers aus Kre5p-GFP-Gas1p

4.3.1. Aufbau des Expressionsvektors

Zur Expression der Proteine in Hefen wird der Expressionsvektor p425Cup1 verwendet. Dieser besitzt neben einem Leucin-Selektionsmarker auch eine Ampicillinresistenz, wodurch die Selektion der geeigneten Transformanten ermöglicht wird. Die Expression des Zielproteins erfolgt durch die Induktion des Cup1-Promotors. Das Metallothionein-Gen (*CUP1*) der Hefe kodiert für ein cysteinereiches Metall-bindendes Protein, welches eine Resistenz der Zellen gegenüber Kupfer und Cadmium bewirkt.

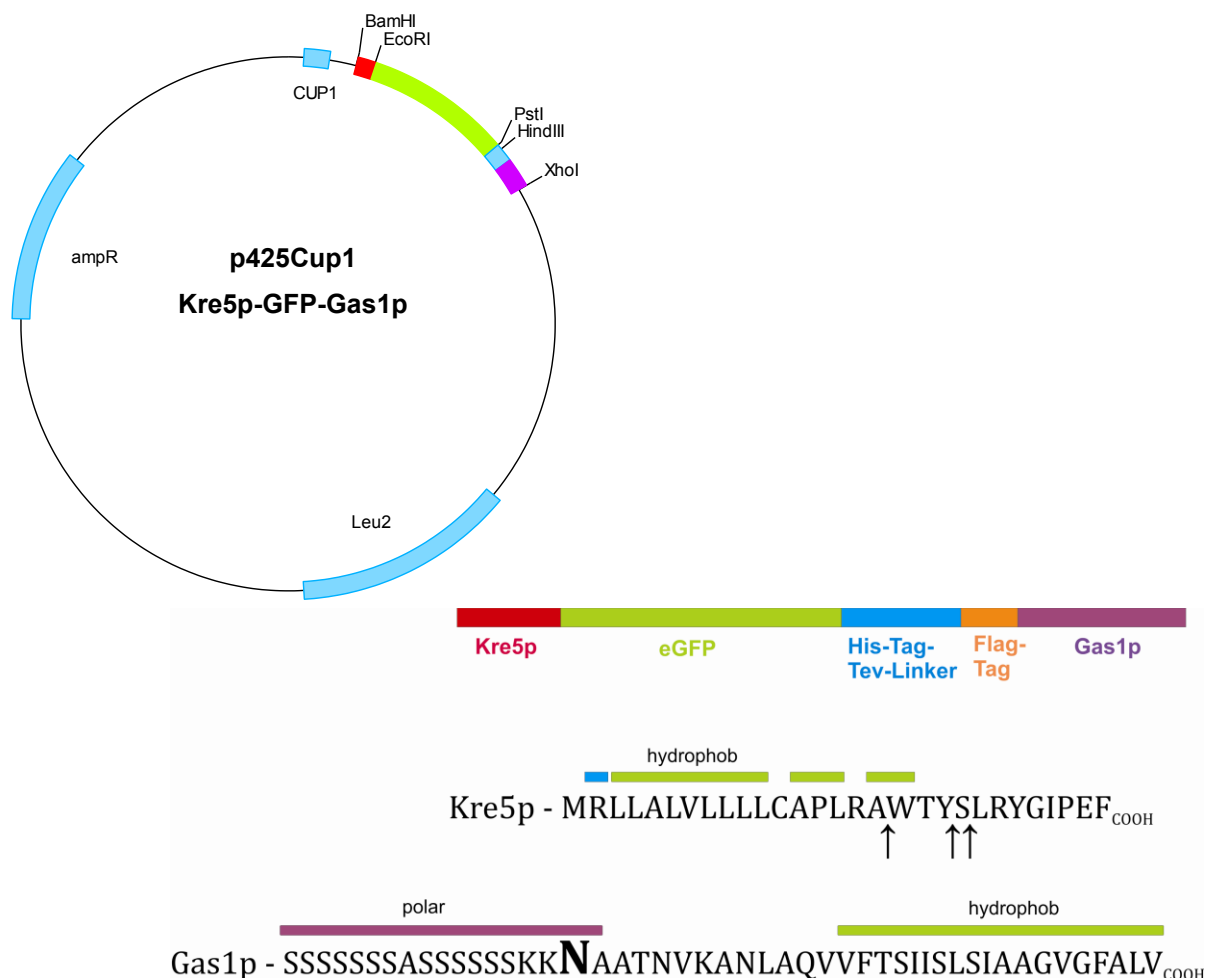


Abbildung 11: Schematische Darstellung des verwendeten Expressionsvektors und dem Zielprotein mit den verwendeten Signalsequenzen. Die Schnittstellen für die Signalpeptidase am Kre5p sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Aminosäure des Gas1p, welche mit dem GPI-Anker modifiziert wird, ist fett hervorgehoben.

Für die posttranslationale Modifikation des GFP werden noch zusätzliche Signalsequenzen benötigt, welche zum einen den Transport in das ER, sowie die anschließende Modifikation mit einem GPI-Anker ermöglichen. Hierzu werden die Signalsequenzen zweier Hefeproteine verwendet. Für den Transport des GFP in das ER wird die Signalsequenz des Kre5p, einem löslichen ER-Protein genutzt, welches für die (1→6)-β-D-Glucansynthese, sowie dem normalen Wachstum von Hefezellen verantwortlich ist. Zur posttranslationalen Modifikation des Proteins mit einem GPI-Anker wird ein Abschnitt der DNA-Sequenz (512bp – 559bp) des *GAS1*-Gens von *S. cerevisiae* verwendet. Das resultierende Genprodukt Gas1p besitzt, neben einem polaren Rest am N-Terminus, eine hydrophobe Sequenz am C-Terminus. Diese Sequenz wird während der Modifikation durch den Transamidasekomplex entfernt und der GPI-Anker auf das Asparagin übertragen. Beide Sequenzen werden durch PCR-Amplifikation aus der genomischen DNA von *S. cerevisiae* gewonnen, wobei jeweils verschiedene Restriktionsschnittstellen einkloniert werden, um die Fragmente in den p425Cup1-Vektor zu ligieren.

Als Reporterprotein wird die codon-optimierte Variante des GFP (eGFP) verwendet. Dieses aus der Hydromeduse *Aequoria victoria* isolierte Gen kodiert für ein aus 238 (eGFP240) Aminosäuren bestehendes Protein, welches mit UV-Licht angeregt, grün fluoresziert und somit leicht während der Aufreinigung und bei den anschließenden Zellexperimenten detektiert werden kann. Zusätzlich besitzt das Konstrukt noch zwei Affinitätstags (6xHis und Flag), welche sowohl für die Aufreinigung als auch für die Antikörper-Detektion genutzt werden. Eine TEV-Proteaseschnittstelle zwischen dem 6xHis-Tag und dem Flag-Tag ermöglicht die Isolation eines GPI-verankerten Peptids.

4.3.2. Expressionskinetik in *S. cerevisiae*

Der Klon p425Cup1-Kre5p-GFP-Gas1p wird in SC-Medium bei einer OD_{578nm} von 0,8 durch Zugabe von 0,4 mM $CuSO_4 \times 5H_2O$ induziert, wodurch die Biosynthese des Proteins Kre5p-GFP-Gas1p (GFP-GPI) erfolgt. Dadurch wird die Zellteilung verlangsamt und die Wachstumskurve erreicht ein Plateau. Die Wachstumskurve der induzierten Kultur, sowie einer nicht induzierten Kontroll-Kultur, sind in Abbildung 12A gezeigt.

Aus der Zellkultur werden vor der Induktion und nach der Induktion Proben genommen und nach Herstellung eines Gesamtzellextraktes mittels Harnstoff-SDS auf einem 18

%igen SDS-Polyacrylamidgel analysiert (Abbildung 12B). Im ersten Gel werden die aufgetrennten Proteine mittels Coomassie anfärbt. Die Proteine des zweiten Gels werden auf Nitrocellulose transferiert. Das immobilisierte Protein wird mit Hilfe des anti-GFP Antikörpers durch Chemilumineszenzreaktion auf der Membran nachgewiesen. In dem Coomassie gefärbten Gel sind die Proteine des Hefe-Zell-Lysates, vor Induktion (v. I.) und nach Induktion (n. I.) mit Kupfersulfat, im Massenbereich von 14 kDa bis ca. 100 kDa aufgetrennt. Das aus der DNA-Sequenz abgeleitete Molekulargewicht des Kre5p-GFP-Gas1p beträgt, je nach posttranslationaler Modifikation, ca. 36 kDa. Im Massenbereich um 36 kDa, bei dem man das Protein erwarten würde, wird das Auftreten einer neuen Proteinbande allerdings nicht beobachtet.

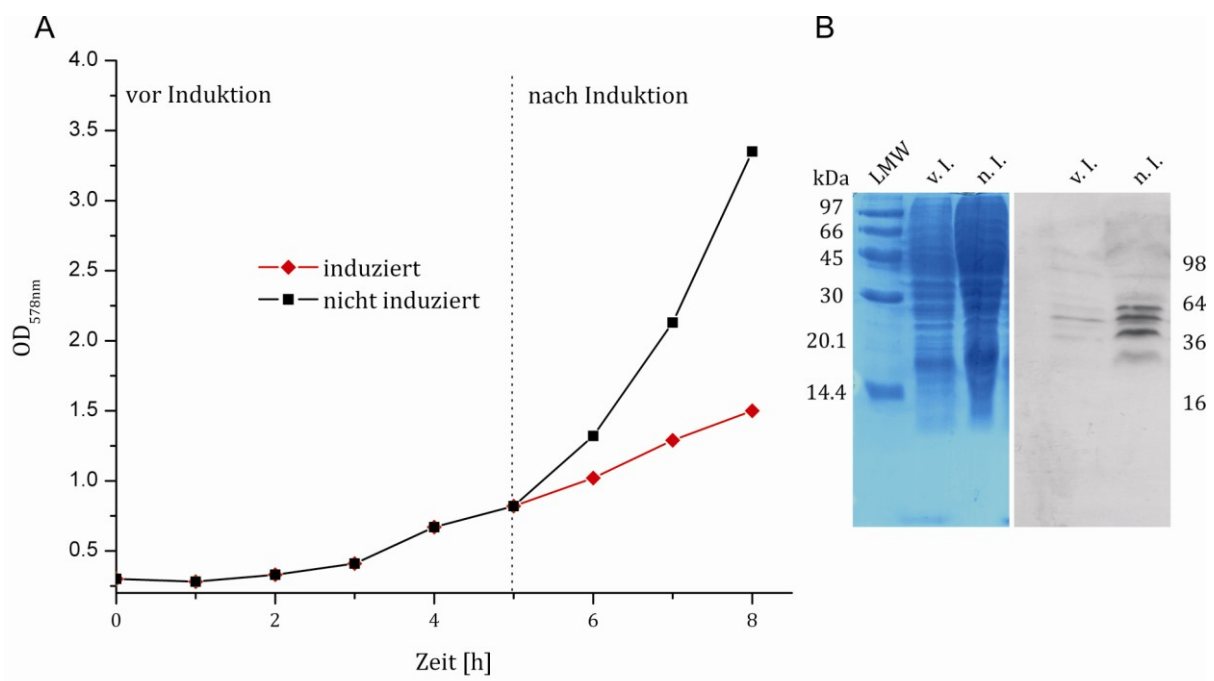


Abbildung 12: A) Wachstumskurve von *S. cerevisiae*; B) 18 %iges SDS-Polyacrylamid-Gel nach Lämmli mit Coomassie gefärbt und anschließend immunologischen Nachweis von Kre5p-GFP-Gas1p nach Western Transfer mit anti-GFP Antikörper; v. I.: vor Induktion; n. I.: nach Induktion.

Der Western-Blot zeigt in der nicht induzierten Probe schwache Banden in einem Massenbereich um 36 kDa. Hierbei handelt es sich um eine geringe Basalexpression des Kupferpromotors. Nach Induktion der Kultur mit 0,4 mM $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ kann das exprimierte Protein in mehreren Banden immunologisch nachgewiesen werden. Bei einem Molekulargewicht von ca. 36 kDa handelt es sich um das monomere GFP-GPI. Die Banden mit einem Molekulargewicht bei 70 kDa können dem Dimer zugeordnet werden.

Bei den schwachen Banden mit ca. 100 kDa handelt es sich vermutlich um eine unspezifische Reaktion des Antikörpers mit hefeeigenen Proteinen.

4.3.3. Proteinaufreinigung

Die Aufreinigung des GFP-GPI erfolgt wie in Kapitel 3.5.2.1 beschrieben. Hierzu werden zunächst die Zellwände der Hefen mit Lytikase verdaut und anschließend die Zellen mittels Mikrofluidizer aufgeschlossen. Danach folgt die Isolation des GPI-verankerten Proteins aus der Zellmembran durch Solubilisierung in einem Puffer mit γ -Cyclodextrin und Triton X-100. Hierbei wird das Protein nativ aus der Zelle isoliert und kann aufgrund seines 6xHis-Tags über eine Ni-NTA-Säule von den übrigen Hefe-Proteinen abgetrennt werden. Die Effizienz der einzelnen Reinigungsschritte wird mit Hilfe von Polyacrylamidgelen nach Lämmli⁹⁴ und anschließendem Western-Blot auf Nitrocellulose mittels anti-GFP Antikörper analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 13 dargestellt. Zum besseren Vergleich sind zwei verschiedene Marker, ein LMW-Marker (LMW) und ein Prestained Marker (PSM), aufgetragen.

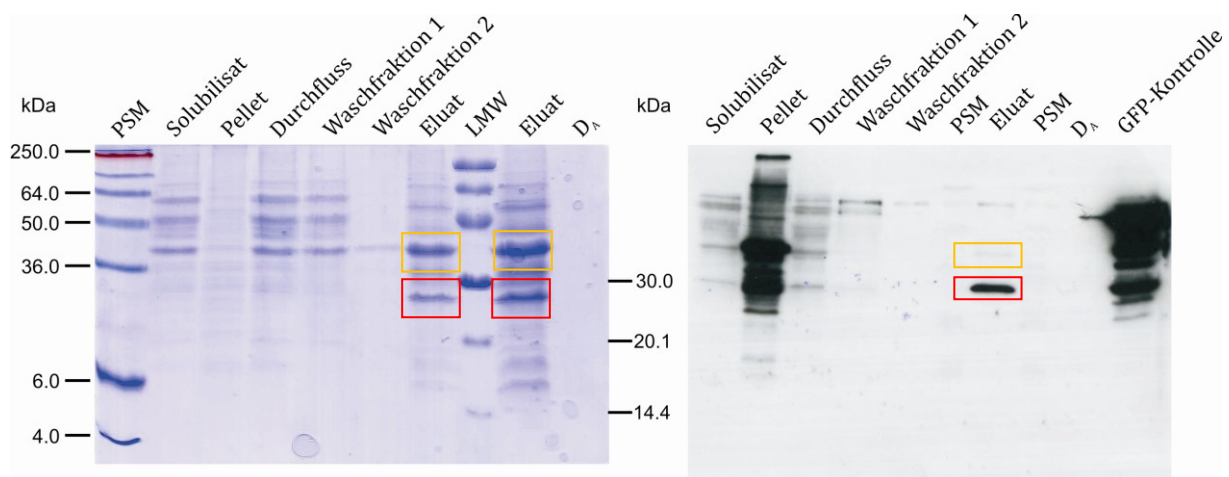


Abbildung 13: 18 %iges SDS-Polyacrylamidgel der nativen Aufreinigung von GFP-GPI (links) und das Ergebnis der anschließenden WB-Analyse mit anti-GFP-Antikörper (rechts). PSM: Prestained Marker (Invitrogen); LMW: Low Molecular Weight Marker (Invitrogen); DA: Durchfluss während des Ankonzentrierens.

Nach der Solubilisierung der Plasmamembran und anschließender Zentrifugation befindet sich das GFP-GPI im Überstand. Dieser ist auf dem SDS-Gel (Abbildung 13) in

der Spur 1 (Solubilisat) aufgetragen. Man erkennt drei deutliche Banden, welche Molekulargewichte von 36 – 64 kDa aufweisen. Diese Banden sind nach Auftrag des Proteins auf die Ni-NTA-Säule im Durchfluss wiederzufinden. In der Pelletfraktion sind diese Banden nicht zu erkennen. Hier werden lediglich mehrere schwache Banden detektiert. Im weiteren Verlauf der Aufreinigung werden die unspezifisch an die Ni-NTA-Säule gebundenen Proteine durch Waschen der Säule mit verschiedenen Puffern entfernt (Waschfraktion 1 und 2). Die Elution des Proteins erfolgt mit 250 mM Imidazol. Das Protein wird anschließend mittels eines Konzentrators mit einem MWCO von 10 kDa ankonzentriert. Das ankonzentrierte Eluat sowie der Durchfluss des Ankonzentrierens (D_A) werden ebenfalls auf dem Gel analysiert. Es sind zwei Banden mit einem Molekulargewicht von ungefähr 36 kDa (orange) und 26 kDa (rot) zu erkennen, die in etwa die gleiche Intensität aufweisen. Das GPI-verankerte GFP hat ein berechnetes Molekulargewicht von ca. 36 kDa, welches abhängig von der GPI-Anker-Modifikation und der Spaltungsstelle der Signalpeptidase ist.

Anhand der nachfolgenden Western-Blot-Analyse soll überprüft werden, ob es sich bei den durch Coomassie detektierten Banden um das Zielprotein handelt. Das Ergebnis ist in Abbildung 13 (rechts) zu sehen. Im Solubilisat sind mehrere schwache Banden zu erkennen, die darauf schließen lassen, dass die Solubilisierung des Proteins durch γ -Cyclodextrin und Triton X-100 möglich war. Mit Hilfe des WB ist deutlich zu erkennen, dass während des Auftrags des Proteins auf die Ni-NTA-Säule ein Teil ungebunden die Säule passiert (Durchfluss), bei den nachfolgenden Waschschrritten aber kein weiteres Protein von der Säule gewaschen wird (Waschfraktion 1 und 2). Mittels anti-GFP Antikörper kann das GFP-GPI im Eluat der Ni-NTA-Säule nachgewiesen werden. Allerdings ist die Intensität der Bande bei 36 kDa (orange) sehr viel schwächer als bei 24 kDa, obwohl beide Banden auf dem Coomassie-Gel die gleiche Intensität aufweisen. Deutlich erkennbar ist, dass sich immer noch sehr viel Protein in der Zellmembran befindet (Pellet) und mit der bisher angewendeten Solubilisierungsmethode nicht vollständig isoliert werden konnte. Es werden mehrere Banden mit dem anti-GFP Antikörper in der Pelletfraktion detektiert. Sowohl die Bande bei 24 kDa als auch die Bande bei 36 kDa sind deutlich zu erkennen. Daher wird das Pellet der nativen Aufreinigung erneut solubilisiert, jedoch erfolgt dieser Schritt nun unter Zuhilfenahme von chaotropen Salzen in Form von GdnHCl. Das Pellet wird über Nacht bei RT in GdnHCl-Puffer solubilisiert und nach anschließender Zentrifugation erneut mit Hilfe einer Ni-NTA-Säule aufgereinigt. Das Ergebnis der Polyacrylamidgel- und Western-Blot

Analyse dieser Aufreinigung ist in Abbildung 14 zu sehen. Da GdnHCl die Elektrophorese stört, werden die Proben vor Beladung des Gels mittels TCA gefällt. Anhand des Coomassie-gefärbten Gels sind, außer im Eluat und bei der GFP-Kontrolle, keine klaren Banden zu erkennen. Das Eluat zeigt neben einer Bande bei ca. 36 kDa, ein ausgeprägtes Bandenmuster bestehend aus drei Banden mit einer Masse von 15-18 kDa. Mit Hilfe des Western Blots können mehrere Banden im Eluat mit Hilfe des anti-GFP-Antikörpers detektiert werden. Die intensivste Bande hat dabei eine Masse von 36 kDa, wobei auch die Banden im Bereich von 15-18 kDa mit dem anti-GFP Antikörper nachgewiesen werden. Es ist deutlich zu erkennen, dass kaum noch Protein in der Zellmembranfraktion (Pellet) nachgewiesen werden kann. Mit Hilfe der denaturierenden Methode ist es somit möglich, den größten Anteil des Proteins zu solubilisieren. (Abbildung 14, rechts).

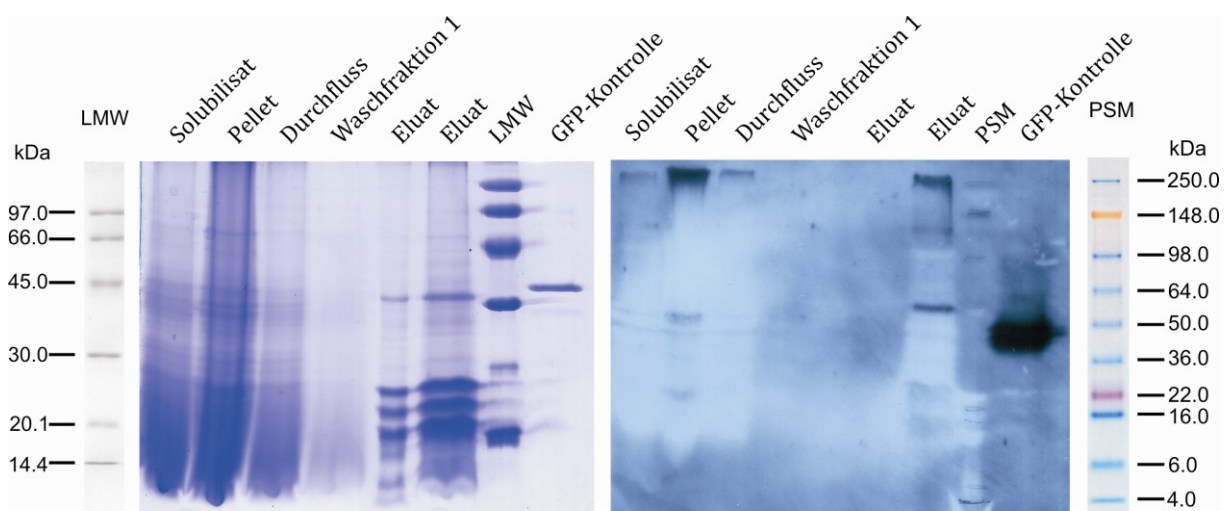


Abbildung 14: 18 %iges SDS-Polyacrylamid. Links: Coomassie-gefärbt; Rechts: Immunologischer Nachweis von GFP-GPI nach Western-Transfer mit anti-GFP-Antikörper; die dargestellten Marker sind nicht maßstabsgetreu und dienen nur der Orientierung. LMW: Low Molecular Weight Marker (Invitrogen); PSM: Prestained Marker (Invitrogen).

Die Proteinausbeute wird im Falle der nativen Aufreinigung anhand der spezifischen Chromophor-Absorption bei 488 nm mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes bestimmt. Bei einem Zellkulturansatz von 9 L können aus der solubilisierten Zellmembran mit Hilfe von γ -Cyclodextrin und Triton X-100 im Durchschnitt 0,3 mg GFP-GPI gewonnen werden ($\epsilon = 42000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)¹⁰².

Bei dem Protein der denaturierenden Aufreinigung wird die Proteinausbeute ebenfalls photometrisch bestimmt. Hierzu wird der molare Extinktionskoeffizient bei 280 nm mit $33475 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ verwendet. Allerdings wird der Wert aufgrund der geringen Reinheit der Probe nicht zur Quantifizierung verwendet. Er dient in Kombination mit einer Konzentrationsabschätzung mittels SDS-Polyacrylamidgel lediglich als Anhaltspunkt für weitere Experimente.

4.3.4. Charakterisierung der GPI-Verankerung des GFP

Nachdem das GFP-GPI mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt wurde, soll die posttranslationale Modifikation des Proteins weiter untersucht werden. Dazu wird das Eluat der Aufreinigung mittels ESI-MS charakterisiert. Das Spektrum ist in Abbildung 15 dargestellt. Die Berechnung der Massen wird mit dem Programm MagTran durchgeführt.

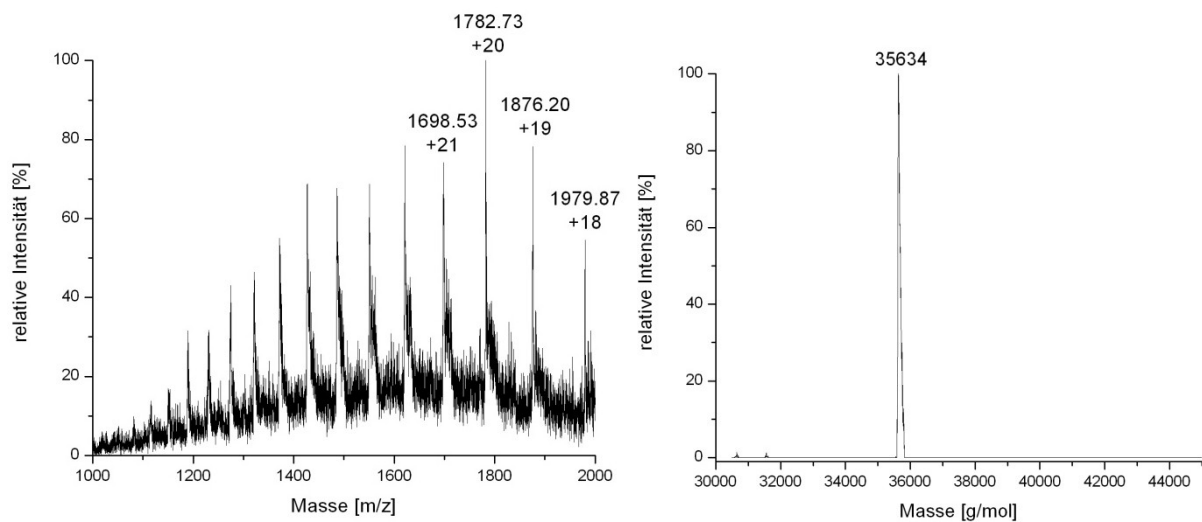


Abbildung 15: ESI-MS-Spektrum von GFP-GPI mit der mittels MagTran berechneten Masse.

In dem Massenspektrum treten die Ladungszustände von 31 bis 18 positiven Ladungen pro Molekül auf, wobei in der Abbildung 15 nur die Ladungszustände von 21-18 positiven Ladungen pro Molekül exemplarisch angegeben sind. Nach Dekonvolution ergibt sich eine Masse von 35634 g/mol, welche mit der berechneten Masse von 35616,5 g/mol annähernd übereinstimmt.

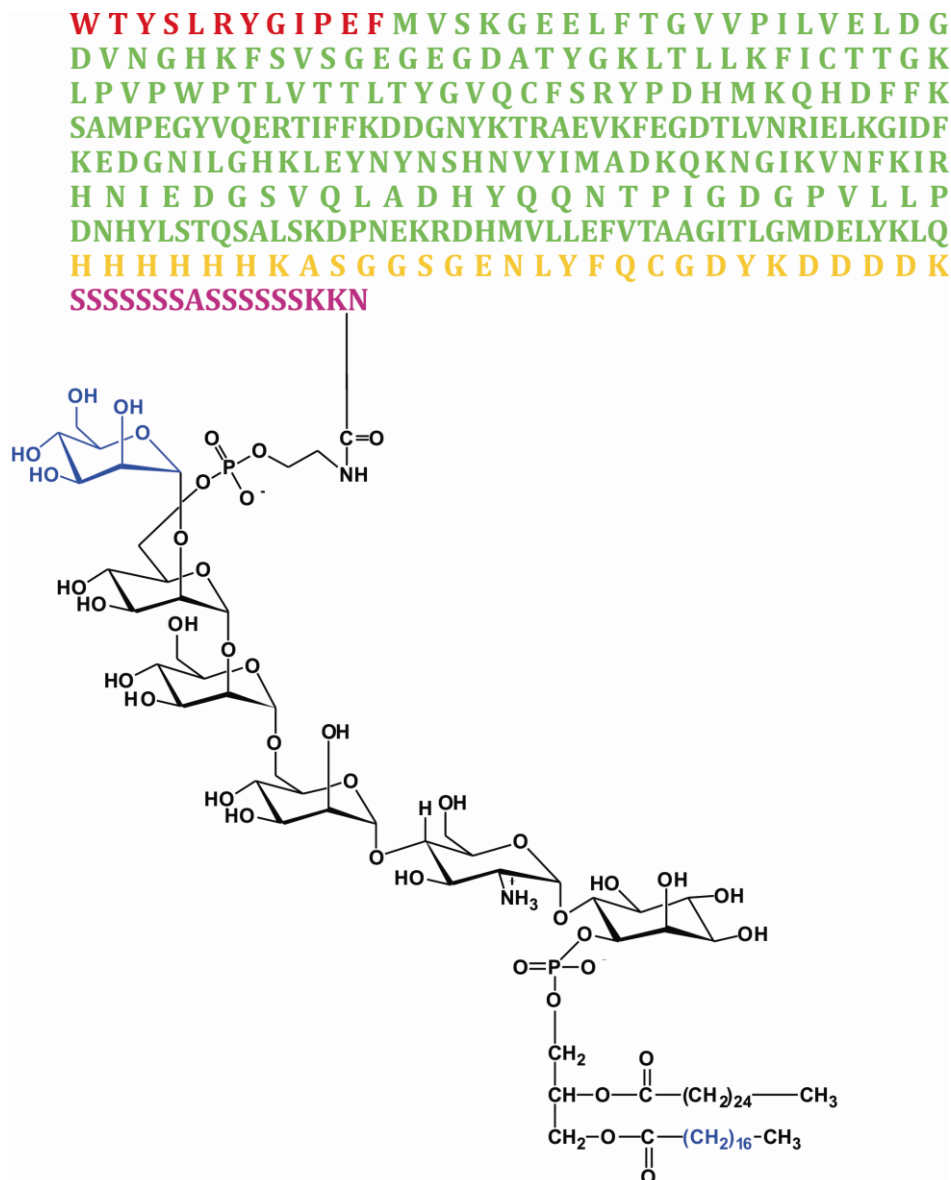


Abbildung 16: Aminosäuresequenz des GFP mit dem mittels ESI-MS bestimmten GPI-Anker. Die Kre5p-Sequenz ist in rot, das GFP in grün und das Gas1p in lila dargestellt. His- und Flag-Tag, sowie die TEV-Proteaseschnittstelle sind gelb hervorgehoben.

Die Aminosäuresequenz und die Struktur des GPI-Ankers, welche der Berechnung der Masse zugrunde liegen, sind in Abbildung 16 dargestellt. Während der posttranslationalen Modifikation im ER wird die Signalsequenz des Kre5p (rot) durch Signalpeptidasen gespalten. Hierbei gibt es drei mögliche Spaltungsstellen, wobei die Signalsequenz (vgl. Abbildung 11) direkt vor dem Tryptophan gespalten wird. Die GPI-Anker-Modifikationsstelle wird mit Hilfe des big PI Predictor (ExPASy) bestimmt. Der GPI-Anker wird auf das Asparagin des Gas1p (lila) übertragen, nachdem die Sequenz durch den Transamidasekomplex modifiziert wurde. Der GPI-Anker besitzt neben der

Kernstruktur, bestehend aus Phosphoinositol und drei Mannoseresten, eine zusätzliche Mannose. Die Verankerung des Proteins in der Zellmembran erfolgt über Diacylglycerin, welches aus einer C24- und einer C16- Fettsäure besteht.

4.3.5. Proteolyse mit TEV-Protease

Die Isolation des GPI-verankerten Peptides mit einem N-terminalem Cystein wird durch die Spaltung des Konstrukts mit Hilfe der TEV-Protease erreicht (Abbildung 17).

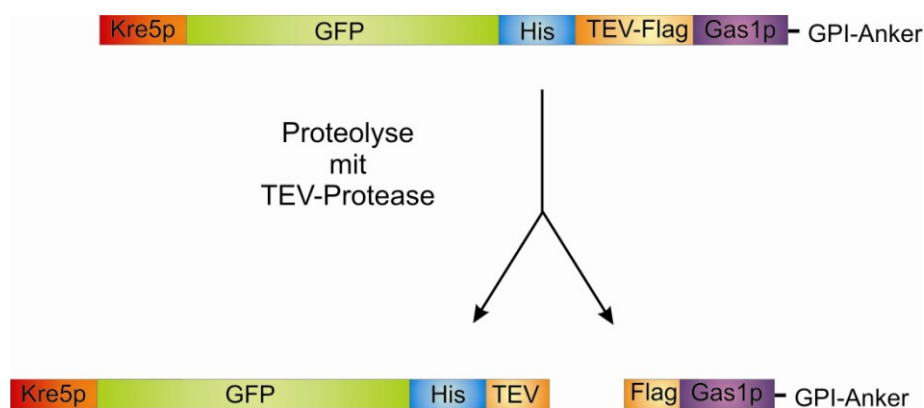


Abbildung 17: Strategie des TEV-Protease-Verbaus des GFP-GPI.

Hierzu wird das Protein direkt nach der Ni-NTA-Aufreinigung mit TEV-Protease im Verhältnis TEV-Protease zu Protein von 1:50 (w/w), sowie 5 mM DTT versetzt und über Nacht inkubiert. Dabei wird die Reaktion unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Neben verschiedenen Inkubationstemperaturen (30°C und RT) werden auch verschiedene Puffer eingesetzt, um einen Einfluss des Cyclodextrins auf die Proteolyse auszuschließen. Zusätzlich wird eine Testreaktion mit einem Kontrollpeptid als Positivkontrolle durchgeführt. Die Spaltung des Proteins wird mittels 15 %igem Lämmli-Gel detektiert. In Abbildung 18 ist das Ergebnis des TEV-Protease-Verbaus bei RT unter verschiedenen Pufferbedingungen dargestellt. Das Eluat der Ni-NTA-Aufreinigung ohne Zusatz der TEV-Protease ist in den Spuren 1 und 2 in unterschiedlichen Konzentrationen aufgetragen. In Spur 4 ist eine Probe der Reaktion in Cyclodextrin-haltigem Puffer und in Spur 5 in TE-Puffer geladen. In allen Proben sind schwache Banden bei 36 kDa zu erkennen, welche dem Molekulargewicht des monomeren GFP-GPI entsprechen. Nach dem Verdau des Proteins mit TEV-Protease

kann eine weitere schwache Bande bei ungefähr 30 kDa detektiert werden, welche dem geschnittenen GFP-GPI mit einem Molekulargewicht von 30 kDa entspricht.

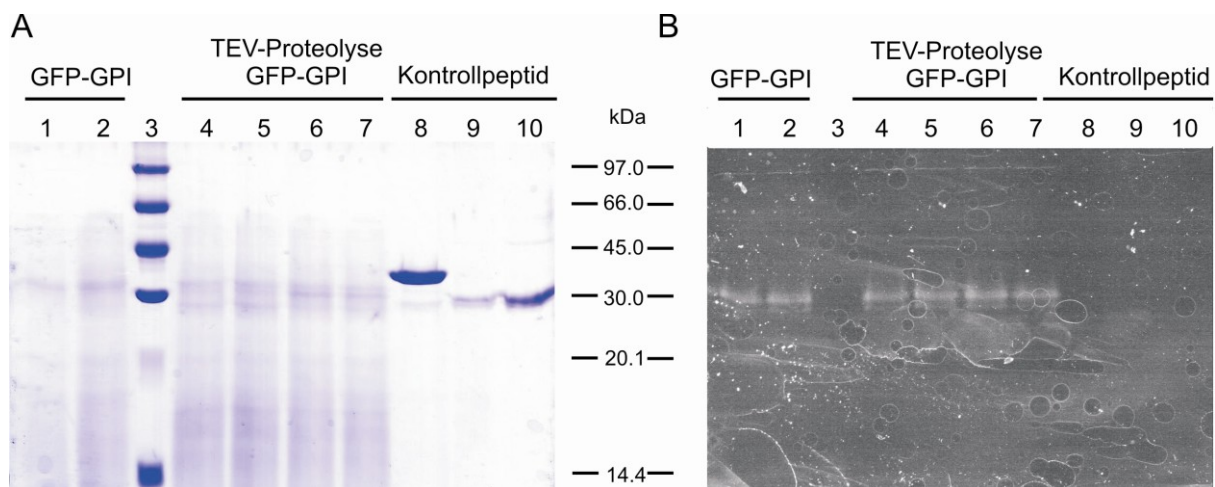


Abbildung 18: TEV-Protease-Verdau bei Raumtemperatur A) 15 %iges SDS-Polyacrylamid-Gel nach Lämmli mit Coomassie gefärbt; B) Fluoreszenzscan des Gels; Spur 1 und 2: Eluat GFP-GPI; Spur 3: LMW-Marker; Spur 4: Reaktion in Puffer mit Cyclodextrin; Spur 5: Reaktion in TE-Puffer; Spur 6: Reaktion in TE-Puffer mit dialysiertem Protein, Spur 7: Reaktion in Puffer mit Cyclodextrin mit dialysiertem Protein; Spur 8: Eluat Kontrollprotein; Spur 9: Reaktion in TE-Puffer; Spur 10: Reaktion in Puffer mit Cyclodextrin.

Bei Betrachtung der korrespondierenden Banden im Fluoreszenzscan (Abbildung 18B), ist die Fluoreszenz des eingesetzten Proteins (Spur 1 und 2) deutlich zu erkennen. Bei den Banden des TEV-Protease-Verdaus (Spur 4 und 5) ist lediglich die Bande des eingesetzten Proteins sichtbar. Die fluoreszierende Bande für das geschnittene Protein ist nicht zu detektieren. Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der Bande bei 30 kDa, welche in Spur 4 und 5 zu detektieren ist, nicht um das geschnittene Protein, sondern um die TEV-Protease handelt, welche ein Molekulargewicht von ca. 27 kDa besitzt. In den vorangegangenen Reaktionen (Spur 4 und 5) enthalten die Proben noch das während der Ni-NTA-Säule verwendete Imidazol. Um einen Einfluss des Imidazols auf die Proteolyse auszuschließen, werden die Proben in einem nächsten Schritt zunächst gegen den entsprechenden Puffer dialysiert, bevor sie in der Proteolyse-Reaktion verwendet werden. Das Ergebnis ist in Abbildung 18 Spur 6 (Reaktion in TE-Puffer) und Spur 7 (Reaktion in Puffer mit Cyclodextrin) dargestellt. Auch hier ist eine deutliche Bande bei 30 kDa zu detektieren, jedoch zeigt der Fluoreszenzscan, dass es sich hierbei nicht um das geschnittene GFP-GPI handelt. Um zu überprüfen, ob die TEV-Protease immer noch ihre katalytische Aktivität besitzt, wird

eine Testreaktion mit einem Kontrollpeptid in den verschiedenen Puffern durchgeführt. Das eingesetzte Eluat zeigt auf dem Coomassie gefärbtem Gel eine Bande bei ca. 33 kDa, welches mit dem berechneten Molekulargewicht des Proteins von 32,7 kDa übereinstimmt (Spur 8). Anschließend wird das Protein mit Hilfe der TEV-Protease katalytisch gespalten, wobei die Reaktion einmal in TE-Puffer (Spur 9) und einmal in Puffer mit Cyclodextrin (Spur 10) durchgeführt wird. Bei der Reaktion wird das Protein in zwei Fragmente mit einem Molekulargewicht von 5 kDa und 27 kDa gespalten, wobei das 5 kDa-große Peptid aufgrund seiner Aminosäuresequenz mittels Coomassie nicht nachweisbar ist.

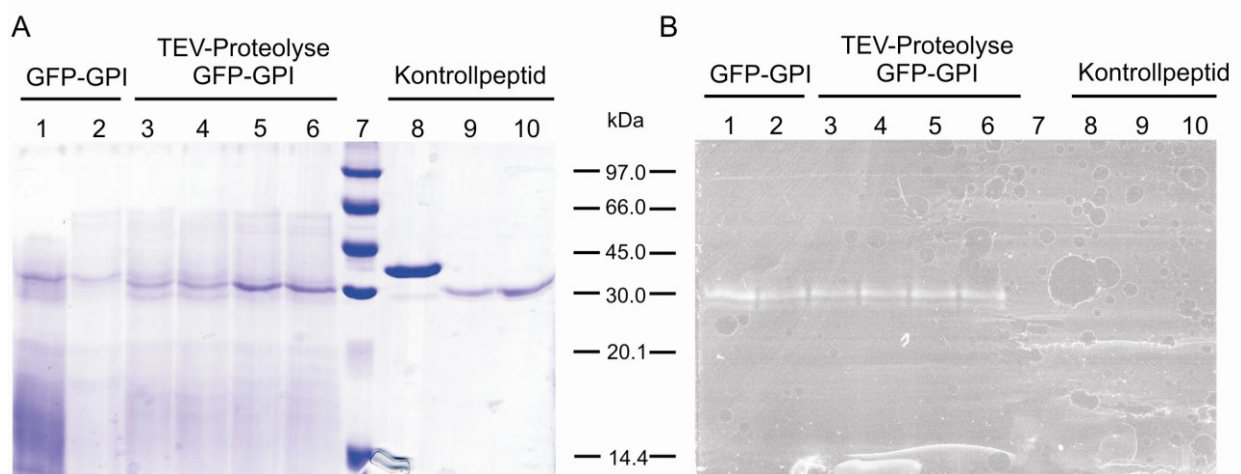


Abbildung 19: TEV-Protease-Verdau bei 30°C ; A) 15 %iges SDS-Polyacrylamid-Gel nach Lämmli mit Coomassie gefärbt; B) Fluoreszenzscan des Gels; Spur 1 und 2: Eluat GFP-GPI; Spur 3: Reaktion in Puffer mit Cyclodextrin; Spur 4: Reaktion in TE-Puffer; Spur 5: Reaktion in TE-Puffer mit dialysiertem Protein, Spur 6: Reaktion in Puffer mit Cyclodextrin mit dialysiertem Protein; Spur 7: LMW-Marker; Spur 8: Eluat Kontrollprotein; Spur 9: Reaktion in TE-Puffer; Spur 10: Reaktion in Puffer mit Cyclodextrin.

Da das Kontrollpeptid keine Fluoreszenzaktivität besitzt, ist es auf dem Fluoreszenzscan nicht zu detektieren. Trotzdem zeigen die Ergebnisse, dass die TEV-Protease in beiden Puffersystemen katalytische Aktivität besitzt. Um die Reaktion weiter zu optimieren, werden die Reaktionen im Temperaturoptimum der TEV-Protease bei 30°C durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt.

Bei dem eingesetzten Protein GFP-GPI erkennt man sowohl im Coomassie gefärbten Gel (Abbildung 19A) als auch im Fluoreszenzscan (Abbildung 19B) eine Bande bei ca. 33 kDa, welche mit dem berechneten Molekulargewicht des GFP-GPI mit 32,7 kDa übereinstimmt. Betrachtet man nun die Reaktionen bei den verschiedenen

Pufferbedingungen, so detektiert man sowohl bei dem nicht dialysierten Protein in TE-Puffer (Spur 4) oder Puffer mit Cyclodextrin (Spur 3), als auch beim zuvor dialysiertem Protein in TE-Puffer (Spur 5) oder Puffer mit Cyclodextrin (Spur 6) eine neu entstandene Bande bei 30 kDa. Allerdings kann dieses Ergebnis nicht anhand des Fluoreszenzscans verifiziert werden, da es hierbei nicht zur Entstehung einer neuen fluoreszenzmarkierten Bande bei einem Molekulargewicht von 30 kDa kommt. Somit kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der auf dem Coomassie gefärbten Gel detektierten Bande nicht um das geschnittene GFP-GPI handelt. Um allerdings auszuschließen, dass das GFP-GPI durch die Proteolyse seine Fluoreszenz verliert und deshalb im Fluoreszenzscan nicht mehr nachweisbar ist, wird ein Western Transfer auf NC-Membran durchgeführt.

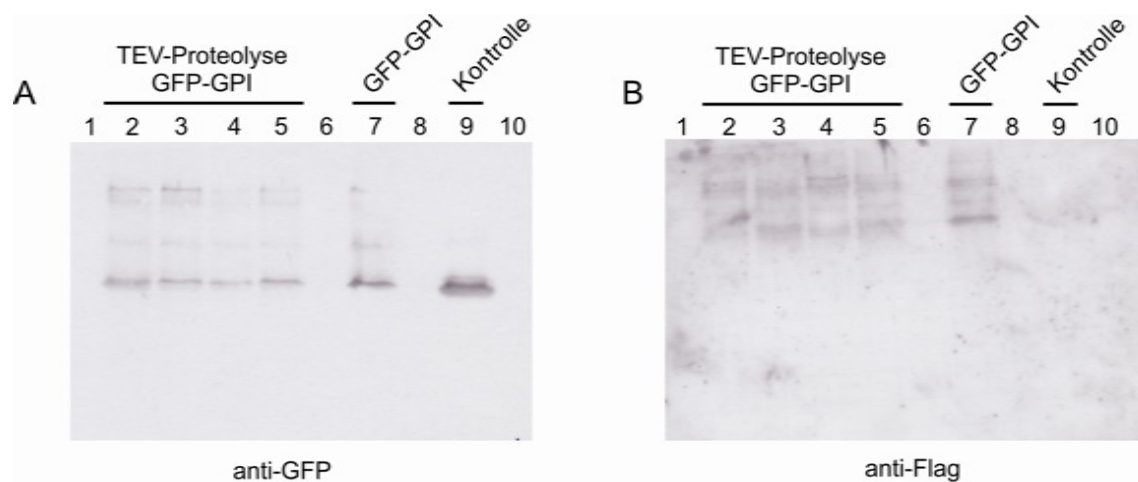


Abbildung 20: Immunologischer Nachweis von GFP-GPI ohne vorheriger Dialyse nach TEV-Protease-Verdau mittels Western Blot; A) anti-GFP Antikörper; B) anti-Flag Antikörper; Spur 1: frei; Spur 2: Reaktion in Puffer mit Cyclodextrin bei 30°C; Spur 3: Reaktion in Puffer mit Cyclodextrin bei RT; Spur 4: Reaktion in TE-Puffer bei 30°C; Spur 5: Reaktion in TE-Puffer bei RT; Spur 6: PSM; Spur 7: Eluat GFP-GPI; Spur 8: frei; Spur 9: Kontrolle GFP oder Flag-Peptid; Spur 10: frei.

Das immobilisierte GFP-GPI wird mit Hilfe von anti-GFP und anti-Flag Antikörpern durch eine Chemilumineszenzreaktion auf der Membran nachgewiesen.

Mit Hilfe des immunologischen Nachweises des GFP-GPI, dargestellt in Abbildung 20 und Abbildung 21, nach Proteolyse mit TEV-Protease können keine Unterschiede bezüglich vorheriger Dialyse oder Reaktionstemperatur festgestellt werden. Mit beiden Antikörpern können Banden in einem Massenbereich von 30 bis 100 kDa detektiert werden. Hierbei handelt es sich, neben dem monomeren GFP-GPI mit einem

Molekulargewicht von 36 kDa, um das GFP-GPI-Dimer (70 kDa), sowie um Multimere (100 kDa). Vergleicht man das Bandenmuster des eingesetzten GFP-GPI (Abbildung 20, Spur 7 und Abbildung 21, Spur 8) mit den Reaktionsansätzen, so ist keine Proteolyse des Proteins erkennbar. Bei erfolgreicher Proteolyse kommt es zu einer Verschiebung der Proteinbande von 36 kDa zu 30 kDa. Bei Verwendung des anti-GFP Antikörpers Massenbereich ist keine Bande in diesem Bereich detektierbar.

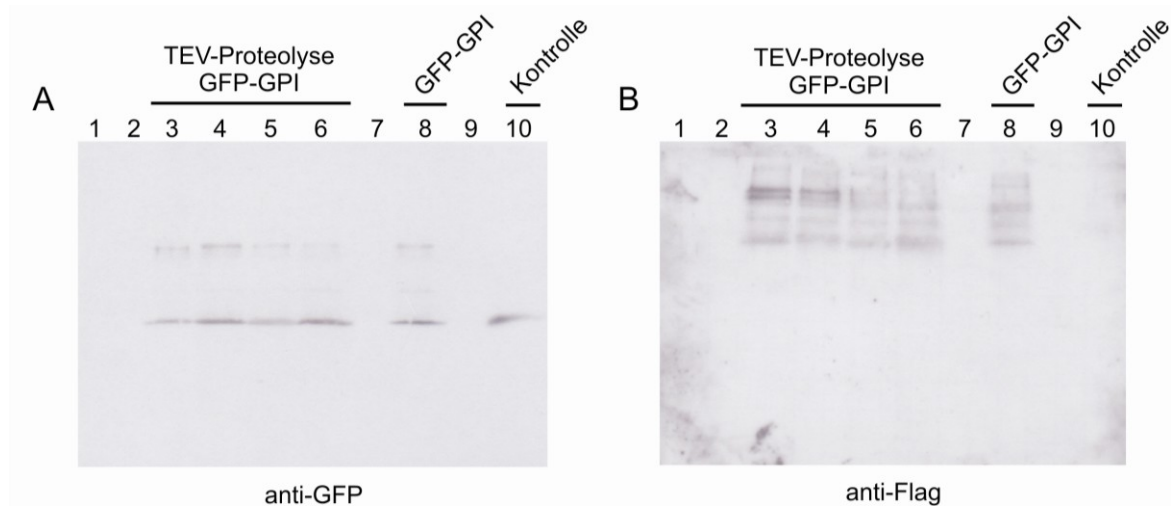


Abbildung 21: Immunologischer Nachweis von GFP-GPI mit vorheriger Dialyse nach TEV-Protease-Verdau mittels Western Blot; A) anti-GFP Antikörper; B) anti-Flag Antikörper; Spur 1: frei; Spur 2: frei; Spur 3: Reaktion in TE-Puffer bei 30°C; Spur 4: Reaktion in TE-Puffer bei RT; Spur 5: Reaktion in Puffer mit Cyclodextrin bei 30°C; Spur 6: Reaktion in Puffer mit Cyclodextrin bei RT; Spur 7: PSM; Spur 8: Eluat GFP-GPI; Spur 9: frei; Spur 10: Kontrolle GFP oder Flag-Peptid.

Betrachtet man den immunologischen Nachweis der Proteolyse durch anti-Flag Antikörper (Abbildung 20B und Abbildung 21B), so erkennt man auch hier bei allen Reaktionen (Spur 2-5 bzw. Spur 3-6), dass es zu keiner Änderung des detektierten Bandenmusters im Vergleich zum eingesetzten Eluat (Spur 7 bzw. Spur 8) kommt. Es kommt somit zu keiner Spaltung des Proteins unter Verwendung der TEV-Protease. Durch den anti-Flag Antikörper sollte eine Abnahme der Bandenintensität des eingesetzten Eluats und die Entstehung einer neuen Bande bei 5 kDa zu detektieren sein, da durch die Proteolyse-Reaktion der Flag-Tag vom GFP-GPI entfernt und als GPI-Peptid abgespalten wird (vgl. Abbildung 17).

4.4. Lokalisationsuntersuchung des GFP-GPI

Um die GPI-Verankerung des GFP, sowie seine Zelllokalisierung zu bestimmen, werden Hefezellen, welche das Kre5p-GFP-Gas1p-Konstrukt exprimieren, mit Hilfe der Immunfluoreszenz untersucht. Hierbei kann das GFP als Reporterprotein genutzt werden. Zusätzlich erlaubt der Einsatz von spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern den Nachweis von Protein, welches auf der Außenseite der Plasmamembran lokalisiert ist. Dazu wird nach Expression des Proteins in den Hefen die Zellwand der Zellen durch Lytikase verdaut, so dass es zur Entstehung von Sphäroblasten kommt. Die Plasmamembran bleibt hierbei unversehrt, kann aber unter Einsatz von Triton X-100 künstlich zerstört werden.

Während der Sphäroblastierung befinden sich die Zellen zunächst noch in Lösung und werden erst vor der eigentlichen Immunofärbung auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläser aufgebracht. Als Erstantikörper wird bei allen Messungen anti-GFP-Antikörper in einer Konzentration von 1:50 verwendet. Als Zweitantikörper dienen anti-Kaninchen-IgG Antikörper, welche entweder TRITC- oder Alexa633-markiert sind. Alle Messungen erfolgen an einem konfokalen Leica TCS SP 5 Mikroskop.

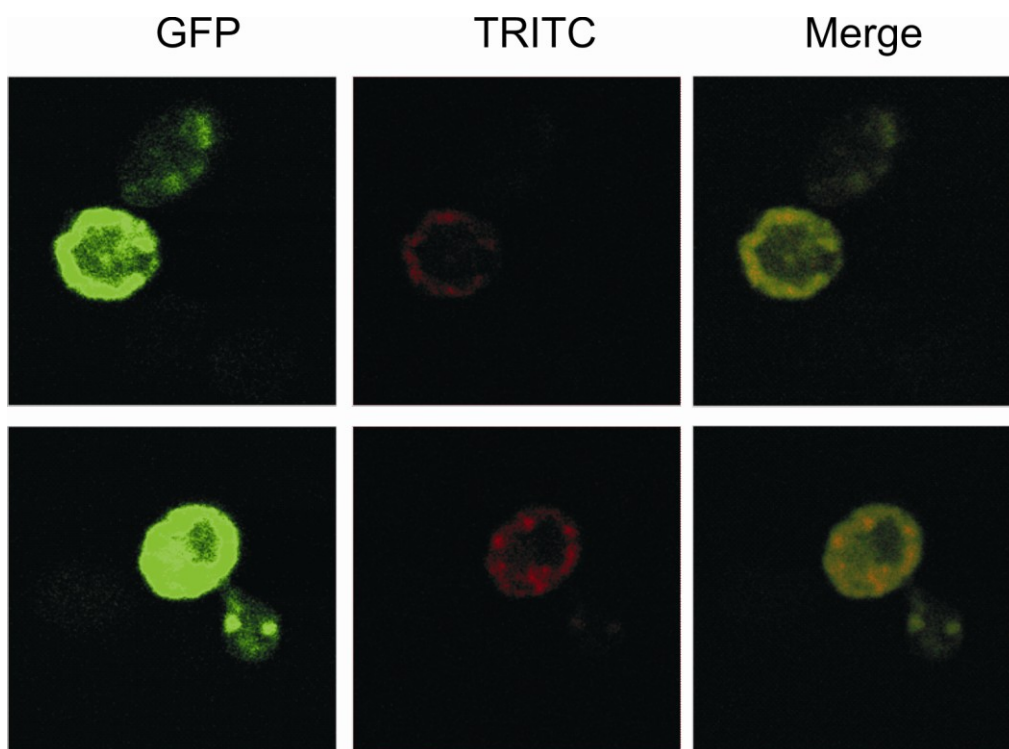


Abbildung 22: Immunfluoreszenzanalyse von GFP-GPI in Hefezellen mit anti-GFP Erstantikörper und TRITC-konjugiertem Zweitantikörper.

Die Hefezellen exprimieren das GFP und transportieren es vom ER über den Golgi zur Plasmamembran. Zwar ist das GFP aufgrund der Expression in der gesamten Zelle zu finden, jedoch kann anhand von Abbildung 22 erkannt werden, dass es eine verstärkte Lokalisation im Bereich der Plasmamembran gibt. Werden die Zellen zunächst mit anti-GFP Antikörper und anschließend mit dem TRITC-markierten Zweitantikörper anti-Kaninchen-IgG inkubiert, ohne die Plasmamembran zuvor zu permeabilisieren, kann der Antikörper nur an die Proteine binden, welche sich auf der Außenseite der Plasmamembran befinden. Betrachtet man die Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle in Abbildung 22 so erkennt man sehr deutlich, dass die TRITC-Fluoreszenz am Rand der Zelle lokalisiert ist, wohingegen die GFP-Fluoreszenz in der gesamten Zelle zu finden ist.

Um auszuschließen, dass es sich bei diesem Ergebnis um eine Kreuzanregung zwischen dem GFP ($\lambda_{\text{Ex}}/\lambda_{\text{Em}}$: 488/511nm) und dem TRITC ($\lambda_{\text{Ex}}/\lambda_{\text{Em}}$: 541/572 nm) handelt, wird in einer zweiten Messung ein Alexa633-konjugierter Zweitantikörper ($\lambda_{\text{Ex}}/\lambda_{\text{Em}}$: 633/647nm) verwendet. Das Ergebnis dieser Fluoreszenzanalyse ist in Abbildung 23 zu sehen.

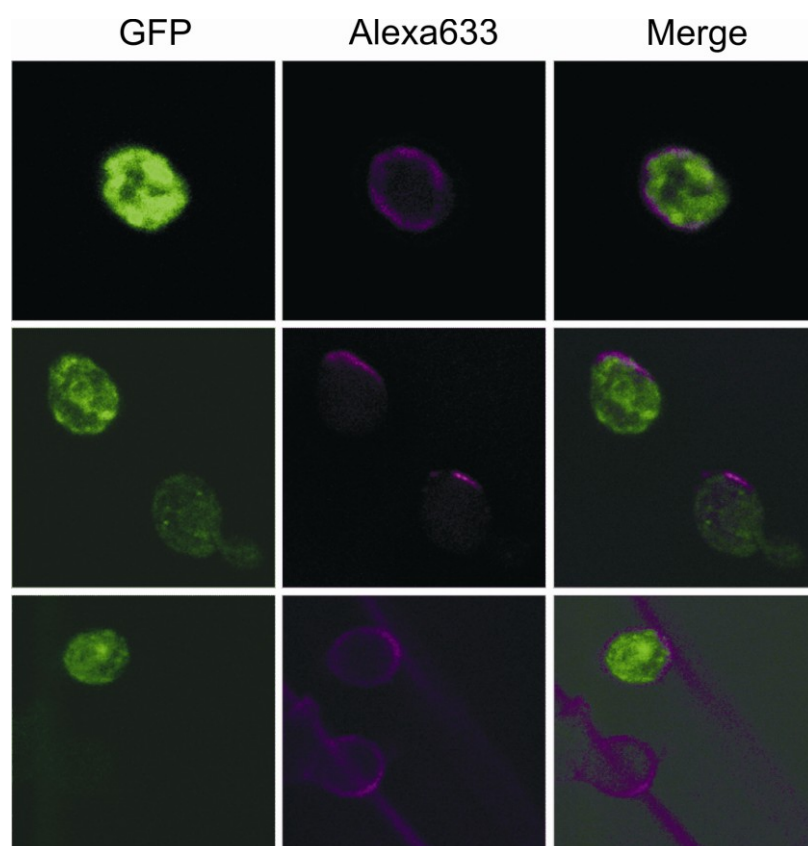


Abbildung 23: Immunfluoreszenzanalyse von GFP-GPI in Hefezellen mit anti-GFP Erstantikörper und Alexa633-konjugiertem Zweitantikörper.

Die Zellen exprimieren das GFP, wobei die Modifikation des Proteins mit dem GPI-Anker im ER der Zelle stattfindet. Dementsprechend sieht man in der Abbildung 23, bei Zellen in denen die Expressionsrate etwas geringer ist, deutlich die Kern-Membran und das von ihr ausgehende feine Netzwerk des ER unterhalb der Zellmembran selbst. Da die Zellen vor der Immunfärbung nicht permeabilisiert wurden, können die verwendeten Antikörper nur mit dem nach außen exponierten Protein reagieren. Dies ist besonders deutlich anhand der Färbung mit dem Alexa633-konjugierten Antikörper zu erkennen. So kann mit Hilfe des Antikörpers ein deutlicher Ring um die Zelle erkannt werden. Manche der Zellen weisen keine vollständige Lokalisation des GFP-GPIs in der Plasmamembran auf (Abbildung 23, Mitte). Hier sind nur Teile der Plasmamembran mit dem Alexa633-konjugierten Antikörper angefärbt worden.

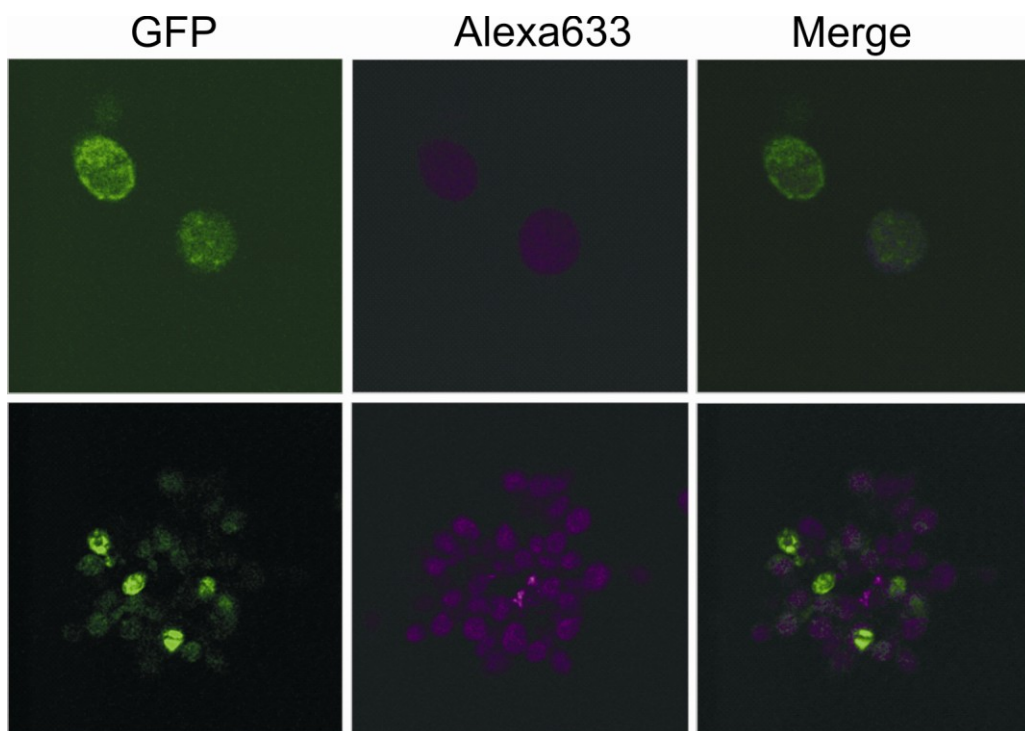


Abbildung 24: Immunofluoreszenzanalyse von GFP-GPI in Hefezellen. Kontrolle ohne Verwendung des Erstantikörpers anti-GFP.

Zur Kontrolle wird der Versuch ohne die Verwendung des Erstantikörpers anti-GFP durchgeführt. Hierbei soll überprüft werden inwieweit der Alexa633-konjugierte Antikörper unspezifisch an die Zellen oder an das auf den Zellen exponierte GFP-GPI bindet. In Abbildung 24 erkennt man, dass es zwar zu einer unspezifischen Reaktion des Zweitantikörpers mit den Zellen kommt, jedoch die typische Ringbildung (vgl. Abbildung

22 und Abbildung 23) nicht zu erkennen ist. Der Antikörper ist auf der gesamten Zelloberfläche zu finden und zeigt im Vergleich zu den vorangegangenen Versuchen eine geringere Fluoreszenz. Das GFP-GPI hingegen kann, neben der Verteilung in der gesamten Zelle, unter Verwendung der Immunofärbung vermehrt an der Plasmamembran lokalisiert werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass bei Verwendung der hefespezifischen Signalsequenzen, dass GFP erfolgreich mit einem GPI-Anker modifiziert werden kann. Dieser ermöglicht die Verankerung des Proteins auf der Außenseite der Plasmamembran, wo es mit Hilfe der Immunofärbung mit TRITC- oder Alexa633-konjugiertem Zweitantikörper spezifisch detektiert werden kann.

4.5. Isolation des GPI-Ankers aus Kre5p-PrP-Gas1p

4.5.1. Aufbau des Expressionsvektors

Der verwendete Expressionsvektor entspricht im Aufbau dem in Kapitel 4.3.1 verwendeten Vektor. Jedoch wird hier anstelle des Reportergens GFP wird eine Hamster-Maus-Chimäre des Prion Proteins verwendet. Hierzu werden die Signalsequenzen zweier Hefeproteine anstelle der Prion Protein Signalsequenzen für die posttranslationale Prozessierung des Proteins verwendet. Die Signalsequenz des Prion Proteins für den ER-Import (1-23) wird durch die Signalsequenz des Kre5p und die GPI-Anker-Signalsequenz (231-254) durch die Signalsequenz des Gas1p ersetzt (vgl. Abbildung 11). Durch die Verwendung der hefespezifischen Signalsequenzen soll eine optimale Prozessierung des Prion Proteins während der Expression gewährleistet werden. Für die Expression wird der Expressionsvektor p425Cup1 verwendet, welcher neben einem Leucin-Selektionsmarker zur Selektion geeigneter Transformanden auch eine Ampicillinresistenz besitzt. Die Expression des Zielproteins erfolgt durch die Induktion des Cup1-Promotors. Zusätzlich besitzt das Konstrukt noch zwei Affinitätstags (6xHis und Flag), welche sowohl für die Aufreinigung als auch für die Antikörper-Detektion genutzt werden. Eine TEV-Proteaseschnittstelle zwischen dem 6xHis-Tag und dem Flag-Tag ermöglicht die Isolation eines GPI-verankerten Peptids.

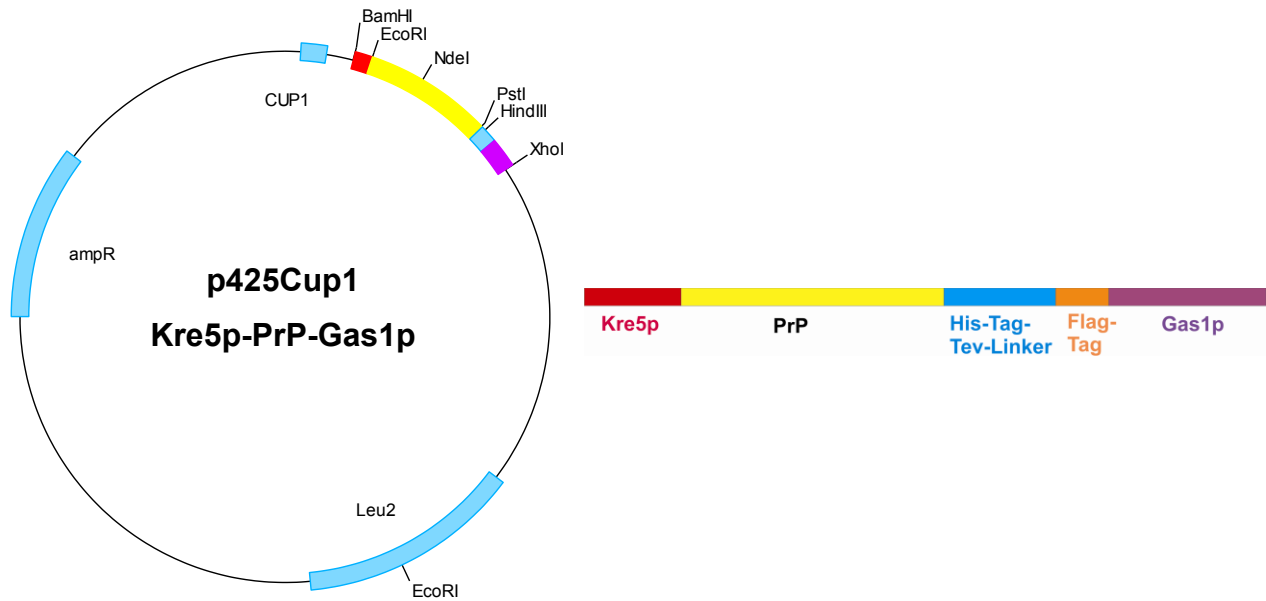


Abbildung 25: Schematische Darstellung des verwendeten Expressionsvektors und dem Zielprotein mit den verwendeten Signalsequenzen.

4.5.2. Expressionskinetik in *S. cerevisiae*

Der Klon p425Cup1-Kre5p-PrP-Gas1p wird in SC-Medium bei einer OD_{578nm} von 0,8 durch Zugabe von 0,4 mM $CuSO_4 \times 5H_2O$ induziert. Die Wachstumskurve der induzierten Kultur, sowie einer nicht induzierten Kontroll-Kultur, sind in Abbildung 26 A gezeigt.

Vor und nach der Induktion werden Proben aus der Zellkultur genommen und nach Herstellung eines Gesamtzellextraktes mittels Harnstoff-SDS auf 18 %igen SDS-Polyacrylamidgelen analysiert (Abbildung 26 B). Im ersten Gel werden die aufgetrennten Proteine mittels Coomassie angefärbt. Mit dem zweiten Gel wird ein Western-Transfer auf Nitrocellulose durchgeführt. Das immobilisierte Protein wird mit Hilfe des anti-PrP 4H11-Antikörpers durch Chemilumineszenzreaktion auf der Membran nachgewiesen. In dem Coomassie gefärbten Gel sind die Proteine des Hefe-Zell-Lysates, vor Induktion (v. I.) und nach Induktion (n. I.) mit Kupfersulfat, im Massenbereich von 14 kDa bis ca 100 kDa aufgetrennt. Hierbei werden entweder Äquivalente von 0,4 OD_{578nm} oder 0,8 OD_{578nm} des Zellysats aufgetragen.

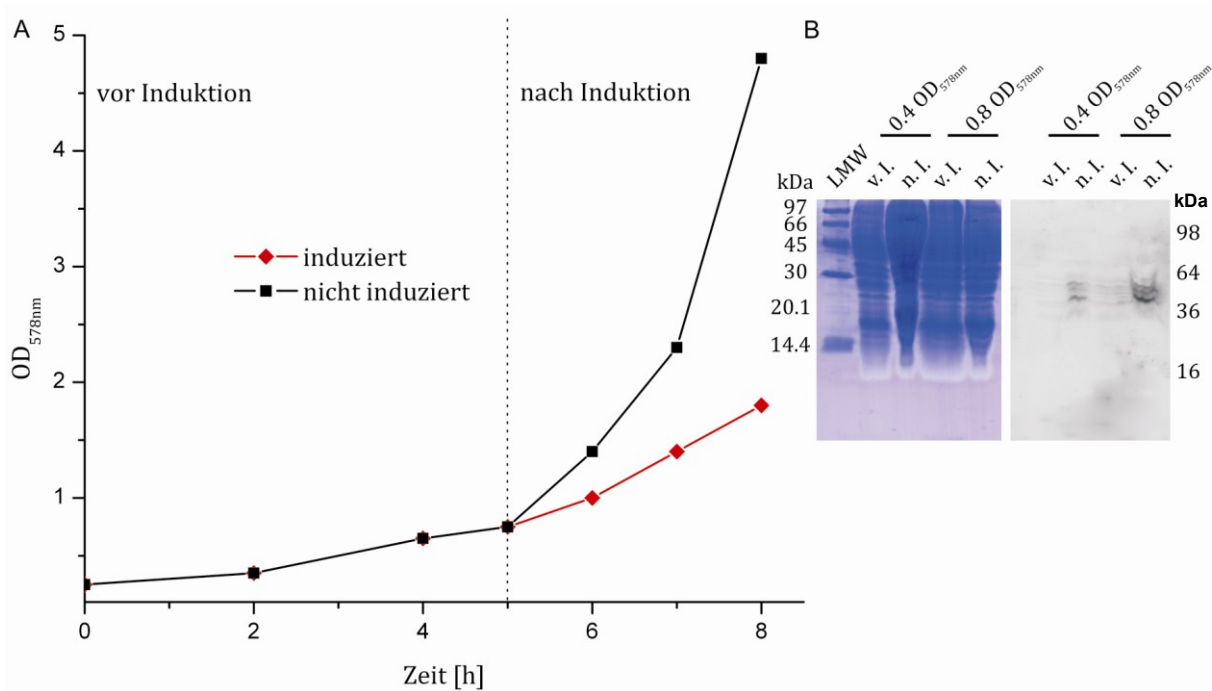
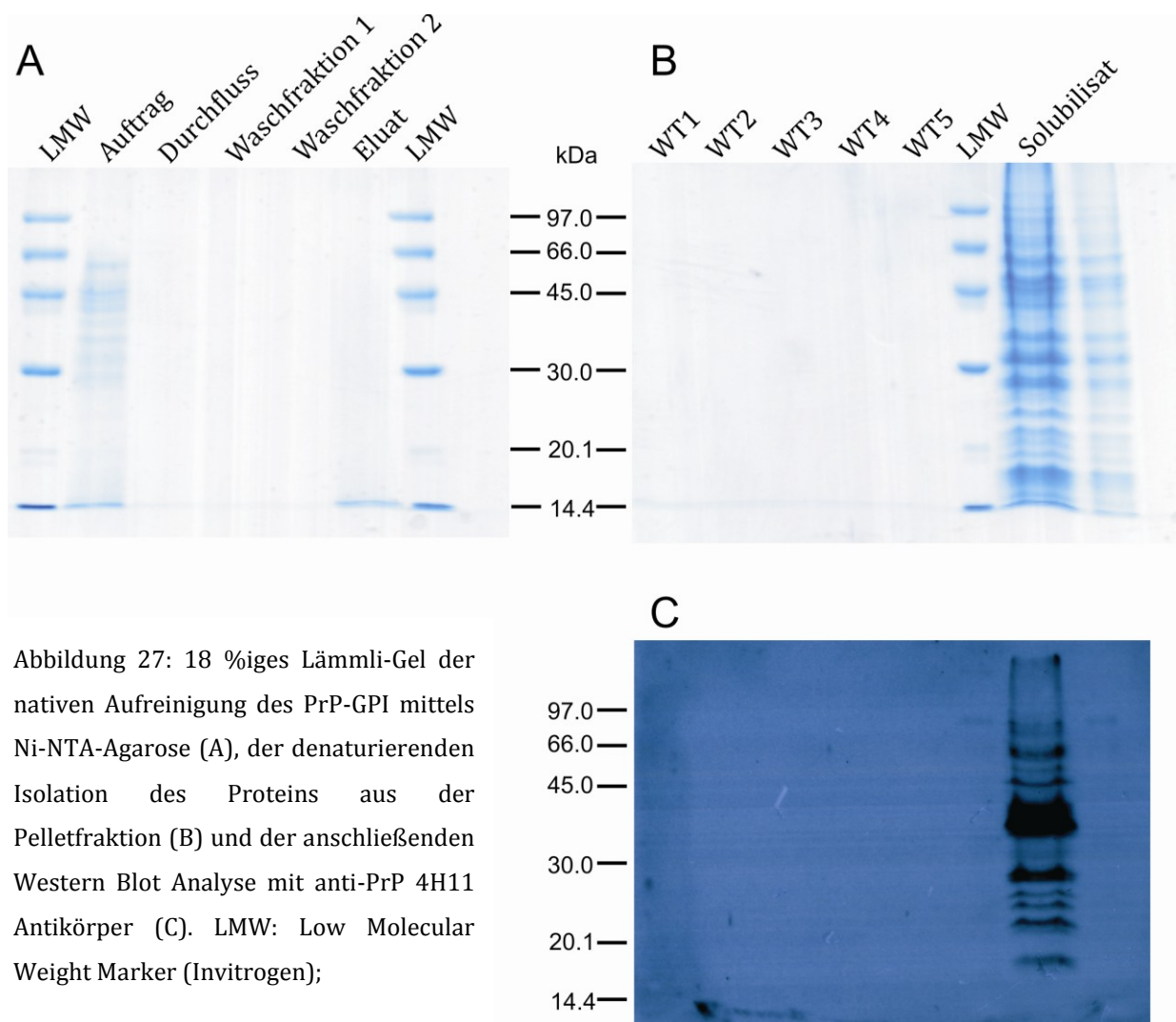


Abbildung 26: A) Wachstumskurve des Transformanten Kre5p-PrP-Gas1p in *S. cerevisiae*; B) 18 %iges SDS-Polyacrylamid-Gel nach Lämmli mit Coomassie gefärbt und anschließend immunologischen Nachweis von Kre5p-PrP-Gas1p nach Western Transfer mit anti-PrP 4H11 Antikörper; LMW: Low Molecular Weight Marker (Invitrogen); v. l.: vor Induktion; n.l.: nach Induktion.

Das aus der DNA-Sequenz abgeleitete Molekulargewicht des Kre5p-PrP-Gas1p beträgt, je nach posttranslationaler Modifikation, ca. 36 - 40 kDa. Im Massenbereich um 36 kDa wird das Auftreten einer neuen Proteinbande im Coomassie gefärbten Gel allerdings nicht beobachtet. Es sind viele Proteine angefärbt, so dass eine eindeutige Zuordnung nicht möglich ist. Auf dem belichteten Film des Antikörpertests werden in der nicht induzierten Probe schwache Banden mit einem Massenbereich um 30 - 40 kDa detektiert. Hierbei handelt es sich um eine geringe Basalexpression des Kupferpromotors. Nach Induktion der Kultur mit 0,4 mM $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ kann das exprimierte Protein immunologisch in mehreren Banden nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich bei dem Molekulargewicht von ca. 30 -40 kDa um das monomere PrP-GPI, welches sowohl un-, mono und diglykosyliert vorliegt und somit das für das Prion Protein charakteristische Bandenmuster erzeugt (vgl. Kapitel 4.5.5).

4.5.3. Proteinaufreinigung

Die Aufreinigung des PrP-GPI erfolgt wie in Kapitel 3.5.2.2 beschrieben. Hierzu wird zunächst die Zellwand der Hefen mit Lytikase verdaut und die Zellen mittels Microfluidizer aufgeschlossen. Wie auch beim GPI-verankerten GFP wird zunächst versucht das Protein nativ aus der Membran zu isolieren, indem es mit γ -Cyclodextrin und Triton X-100 solubilisiert und mittels Ni-NTA-Agarose aufgereinigt wird. In Abbildung 27 ist das Gel der nativen Aufreinigung, sowie der anschließenden denaturierenden Isolation des Proteins aus dem Zellpellet und dem korrespondierendem Western Blot mit anti-PrP 4H11 Antikörper zu sehen.



Das Gel der nativen Aufreinigung zeigt lediglich bei dem Auftrag auf die Ni-NTA-Säule (Protein, solubilisiert mit γ -Cyclodextrin und Triton X-100, nach Zentrifugation) mittels Coomassie detektierbare Banden. Dagegen sind weder im Durchfluss der Ni-NTA-Säule noch in den Waschfraktionen und im Eluat Proteine detektierbar. Mit dem nachfolgenden Western Blot mit anti-PrP 4H11 (Ergebnis nicht dargestellt) konnte ebenfalls kein Protein detektiert werden. Daher wird das Pellet zunächst mehrmals mit einem Puffer, welcher 0,5 % Triton X-100 enthält gewaschen (Abbildung 27 B, WT1-4), um eventuell andere noch vorhandene Membranproteine zu entfernen. Im letzten Waschschriff (WT5) wird das Pellet ohne Triton X-100 gewaschen, um einen Einfluss des Detergenz auf die anschließende Solubilisation in 8 M GdnHCl-haltigem Puffer auszuschließen. Die Solubilisation erfolgt über Nacht bei RT unter leichtem Rühren. Nach Zentrifugation des Solubilisats wird dieses ebenfalls auf einem 18 %igem Lämmli-Gel mit den vorangegangenen Waschfraktionen analysiert. Zusätzlich wird zur Identifizierung der vorhandenen Proteine eine Western Blot Analyse mit Hilfe eines anti-PrP 4H11 Antikörpers durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 27C dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass während der einzelnen Waschschriffe, sowohl mit Triton X-100 als auch ohne kein weiteres Protein aus dem Pellet entfernt wird. Erst nach der Solubilisation in 8 M GdnHCl sind im Coomassie-gefärbten Gel Proteinbanden detektierbar. Mit Hilfe des Western Blots können mehrere dieser Banden als Prion Protein identifiziert werden. Das Solubilisat wird über eine weitere Ni-NTA-Säule unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt.

Das Ergebnis dieser Aufreinigung ist in Abbildung 28 zu sehen. Anhand der Coomassiefärbung des 18 %igen Lämmli-Gels kann keine Aussage über den Erfolg der Aufreinigung getroffen werden, da sowohl im Auftrag auf die Ni-Säule, als auch im Durchfluss und Eluat mehrere Proteinbanden zu detektieren sind. Somit ist keine genaue Zuordnung der Proteinbanden möglich. Ein selektiver Nachweis des Prion Protein erfolgt mit Hilfe des anti-PrP 4H11 Antikörpers während der anschließenden Western-Blot Analyse. Hier kann das Protein in allen Fraktionen der Ni-NTA-Aufreinigung, außer in den Waschfraktionen, nachgewiesen werden (Abbildung 28B). Während der denaturierenden Aufreinigung passiert ein Teil des Proteins ungebunden die Ni-NTA-Säule, wobei die Proteine kein homogenes Molekulargewicht besitzen. Auch in der Zellmembran (Pellet) ist noch Prion Protein in mehreren Banden nachweisbar. Aufgrund dieses Ergebnisses kann davon ausgegangen werden, dass die Solubilisierung unvollständig ist. In den Waschfraktionen ist kein Prion Protein enthalten, jedoch

erkennt man im Vergleich zum Coomassie-Gel, dass mit Hilfe des im Waschpuffer enthaltenen Imidazols unspezifisch gebundenes Protein von der Säule gewaschen werden kann. Die Elution des Prion Proteins von der Ni-NTA-Säule erfolgt mit 200 mM Imidazol. Im Coomassie-Gel sind in der Eluatspur drei Banden bei einem Molekulargewicht von ca. 47 kDa, 33 kDa und 20 kDa anfärbbar.

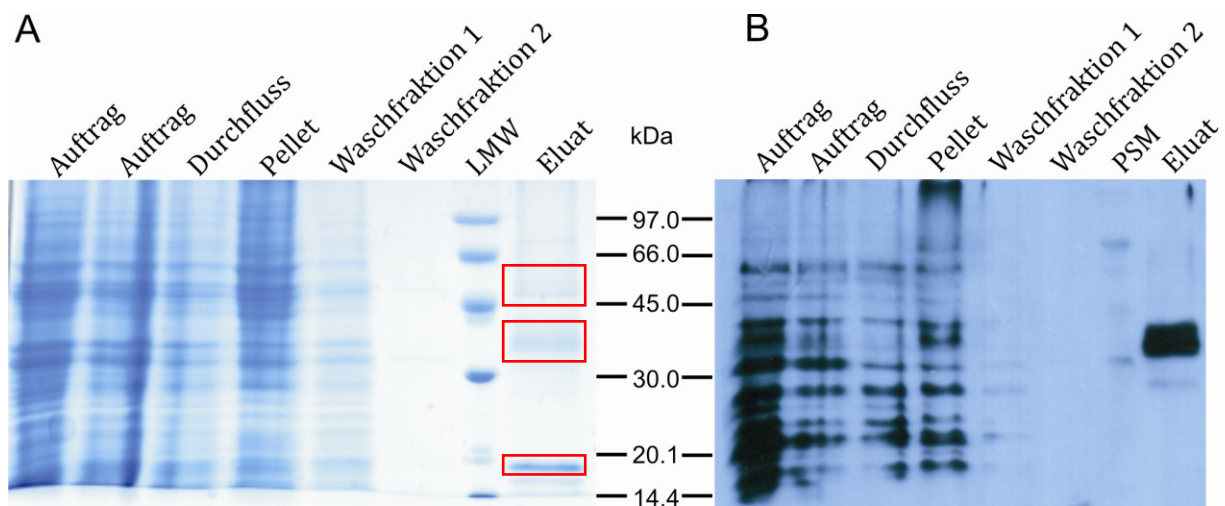


Abbildung 28: 18 %iges Lämmli-Gel der denaturierenden Aufreinigung von PrP-GPI (A) und die anschließende Western Blot Analyse mit anti-PrP 4H11 Antikörper (B). LMW: Low Molecular Weight Marker (Invitrogen)

Im Western-Blot hingegen wird nur die Bande bei ca. 33 kDa detektiert. Ob es sich bei dieser Bande um eine Bande oder mehrere Banden handelt, kann aufgrund der Signalintensität nicht eindeutig bestimmt werden. Da das Prion Protein zwei Glykosylierungsstellen besitzt kann davon ausgegangen werden, dass es sich um mehrere Banden handelt. Dies wird später anhand eines EndoH-Verdaus (Kapitel 4.5.5) genauer analysiert.

4.5.4. Faltung des rekombinanten Prion-Proteins

Da das Protein nach der Aufreinigung in 6 M GdnHCl vollständig denaturiert vorliegt, muss es vor weiteren Messungen in seine native Struktur zurückgefaltet werden. Dazu wird das Protein in einem Redoxsystem aus GSH/GSSG inkubiert, welches gewährleisten soll, dass sich die Disulfidbrücken korrekt ausbilden. Dadurch wird die Faltung des

Proteins in seine α -helikale Form begünstigt¹⁰³. Die vollständige Umfaltung erfolgt dann durch den schnellen Austausch des Chaotrops durch Gelfiltration (Sephadex G25) gegen 20 mM NaOAc pH 5.5. Der Austausch muss schnell erfolgen, um die Entstehung partiell ungefalteter Intermediate zu vermeiden, welche durch Fehlfaltung zur Aggregation des Proteins führen⁹⁰. Die Faltung des PrP-GPI wird mittels CD-Spektroskopie überprüft. Hierbei werden die Originaldaten um das Pufferspektrum korrigiert.

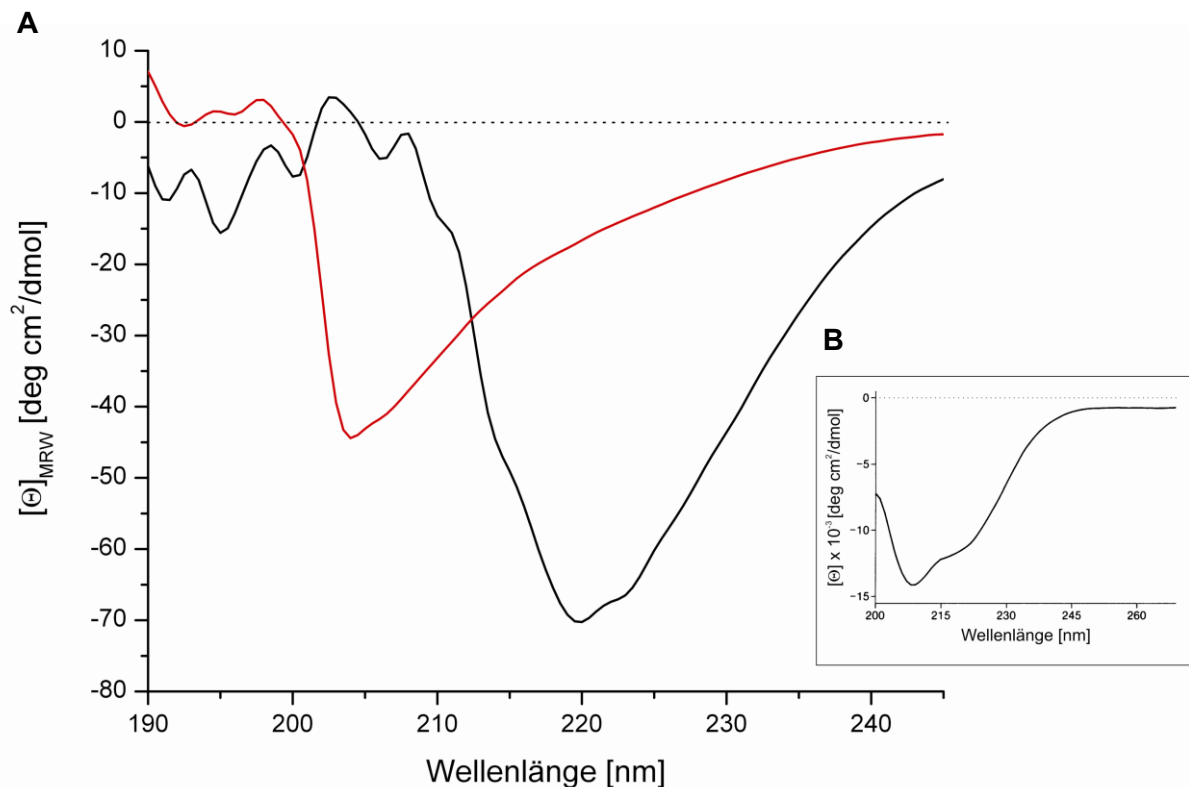


Abbildung 29: (A) CD-Spektrum der Faltung des rekombinant hergestellten PrP-GPI. In schwarz ist das Spektrum des in 20 mM NaOAc pH 5.5 rückgefalteten PrP-GPI mit vorheriger Inkubation in GSH/GSSG dargestellt und in rot ist das Spektrum des rückgefalteten PrP-GPI ohne vorheriger Inkubation in GSH/GSSG. (B): CD-Spektrum des aufgereinigten ShPrPC (23-231) in 150 mM NaCl, 10 mM Natriumphosphat pH 7,5 und 0,12 % Zwittergent 3-12 (Abbildung entnommen aus Pan *et al.*³²).

Das PrP-GPI, welches vor der Rückfaltung in 20 mM NaOAc pH 5.5 nicht mit dem Redoxsystem inkubiert wurde, weist ein deutliches Minimum bei 204 nm auf (Abbildung 29, rot). Ein Maximum kann nicht detektiert werden. Das Spektrum weist keine eindeutigen Sekundärstrukturmerkmale auf.

Das CD-Spektrum des rückgefalteten PrP-GPI, welches im Redoxsystem bestehend aus GSH/GSSG inkubiert wurde, zeigt ein breites Minimum, das sich zwischen den Wellenlängen 222 nm und 208 nm erstreckt (Abbildung 29, schwarz). Auch hier kann

kein Maximum detektiert werden. Die für α -helikale Strukturen typischen Minima bei 208 und 222 nm, sowie das Maximum bei 190 nm können nicht eindeutig detektiert werden. Vergleicht man dazu das von Pan *et al.* aufgenommene Spektrum des nativen shPrPs (23-231) ohne GPI-Anker, so sind hier die Minima bei 208 und 222 nm deutlich zu erkennen (Abbildung 29, B)³².

Bei Berechnung der Sekundärstrukturanteile mit Hilfe des Sekundäranalyseprogramms der Jasco Software, weist das PrP-GPI einen α -helikalen Anteil von 28 %, sowie 71 % ungeordnete Strukturen oder Turns auf.

Das native PrP (90-231) weist einen α -helikalen Anteil von 43 % auf³³. Der geringe Anteil an α -helikalen Strukturen des PrP-GPIs von 28 % ist hingegen normalerweise bei PrP^{Sc} bzw. PrP27-30 zu finden ist^{104,105}. Hierbei kann die hohe negative Elliptizität bei 218 nm ein Hinweis auf geordnete anti-parallele β -Faltblätter (β -Helices) sein¹⁰⁶. Diese Vermutung wird durch die von Sasaki *et al.* veröffentlichten CD-Messungen des huPrP^C (23-231) unterstützt¹⁰⁷. So zeigt das CD-Spektrum für das monomere PrP^C die typischen Sekundärstrukturmerkmale für natives PrP^C, wohingegen das oligomere PrP^C durch einen hohen β -Faltblatt-Anteil charakterisiert ist. Die oligomere Form wurde hierbei durch die Reduktion der Disulfidbrücke erreicht.

Eine Aussage über die Vollständigkeit der Rückfaltung des PrP-GPI kann anhand dieser CD-Messungen nicht getroffen werden. Zwar zeigt der Vergleich der Spektren für das PrP-GPI mit und ohne Inkubation in GSH/GSSG, dass eine Inkubation des Proteins mit dem Redoxsystem für die Ausbildung von Sekundärstrukturen benötigt wird. Allerdings deutet das Fehlen des Maximums bei 195 nm, welches sowohl für α -helikale als auch β -Faltblatt Strukturen typisch ist, auf einen hohen Anteil ungeordneter Strukturen hin. Diese können unter anderem durch die unzureichende Faltung des Proteins zustande kommen. Zusätzlich besitzt das hier verwendete PrP-GPI neben dem GPI-Anker, noch Aminosäuren der hefespezifischen Signalsequenzen Kre5p und Gas1p, deren Einfluss auf die Faltung und Struktur Proteins unbekannt sind.

4.5.5. Analyse der Glykosylierung des PrP-GPI

Das Enzym Endoglykosidase H (EndoH) spaltet vorwiegend N-Glykane vom mannosereichen Typ. Das native Prion Protein besitzt zwei mögliche Glykosylierungsstellen an den Aminosäuren Asp181 und Asp197. Da das rekombinant in

S. cerevisiae exprimierte Prion Protein im ER posttranslational glykosyliert wird, können durch die Behandlung mit EndoH die jeweiligen Anteile an komplexen und mannosereichen Zuckerseitenketten ermittelt werden. Das Ergebnis der Western Blot Analyse mit anti-PrP 4H11 Antikörper des EndoH-Verdaus ist in Abbildung 30 dargestellt. Als Kontrolle und zur besseren Darstellung des Glykosylierungsmuster ist der Western-Blot des Eluats der Ni-NTA-Aufreinigung des PrP-GPI dargestellt. Aufgrund des geringeren Signals kann man hier deutlich die einzelnen Banden der unterschiedlichen Glykosylierungszustände des Prion Proteins erkennen. Das Protein tritt sowohl unglykosyliert, als auch mit einer (monoglykosyliert) oder zwei (diglykosyliert) Zuckerseitenketten auf. Hierbei weisen ca. 50 % des Proteins keine Glykosylierung auf, ca. 20 % des Proteins sind monoglykosyliert und ca. 30 % diglykosyliert. Eine Erklärung für das stärkere Signal bei dem unglykosylierten Prion Protein ist, dass der anti-PrP 4H11 Antikörper besser binden kann, da keine sterische Hinderung durch die Zuckerketten vorliegt. Da das genaue Epitop des Antikörpers nicht bekannt ist, lässt sich dies jedoch durch die Literatur nicht belegen. Verdaut man nun das Protein mit EndoH werden die Zuckerseitenketten des Proteins entfernt und es ist nur die Bande des unglykosylierten Proteins (Abbildung 30, rechts) zu erkennen. Bei dem detektierbaren Bandenmuster handelt es sich also um das Glykosylierungsmuster des Prion Proteins

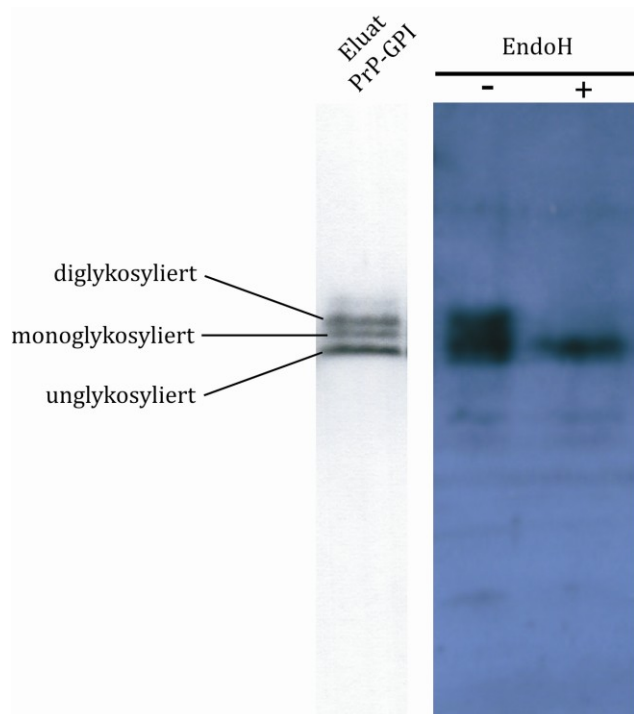


Abbildung 30: Western Blot Analyse des EndoH-Verdaus des PrP-GPI mittels anti-PrP 4H11 Antikörper.

4.5.6. Proteolyse des PrP-GPI mit TEV-Protease

Die Isolation des GPI-verankerten Peptids mit N-terminalem Cystein wird durch die Spaltung des Konstrukts mit Hilfe der TEV-Protease erreicht. Hierzu wird das denaturierend aufgereinigte Eluat zunächst schrittweise gegen Puffer mit abnehmender Harnstoffkonzentration (8 M – 2 M) dialysiert. Bei einer Harnstoffkonzentration von 2 M wird das Eluat mit TEV-Protease in einem Konzentrationsverhältnis von Protease zu Protein von 1:50, sowie 5 mM DTT versetzt und über Nacht inkubiert. Die Spaltung des Proteins wird mittels eines 18 %igen Lämmli-Gels detektiert, welches anschließend auf Nitrocellulose transferiert wird. Als Antikörper werden anti-PrP 4H11 und anti-Flag-Antikörper verwendet. Durch den TEV-Protease-Verdau wird das PrP-GPI in zwei Fragmente, dem Kre5p-PrP mit dem Rest der TEV-Schnittstelle sowie einem His-Tag und in dem GPI-verankerten Peptid, gespalten. Dieses Peptid besitzt neben dem GPI-Anker noch ein N-terminales Cystein und kann aufgrund seines Flag-Tags mittels anti-Flag Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 31 rechts). Das Ergebnis des TEV-Protease-Verdaus ist ebenfalls in Abbildung 31 (links) dargestellt.

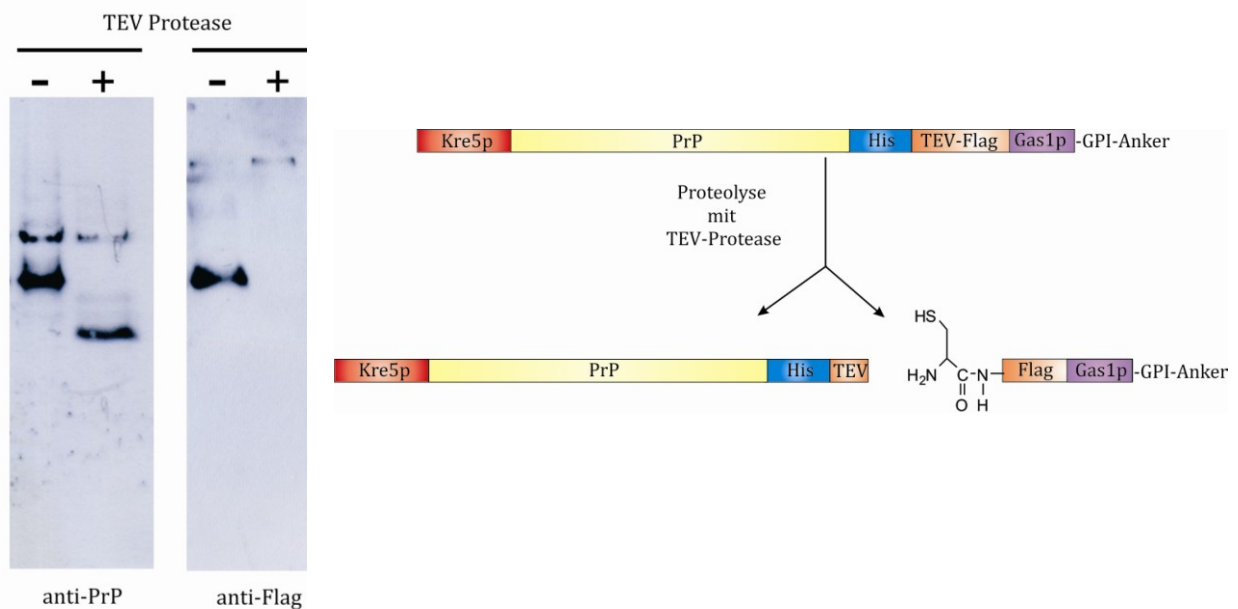


Abbildung 31: Western-Blot Analyse der TEV-Proteolyse des PrP-GPI detektiert mit anti-PrP 4H11 Antikörper und anti-Flag Antikörper (links), sowie die schematische Darstellung der während des TEV-Verdau entstehenden Fragmente (rechts).

Wie man sehr deutlich erkennen kann, kommt es beim Verdau des PrP-GPI mittels TEV-Protease zu einer Verschiebung der Bande (anti-PrP) bzw. zu einem kompletten Verschwinden der PrP-GPI-Bande (anti-Flag). Das PrP-GPI, welches ein Molekulargewicht zwischen 36 und 40 kDa aufweist, wird durch die TEV-Proteolyse in zwei Fragmente mit einem Molekulargewicht von 32 – 36 kDa und 4,8 kDa gespalten. Hiervon kann nur das große Fragment mittels anti-PrP 4H11 Antikörper detektiert werden und zeigt bei Behandlung mit TEV-Protease eine deutliche Bandenverschiebung im Gel. Bei Inkubation des Blots mit anti-Flag Antikörper kann lediglich das eingesetzte PrP-GPI vor der Behandlung mit TEV-Protease detektiert werden. Nach der Proteolyse ist kein Protein mehr detektierbar. Zum einen besitzt das größere Fragment des gespaltenen PrP-GPIs mit einem Molekulargewicht von ~32 kDa nach Proteolyse keinen Flag-Tag mehr. Das GPI-verankerte Peptid mit einem Molekulargewicht von 4,8 kDa besitzt zwar einen Flag-Tag, kann aber ebenfalls nicht mit dem anti-Flag Antikörper nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung ist, dass das GPI-Peptid aufgrund seiner geringen Größe wahrscheinlich beim Western Blot nicht an die Blotmembran gebunden werden kann. Zur Kontrolle wird ein 3x Flag-Peptid (M_w : 2,8 kDa) eingesetzt, welches jedoch mittels Coomassie angefärbt und nachgewiesen werden kann (Ergebnis nicht gezeigt). Allerdings liefert auch hier der Western Blot kein Ergebnis. Eventuell werden die kleinen Fragmente während des Blottens durch die Membran transferiert. Um dies auszuschließen, werden mehrere Blotmembranen übereinander gelegt. Außerdem wird neben Nitrocellulose auch PVDF-Membran verwendet. Aber auch diese Untersuchungen führen zu keinem Nachweis des GPI-verankerten Peptids mittels anti-Flag Antikörper. Obwohl durch den anti-Flag Antikörper keine Detektion des gespaltenen GPI-Peptids möglich war, kann davon ausgegangen werden, dass das PrP-GPI mit Hilfe der TEV-Protease vollständig in seine beiden Fragmente gespalten werden kann.

4.5.7. Aufreinigung des GPI-verankerten Peptids mittels Cystein Covalent Capture Beads

Um das GPI-verankerte Peptid von der TEV-Protease, sowie dem geschnittenen und ungeschnittenen Protein zu trennen, erfolgt die Aufreinigung des GPI-Peptids mit Hilfe von Cystein Covalent Capture Beads (CCB).

Hierfür wird das Harz zunächst mit 2 M Harnstoff, 150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 8.0 gewaschen und das GPI-Peptid mit 10 mM TCEP versetzt, bevor beide ü.N. miteinander unter leichtem Schütteln inkubiert werden. Ein Schema der Aufreinigung ist in Abbildung 32 dargestellt.

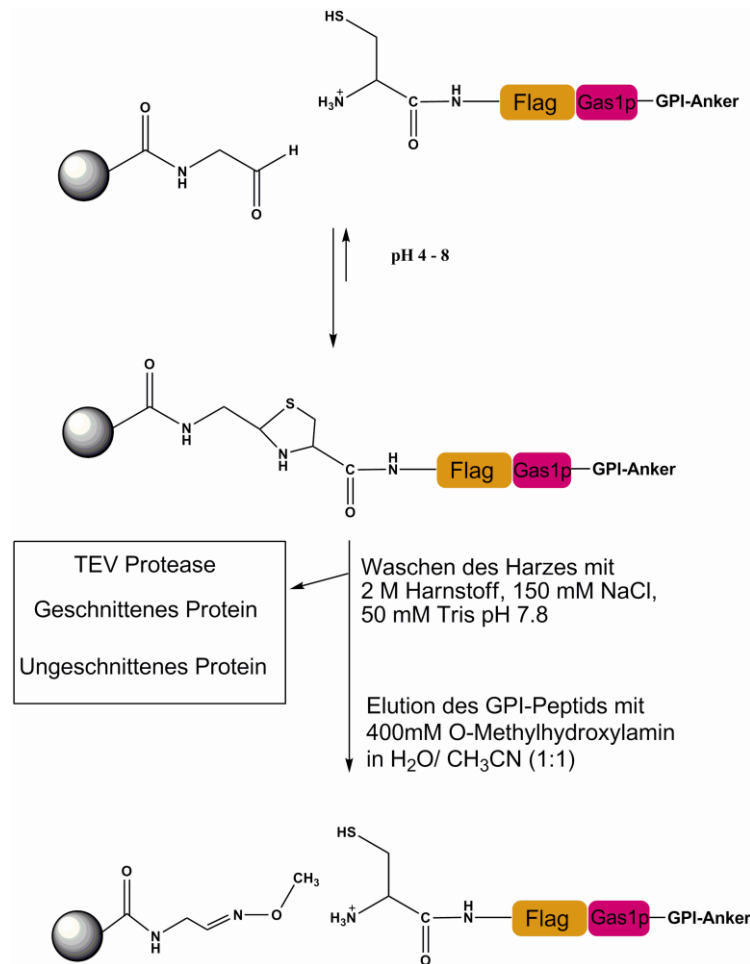


Abbildung 32: Schematische Darstellung der Aufreinigung des GPI-Peptids mit N-terminalen Cystein mittels Cystein Covalent Capture Beads.

Nach Ausbildung des heterozyklischen Rings der Aldehydgruppe mit dem N-terminalen Cystein des GPI-Peptids können die TEV-Protease, geschnittenes und ungeschnittenes PrP-GPI, sowie ungebundenes Peptid durch mehrmaliges Waschen entfernt werden. Das aufgereinigte Peptid wird anschließend vom Harz eluiert und der Erfolg der Aufreinigung mittels Western Transfer und Dot Blot analysiert.

Für die Western Blot Analyse der Aufreinigung werden die Proben auf einem 18 %igem Lämmli-Gel aufgetrennt und anschließend mit Hilfe des Semi-Dry Blotverfahrens auf

eine NC-Membran transferiert. Zusätzlich wird eine Dot Blot Analyse durchgeführt, wobei die Proben direkt auf eine mit Puffer befeuchtete NC-Membran aufgebracht werden. Der immunologische Nachweis der Proteine erfolgt bei beiden Methoden durch anti-Flag-Antikörper (Abbildung 33).

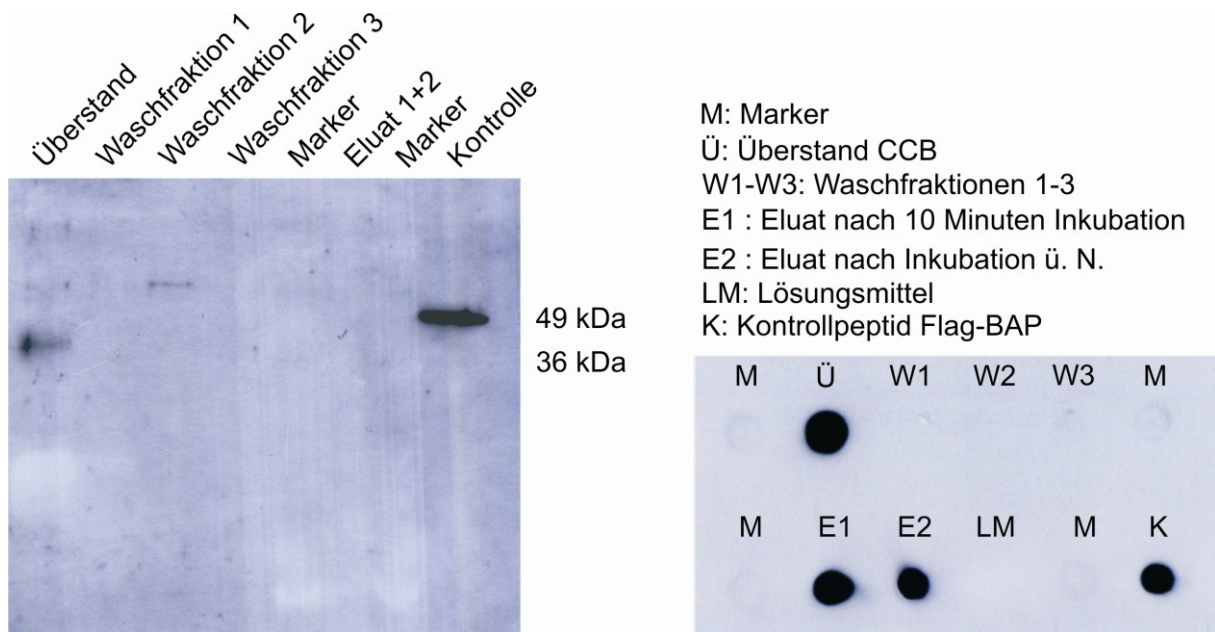


Abbildung 33: Western Blot Analyse der Cystein Covalent Capture Beads Aufreinigung mittels Semi-Dry Blot-Verfahren (links) und Dot Blot (rechts) unter Verwendung von anti-Flag Antikörper. Marker: Prestained Marker (Invitrogen); Kontrolle: Kontrollpeptid Flag-BAP.

Betrachtet man den Western Blot, erkennt man im Überstand der Reaktion nach Inkubation über Nacht eine Proteinbande bei ca. 36 kDa. Diese entspricht dem ungeschnittenen PrP-GPI, welches aufgrund des fehlenden N-terminalen Cysteins nicht mit der Aldehydfunktion des Harzes reagieren kann. Das geschnittene PrP-GPI, sowie die TEV-Protease können aufgrund des fehlenden Flag-Tags nicht detektiert werden. In den nachfolgenden Waschfraktionen sind lediglich schwache Proteinbanden mit einer Masse von ca. 60 kDa zu detektieren, welche zwar eine Reaktion mit dem anti-Flag Antikörper zeigen, jedoch keinem Protein eindeutig zugeordnet werden können. In den Proben nach Elution des GPI-Peptids mit O-Methylhydroxylamin ist kein Protein zu detektieren. Die erwartete Masse des geschnittenen GPI-Peptids beträgt 4,8 kDa. Durch die geringe Größe des Peptids und aufgrund der GPI-Modifikation scheint das GPI-Peptid nicht mittels SDS-Gel und anschließendem Semi-Dry Blot auf der NC-Membran fixiert und nachgewiesen werden zu können. Daher wird die Aufreinigung zusätzlich mit

einem Dot Blot analysiert. Hierbei werden die Proben direkt auf die Membran pipettiert, ohne dass eine vorherige Auftrennung der Proteine mittels SDS-Gel stattgefunden hat. Daher ist eine Bestimmung der Proteinmasse nicht möglich. Das Ergebnis ist in Abbildung 33 rechts dargestellt. Auch hier erhält man ein Signal mit dem anti-Flag Antikörper für den Überstand der Reaktion. Hierbei handelt es sich vermutlich um das ungeschnittene PrP-GPI.

Eine Reaktion mit anderen Proteinen kann ausgeschlossen werden, da der Marker kein bzw. ein sehr geringes Signal zeigt. Ebenso kann in den Waschfraktionen kein Protein detektiert werden. Mit Hilfe der Dot Blot Analyse kann jedoch Protein in den Eluatfraktionen 1 und 2 nachgewiesen werden, welche beide ein deutliches Signal zeigen. Da auf dem Semi-Dry Blot keine Banden bei den Eluatfraktionen detektiert werden, kann man davon ausgehen, dass es sich hierbei um das isolierte GPI-Peptid handelt. Um auszuschließen, dass es sich bei dem Signal der Eluate um ein Artefakt des verwendeten Elutionsmittels (LM) handelt, wird dieses ebenfalls auf die NC-Membran pipettiert. Hierbei wird kein Signal mit Hilfe des anti-Flag Antikörpers detektiert. Somit handelt es sich nicht um eine Reaktion des Antikörpers mit dem zur Elution verwendetem Lösungsmittel.

Um die Aufreinigung weiter zu untersuchen, werden sowohl der Überstand als auch die beiden Eluatfraktionen der CCB-Aufreinigung mittels analytischer C₁₈-RP-HPLC-Säule weiter untersucht. Hierzu wird ein linearer Gradient von 5 % (v/v) Puffer B nach 70 % (v/v) Puffer B in Puffer A über 40 min. mit einer Flussrate von 1 mL/min. verwendet. Die Absorption der Proben wird bei einer Wellenlänge von 214 nm detektiert.

Das Chromatogramm (Abbildung 34) zeigt im Überstand (rot) mehrere schwächere Signale und einen deutlichen Peak bei einer Retentionszeit von 28 min.. Hierbei handelt es sich sehr wahrscheinlich um die im Überstand enthaltene TEV-Protease und geschnittenes und ungeschnittenes PrP-GPI. Dagegen ist in beiden Eluatfraktionen (Eluat 1: grün und Eluat 2: blau) ein Peak mit einer Retentionszeit von 37.2 min. detektierbar. Hierbei erhöht sich die Intensität des Peaks bei der Elution des Peptids über Nacht (Eluat 2) im Vergleich zu dem Peptid, welches nur für 10 min. von den Beads eluiert wurde (Eluat 1). Es muss sich demnach bei diesem Peak um das GPI-Peptid handeln, welches erfolgreich mittels CCB isoliert werden kann. Zudem scheint die Elution des Peptids über Nacht effizienter zu sein. Allerdings kann man im Chromatogramm des über Nacht eluierten Peptids (Eluat 2: blau) einen weiteren Peak mit einer Retentionszeit von 30.7 min. detektieren. Hierbei könnte es sich um ein Dimer

handeln, welches sich durch die lange Inkubation des Peptids in O-Methylhydroxylamin ausbildet. Da während der Elution keine Reduktionsmittel verwendet werden, ist es möglich, dass sich zwischen den freien N-terminalen Cysteinen der eluierten Peptide Disulfidbrücken ausbilden.

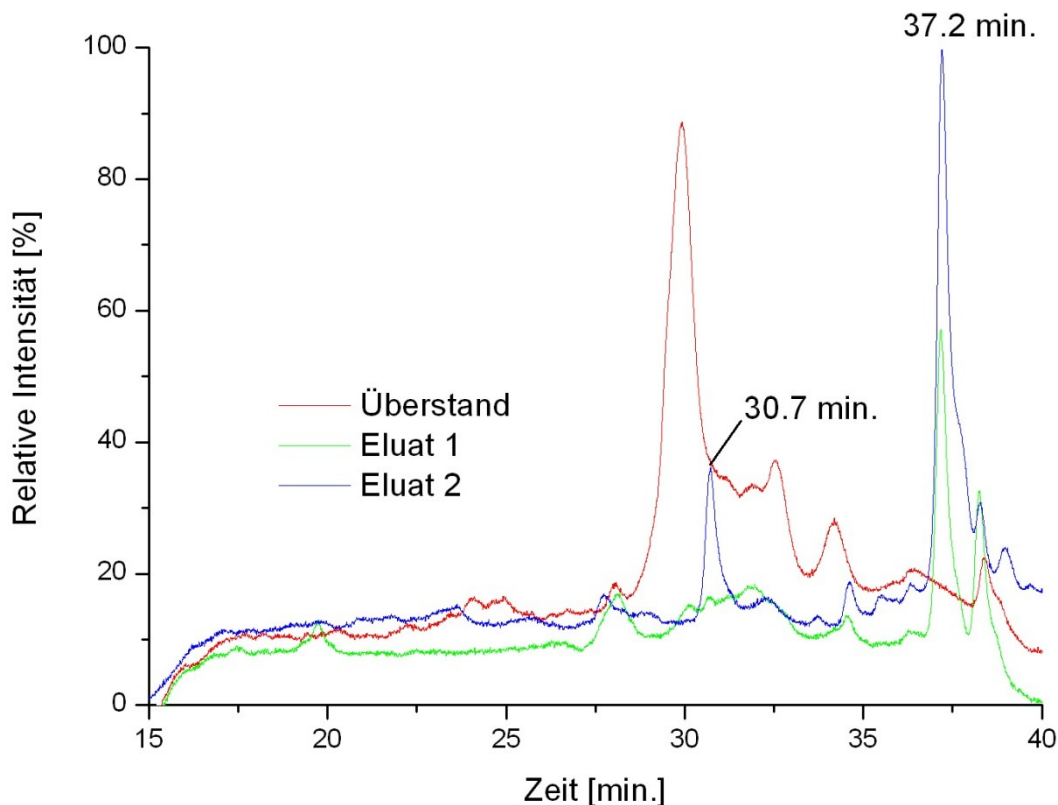


Abbildung 34: Chromatogramm der analytischen C₁₈-RP-HPLC-Analyse mit einem Gradienten von 5% Puffer B nach 70 % Puffer B in A in 40 min.; rot: Überstand der CCB; grün: Eluat nach 10 min. Inkubation; blau: Eluat nach ü.N. Inkubation.

4.5.8. Charakterisierung des isolierten GPI-Peptides mittels MALDI-MS

Um das isolierte GPI-Peptid genauer zu analysieren, wird die Fraktion mit einer Retentionszeit von 37.2 min. (vgl. Kapitel 4.5.7) mittels MALDI-MS untersucht. Zur Entfernung des salzhaltigen Puffers wird die Probe zuvor über C18-Zip-Tips nach Herstellerangaben aufgereinigt. Als Matrix für die MALDI-MS Messung wird eine Mischung aus DHB und MSA verwendet, welche besonders für glykosylierte Proteine

geeignet ist. Das Ergebnis der im Negativ-Modus durchgeführten Messung und dem daraus abgeleiteten GPI-Peptid sind in Abbildung 35 dargestellt.

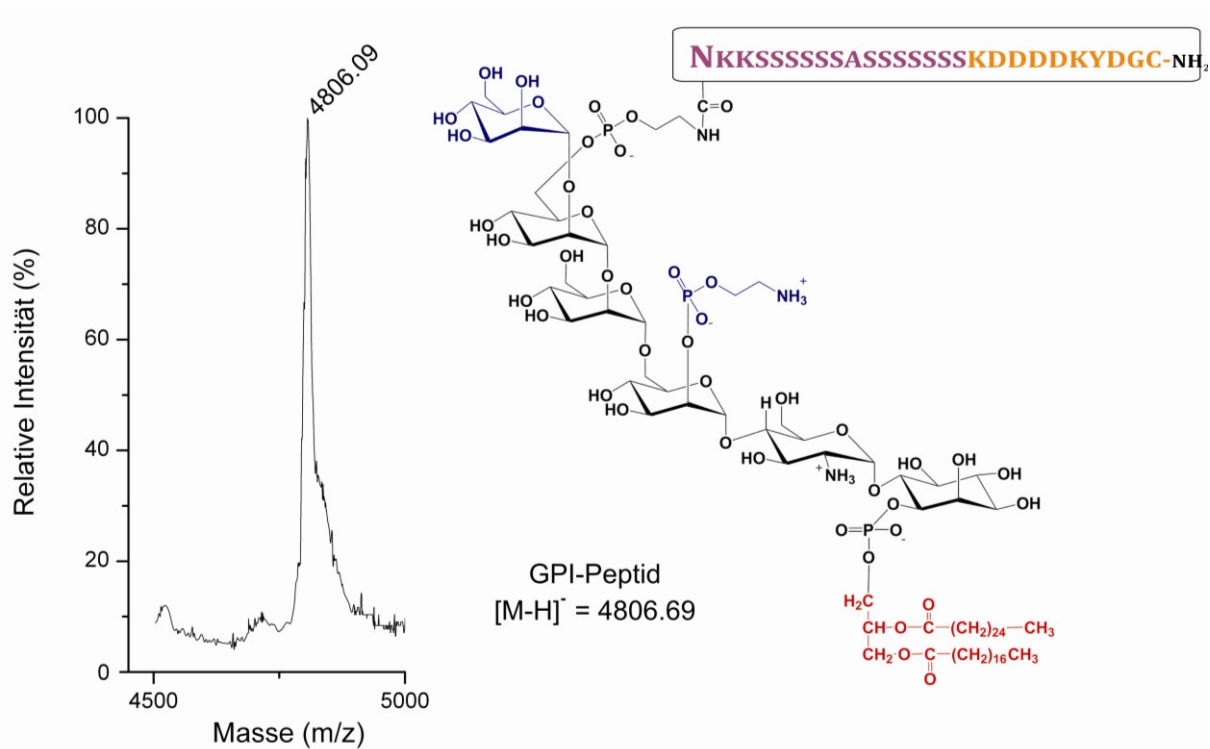


Abbildung 35: MALDI-MS-Spektrum des isolierten GPI-Peptids und die daraus abgeleitete Struktur des GPI-Ankers. Schwarz: GPI-Anker Grundstruktur; rot: Lipideinheit; blau: zusätzliche Modifikationen.

Mit Hilfe der MALDI- Messung kann eine Masse von 4806,09 Da für das GPI-Peptid bestimmt werden, die Rückschlüsse auf die Struktur des GPI-Ankers zulässt. Das mittels TEV-Protease proteolytisch gespaltene Peptid mit dem N-terminalen Cystein hat ein Molekulargewicht von 2746,7 Da. Die genaue Aminosäuresequenz ist in Abbildung 35 zu sehen. Hierbei ist die Sequenz des Gas1p in lila dargestellt. Das Asparagin, welches mit dem GPI-Anker modifiziert wird, ist zusätzlich fett hervorgehoben. Außerdem besitzt das Peptid neben dem N-terminalen Cystein noch einen Flag-Tag, welcher in orange dargestellt sind.

Die Grundstruktur des GPI-Ankers mit der Lipideinheit, wie er in Abbildung 35 (schwarz) dargestellt ist, besitzt ein Molekulargewicht von 1774,93 Da. Die Lipideinheit des Ankers besteht aus Diacylglycerin mit einem C24- und einem C16-Fettsäurerest (rot dargestellt). Durch die Addition einer vierten Mannose, sowie der Modifikation der Grundstruktur mit Ethanolamin ergibt sich ein Gesamtmolekulargewicht des

modifizierten GPI-Ankers von 2059,66 Da. Hierbei wird die vierte Mannose über eine α 1-2 glykosidische Bindung mit der dritten Mannose verknüpft. Die Position der Ethanolaminmodifikation hingegen ist variabel und kann an der ersten oder zweiten Mannose erfolgen. Durch die Modifikation des Peptids mit dem modifizierten GPI-Anker ergibt sich eine Masse von 4806,69 Da, welche sehr gut mit der durch MALDI-MS erhaltenen Masse von 4806,09 Da überein stimmt.

4.5.9. Expressed Protein Ligation des GPI-Peptids

Für die Protein-Modifikation mit dem isolierten GPI-Peptid werden mehrere Strategien verfolgt. Als Testpeptid wird die Ras-bindende Domäne (RBD) des cRaf1 Proteins verwendet, da es neben seiner geringen Größe (9 kDa) auch aufgrund der Stabilität und Löslichkeit eine gute Zugänglichkeit für die EPL zeigt. Die RBD wird als MESNA-Thioester exprimiert und unter nativen Bedingungen mit dem mittels CCB isoliertem GPI-Peptid ligiert. Als Kontrolle wird der RBD-Thioester (RBD-SR) mit dem fluoreszenzmarkierten NBD-Peptid ligiert, wodurch der Reaktionsverlauf der EPL mittels Fluoreszenzscan verfolgt werden kann. Für die Reaktion werden äquimolare Mengen der zu ligierenden Reaktanden eingesetzt und diese über Nacht miteinander inkubiert. Anschließend werden die Proben auf ein 18 % Lämmli-SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und sowohl mit Coomassie gefärbt (Abbildung 36, links) als auch mittels Fluoreszenzscan (Abbildung 36, rechts) analysiert. Im Coomassie gefärbten Gel sind keine Banden für den RBD-SR zu detektieren, evtl. ist die aufgetragene Konzentration zu gering gewesen. Bei den Ligationsproben mit dem fluoreszenzmarkierten NBD-Peptid sind mehrere Banden zu erkennen. Diese sind diffus und liegen in einem Massenbereich von 4-16 kDa. Der RBD-Thioester hat eine Masse von ca. 9,8 kDa und das Peptid eine Masse von 1350 Da, so dass das Ligationsprodukt eine Masse von ca. 11 kDa aufweist. Da das Peptid selbst mittels SDS-PAGE, aufgrund seiner geringen Größe, nicht detektiert werden kann, handelt es sich entweder um den RBD-SR oder das Ligationsprodukt RBD-NBD. Um dies zu überprüfen wird ein Fluoreszenzscan des Gels durchgeführt, wobei nur das Ligationsprodukt angeregt wird. Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass sich in beiden Ligationsproben das Ligationsprodukt (RBD-NBD) befindet. Dieses zeigt ebenfalls keine klare Bande, sondern ist stark verbreitert und erstreckt sich, wie bei dem Coomassie gefärbten Gel, über einen Massenbereich von 4-16 kDa. Da der eingesetzte

RBD-Thioester kein Fluoreszenzsignal zeigt, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um das Ligationsprodukt handelt.

n

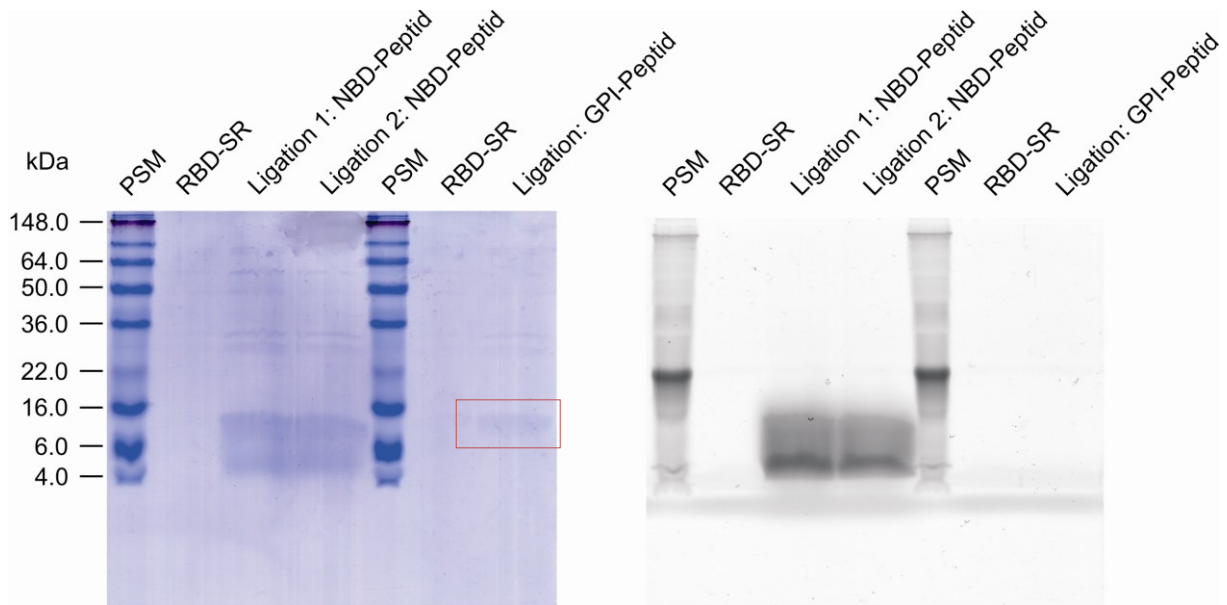


Abbildung 36: 18 %iges Lämmli-Gel der *Expressed Protein Ligation* des RBD-Thioesters (RBD-SR) mit dem fluoreszenzmarkierten NBD-Peptid oder dem mittels CCB isoliertem GPI-Peptid. Links: Coomassiegefärbtes Gel; rechts: Fluoreszenzscan; als Marker wird der Prestained Marker von Invitrogen (PSM) verwendet.

Bei der Ligation des GPI-Peptids mit dem RBD-SR kann ebenfalls eine Bande auf dem Coomassie gefärbten Gel detektiert werden. Das GPI-Peptid hat eine Masse von 4806 Da und bei erfolgter Ligation erhält man ein Protein (RBD-GPI) mit einer Masse von 14,6 kDa. Die auf dem Gel detektierte Bande liegt in einem Massenbereich von 10 -16 kDa.

Für eine genauere Charakterisierung werden die Proben auf eine NC Membran mittels Western Blot transferiert. Allerdings sind bei der anschließenden Detektion mit anti-His Antikörper (RBD-NBD) und anti-Flag-Antikörper (RBD-GPI) weder das Ligationsprodukt des RBD-Thioesters mit dem NBD-Peptid noch mit dem GPI-Peptid detektierbar (Daten nicht gezeigt).

Deshalb werden der RBD-Thioester und die Ligationenproben mittels ESI-MS genauer analysiert. Bei der Messung des RBD-SR treten die positiven Ladungszustände zwischen fünf (1966,66) und neun (1093,53) Ladungen pro Molekül auf (Abbildung 37 A). Die daraus ermittelte Masse von 9829,6 g/mol stimmt mit der berechneten Masse für den RBD-SR mit 9828,5 g/mol gut überein.

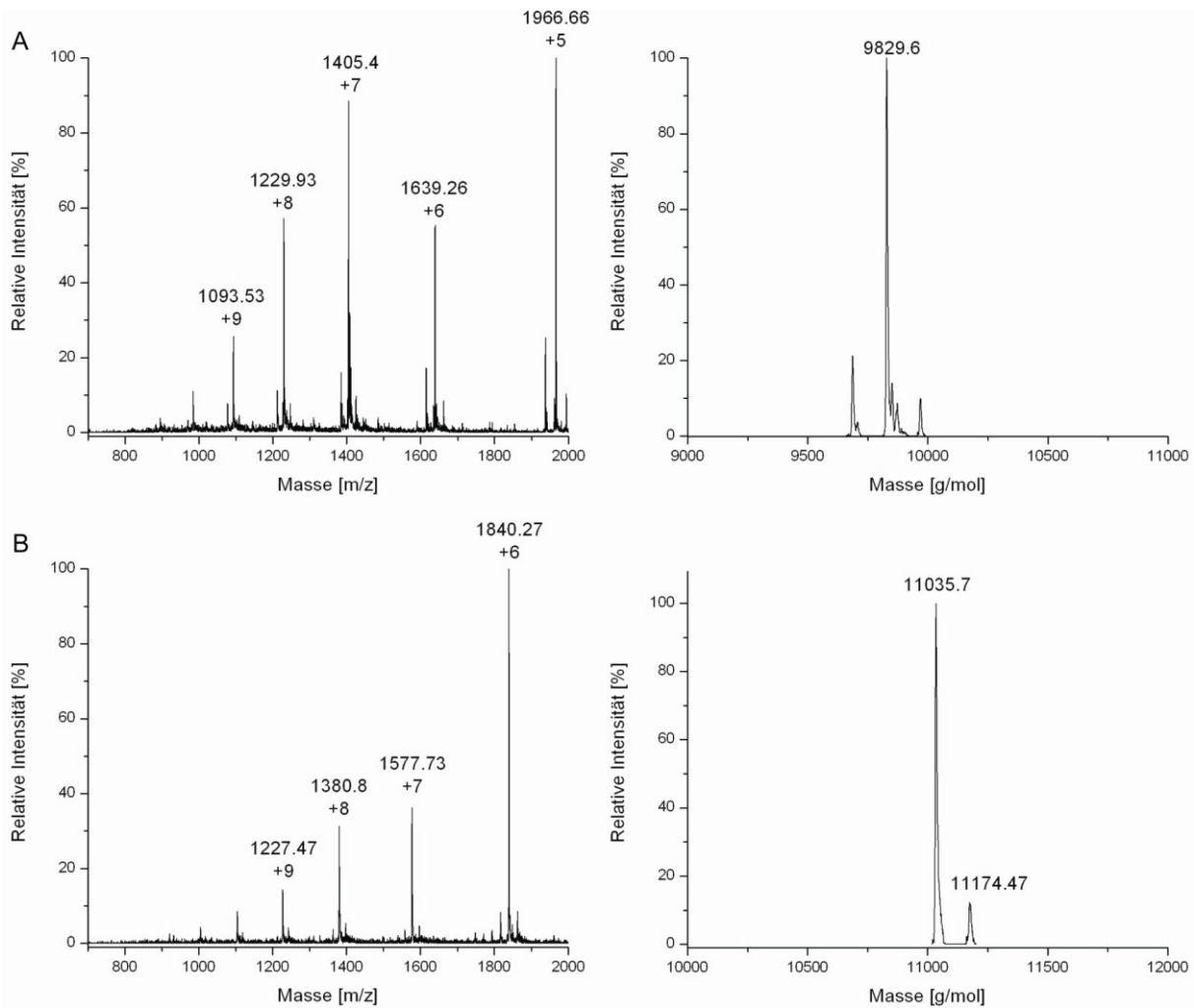


Abbildung 37: ESI-MS und dekonvolutierte Spektrum des RBD-Thioesters (A), sowie des Ligationsprodukts RBD-NBD mit der mittels MagTran berechneten Masse (B).

Nach der Ligation mit dem fluoreszenzmarkierten NBD-Peptid erkennt man im ESI-MS die Ladungszustände zwischen sechs (1840,27) und neun (1227,47) positiven Ladungen pro Molekül (Abbildung 37 B). Das mittels MagTran dekonvolutierte Spektrum ergibt eine Masse von 11035,7 g/mol. Diese stimmt, mit der berechneten Masse für das Ligationsprodukt (RBD-NBD) von 11037,3 g/mol gut überein. Für das Ligationsprodukt RBD-GPI konnte auf diesem Weg keine Masse detektiert werden. Daher wird die Ligation des GPI-Peptids (4806,69 g/mol) mit dem RBD-SR in einem nächsten Versuch unter denaturierenden Bedingungen in 8 M Harnstoff, 50 mM Tris/HCl pH 7.2, 100 mM NaCl unter Verwendung von 5 % Thiophenol durchgeführt. Nach Inkubation wird die Probe mit 10 % BME gestoppt und mit einer analytischen RP-C₄-HPLC-Säule bei einem Fluss von 1 mL/min. mittels eines linearen Gradientens von 5 % Puffer B zu 95 % Puffer B in Puffer A analysiert (Abbildung 38 A; rot). Zur Kontrolle wird eine Probe vor Zugabe

des zweiten Reaktanden mit BME versetzt und bis zur HPLC-Analyse bei -20°C gelagert (Abbildung 38, schwarz).

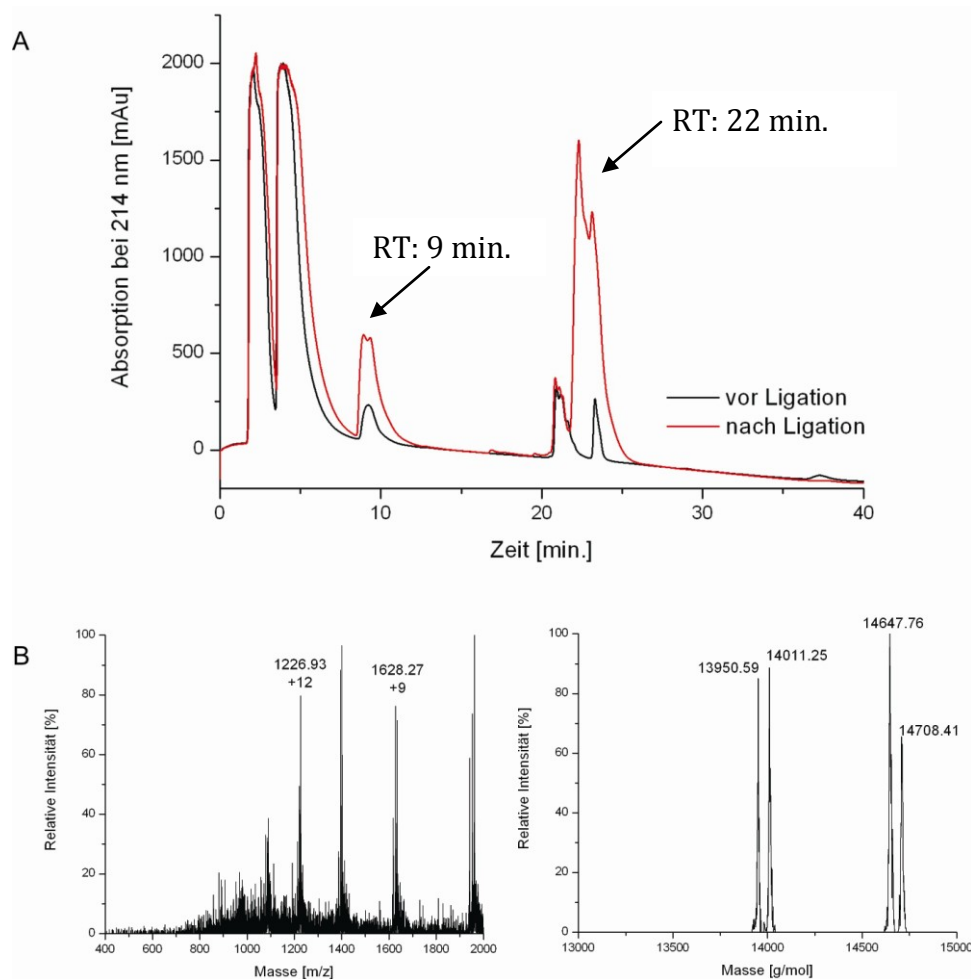


Abbildung 38: A: RP-C₄-HPLC-Chromatogramm; B: ESI-MS mit dem dekonvolutierten Spektrum der Fraktion bei einer Retentionszeit von 22 min..

Anhand des HPLC-Chromatogramms erkennt man deutlich die Zunahme der Peaks bei einer Retentionszeit von 9 und 22 min. nach Ligation, wohingegen die anderen Peaks keine Änderung ihrer Absorption zeigen. Die Peaks der HPLC-Aufreinigung werden fraktioniert gesammelt und mittels ESI-MS analysiert. In Abbildung 38 B ist das ESI-MS der Fraktion bei einer Retentionszeit von 22 min. dargestellt. Im ESI-MS können jedoch nur zwei Ladungszustände mit neun (1628,27) und zwölf (1226,93) positiven Ladungen pro Molekül detektiert werden. Das dekonvolutierte Spektrum zeigt mehrere Massen, wobei nur die Masse mit 14647,76 g/mol den gemessenen Ladungszuständen entspricht. Die Abweichung der dekonvolutierten Masse zur berechneten Masse von 14493,99 g/mol weist eine Differenz von 153,77 g/mol auf. Dieser Unterschied kann

durch die Addition von zwei BME-Molekülen (78,13 g/mol) an die vorhandenen Cysteine erklärt werden. Das BME wurde zum Stoppen der Ligationsreaktion verwendet. Die ESI-MS Analyse der Fraktion bei einer Retentionszeit von 9 min. führt zu keinem Ergebnis.

Da die Ergebnisse auf eine erfolgreiche Ligation des GPI-Peptids an die RBD hindeuten soll in einem nächsten Schritt das GPI-Peptid an einen Prion-Thioester ligiert werden. Da der Prion-Thioester nur unter denaturierenden Bedingungen löslich ist, wird die Ligation in 50 mM Tris/HCl pH 7,8, 150 mM NaCl entweder mit 6 M GdnHCl oder 8 M Harnstoff durchgeführt.

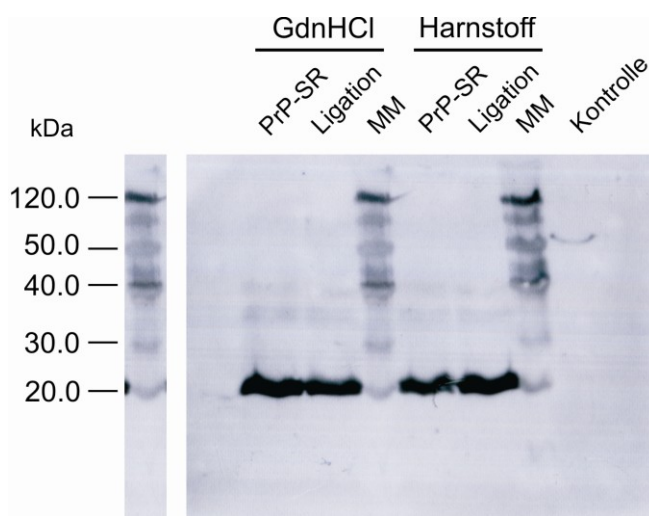


Abbildung 39: Immunologischer Nachweis des PrP-Thioesters (PrP-SR), sowie des Ligationsprodukts PrP-GPI nach Western Transfer mit anti-Flag Antikörper; Zur Kontrolle wird BAP-Flag eingesetzt und als Marker wird MagicMarker (MM) von Invitrogen verwendet.

Nach Inkubation werden die Proben mittels TCA gefällt und anhand eines Western Transfers mit anti-Flag Antikörper analysiert. Hierbei zeigt sich, dass der Prion-Thioester mit einer Masse von 16,5 kDa ebenfalls mit dem anti-Flag Antikörper detektiert wird, obwohl er keinen Flag-Tag besitzt. Bei erfolgter Ligation würde man eine Masse von 21,1 kDa erwarten. Allerdings kann anhand des Western Blots kein Unterschied zwischen der PrP-SR- und der Ligation-Probe detektiert werden. Zum einen ist der Massenunterschied von 4,8 kDa sehr gering und zum anderen sind die Banden zu intensiv, um zu bestimmen, ob es sich lediglich um eine einzelne Bande oder eine Doppelbande handelt.

4.6. Lokalisationsuntersuchungen von PrP-GPI

4.6.1. Immunfluoreszenzanalyse und PI-PLC Verdau des PrP-GPI

Um die GPI-Verankerung des PrP-GPI, sowie seine Zelllokalisierung zu bestimmen, werden Hefezellen, welche das Kre5p-PrP-Gas1p-Konstrukt exprimieren, mit Hilfe der Immunfluoreszenz untersucht. Dazu wird nach Expression des Proteins in den Hefen die Zellwand durch Lytikase verdaut, so dass es zur Entstehung von Sphäroblasten kommt. Die Plasmamembran bleibt hierbei unversehrt, kann aber unter Einsatz von Triton X-100 künstlich permeabilisiert werden.

Als Erstantikörper wird bei allen Messungen anti-PrP 4H11 Antikörper, als Zweitantikörper dient anti-Maus-IgG Antikörper, welcher TRITC-markiert ist. Alle Messungen erfolgen an einem konfokalen Leica TCS SP 5 Mikroskop.

Inkubiert man die Zellen mit anti-PrP 4H11 Antikörper ohne die Plasmamembran zuvor zu permeabilisieren, kann der Antikörper nur an die Proteine binden, welche sich auf der Außenseite der Plasmamembran befinden. Abbildung 40 zeigt eine solche Membranfärbung der Zellen. Das GPI-verankerte Prion Protein ist demnach eindeutig auf der Außenseite der Plasmamembran lokalisiert. Diese Lokalisation umfasst den gesamten Außenbereich der Zelle, wobei Bereiche mit einer erhöhten Immunfluoreszenz zu erkennen sind. Um auszuschließen, dass es sich um eine unspezifische Antikörperreaktion handelt, wird der TRITC-konjugierte Zweitantikörper bezüglich seiner Hintergrundfluoreszenz untersucht. Hierbei werden Hefezellen, welche das PrP-GPI exprimieren, nur mit diesem Zweitantikörper inkubiert.

Es kann zwar eine geringe Hintergrundfluoreszenz detektiert werden (Abbildung 40, Kontrolle), jedoch ist diese im Vergleich zur Immunreaktion mit beiden Antikörpern sehr schwach. Bei Permeabilisierung der Zellen mit Triton X-100 wird die Plasmamembran durchlässig für die Antikörper. Dadurch ist es möglich, das PrP-GPI zusätzlich innerhalb der Zelle zu detektieren. In Abbildung 40 (Zellen permeabilisiert mit Triton X-100) erkennt man, dass das Protein während der Expression in der gesamten Zelle verteilt ist. Hierbei sind innerhalb der Zelle neben Bereichen mit einer erhöhten Fluoreszenzintensität auch Bereiche ohne Fluoreszenz zu finden. Die erhöhte Fluoreszenz ist als deutliches Netzwerk innerhalb der Zelle zu erkennen. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um Zellorganellen wie das ER oder den Golgi-Apparat, welche an

der posttranslationalen Modifikation des GPI-verankerten Proteins beteiligt sind. Dadurch kommt es zu einer verstärkten Lokalisation des Proteins in diesen Bereichen. Von den Organellen aus wird das Protein zur Außenseite der Plasmamembran transportiert, welche ebenfalls eine erhöhte Fluoreszenzintensität aufweist.

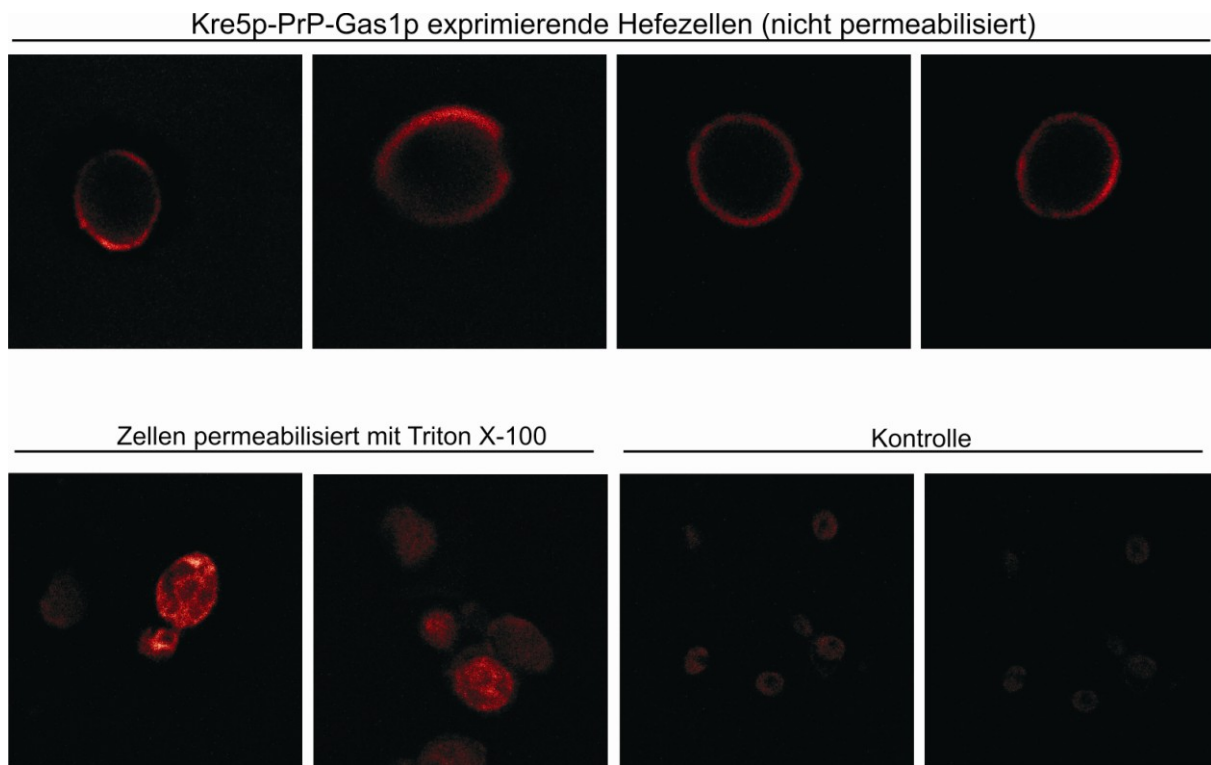


Abbildung 40: Immunfluoreszenzanalyse von PrP-GPI. Detektiert mit anti-PrP 4H11 Erstantikörper und TRITC-konjugiertem Zweitantikörper. Zur Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz werden die Kre5p-PrP-Gas1p exprimierenden Zellen mit Triton X-100 permeabilisiert oder nur mit dem Zweitantikörper inkubiert (Kontrolle).

In den zytoplasmatischen Bereichen der Zelle hingegen, kann nur eine schwache bis gar keine Fluoreszenz detektiert werden. Hierbei handelt es sich entweder um Hintergrundfluoreszenz durch unspezifische Bindungen des Antikörpers oder Protein, welches ins Zytoplasma der Zelle abgegeben wurde. Die Fluoreszenzaufnahmen zeigen somit deutlich, dass das Prion Protein innerhalb der Hefezellen exprimiert und anschließend über das ER und den Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportiert wird.

Um sicherzustellen, dass das Prion Protein auf der Plasmamembran GPI-verankert ist, werden Experimente mit phosphatidylinositol-spezifischer Phospholipase C (PI-PLC) durchgeführt. Diese hydrolysiert die Phosphodiesterbindung zwischen dem Glycerin des

DAG und der Phosphatgruppe des Phosphoinositols am GPI-Anker. Dadurch kommt es, unter Bildung eines glykopeptid-gebundenen zyklischen Inositol-1,2-phosphats (IcP), zur Freisetzung des Proteins in den Überstand. Das dabei abgespaltene DAG bleibt an der Zellmembran gebunden. Proteine, welche eine zusätzliche Palmitoylierung am Inositol aufweisen, können nicht durch die Behandlung mit PI-PLC von der Plasmamembran abgespalten werden, da durch die zusätzliche Modifikation die Ausbildung der zyklischen 1,2-Phosphodiesterbindung verhindert wird.

Für dieses Experiment werden anstelle der Hefezellen mammalische N2a-Zellen verwendet, welche zuvor mittels Lipofectamin mit dem Plasmid pcDNA3.1-Kre5p-PrP-Gas1p transfiziert wurden. Der Vorteil in der Verwendung von N2a Zellen liegt zum einen darin, dass es sich um Neuroblastomazellen handelt, welche endogenes Prion Protein exprimieren und somit für weitere Untersuchungen bezüglich der Konformationsänderung des Prion Proteins verwendet werden können. Außerdem lassen sich diese Zellen stabil mit Scrapie transfizieren (ScN2a). Zum anderen besitzen diese Zellen keine Zellwand, so dass Artefakte durch die Lytikasebehandlung ausgeschlossen werden können.

Der PI-PLC Verdau erfolgt in PBS-Puffer mit Ca^{2+} und Mg^{2+} für 3 h bei 37°C. Anschließend wird das Medium abgenommen und die im Medium vorhandenen Proteine mittels TCA präzipitiert. Die Zellen werden lysiert und sowohl Medium als auch Lysat mittels Western Blot analysiert (Abbildung 41).

Als Kontrolle für den PI-PLC Verdau wird Maus-PrP (wtPrP) verwendet. Man erkennt deutlich die Expression der Proteine in den Zellen (Abbildung 41, Lysat ohne PI-PLC), wobei die Expressionsrate des wtPrP gegenüber dem PrP-GPI etwas erhöht ist. Zusätzlich sind bei beiden Proteinen die verschiedenen Glykosylierungsmuster zu erkennen. Inkubiert man nun die Zellen mit der PI-PLC kommt es zu einer Abnahme der Proteinkonzentration in den Zellen. Dies deutet darauf hin, dass das GPI-verankerte PrP in das Medium abgegeben wird. Allerdings kann weiterhin ein Teil des Proteins auch nach Behandlung mit PI-PLC im Lysat detektiert werden. Hierbei handelt es sich größtenteils um das unglykosylierte Prion Protein (Abbildung 41, Lysat mit PI-PLC).

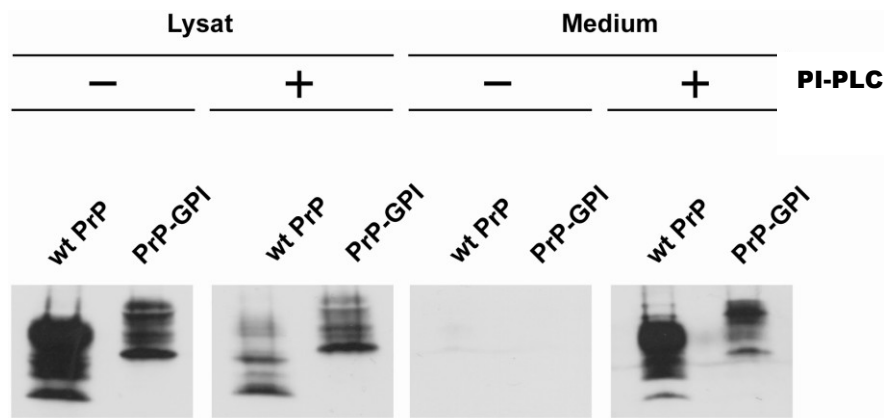


Abbildung 41: Expression von PrP-GPI in N2a Zellen mit anschließendem PI-PLC Verdau. Medium und Lysat werden mittels Western Blot mit anti-PrP 3F4 Antikörper analysiert. Als Kontrolle dienen Zellen ohne PI-PLC Verdau.

Im Medium ist ohne die Zugabe der PI-PLC kein Protein zu detektieren. Nach Inkubation mit PI-PLC kann das PrP dagegen deutlich durch den anti-PrP 3F4 Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 41, Medium mit PI-PLC). Diese Ergebnisse zeigen, dass das Prion Protein, trotz Verwendung der hefespezifischen N- und C-terminalen Signalsequenzen, posttranslational modifiziert und über den GPI-Anker an der äußeren Plasmamembran verankert wird.

4.6.2. Untersuchung der zellulären Aufnahme des Bodipy®-markiertem PrP-GPI

Um die Insertion des Prion Proteins über den GPI-Anker in die Membranen lebender Zellen *in vivo* genauer untersuchen zu können, wird das Prion Protein mit Bodipy® markiert und die Zellen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Diese Untersuchungen wurden von Melanie Wulff durchgeführt⁹². Hierzu wird das in Hefen exprimierte Prion Protein denaturierend aufgereinigt und vor der Markierung in seine native Konformation zurückgefaltet. Dadurch wird gewährleistet, dass sich die Cysteine des Prion Proteins in einer Disulfidbrücke befinden und nur das zusätzlich eingeführte Cystein mit Bodipy® FL N-(2-aminoethyl)maleimid markiert wird.

Für die anschließenden Immunfluoreszenzuntersuchungen werden murine Neuroblastomazellen (N2a) mit einer Suspension des fluoreszenzmarkierten Prion Proteins für 1h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Vor der Immunofärbung mit anti-PrP 4H11 Antikörper und TRITC-konjugiertem Anti-Maus IgG Antikörper werden die Zellen mit

Paraformaldehyd für 10 min. fixiert. Das Ergebnis der Reaktion ist in Abbildung 42 dargestellt.

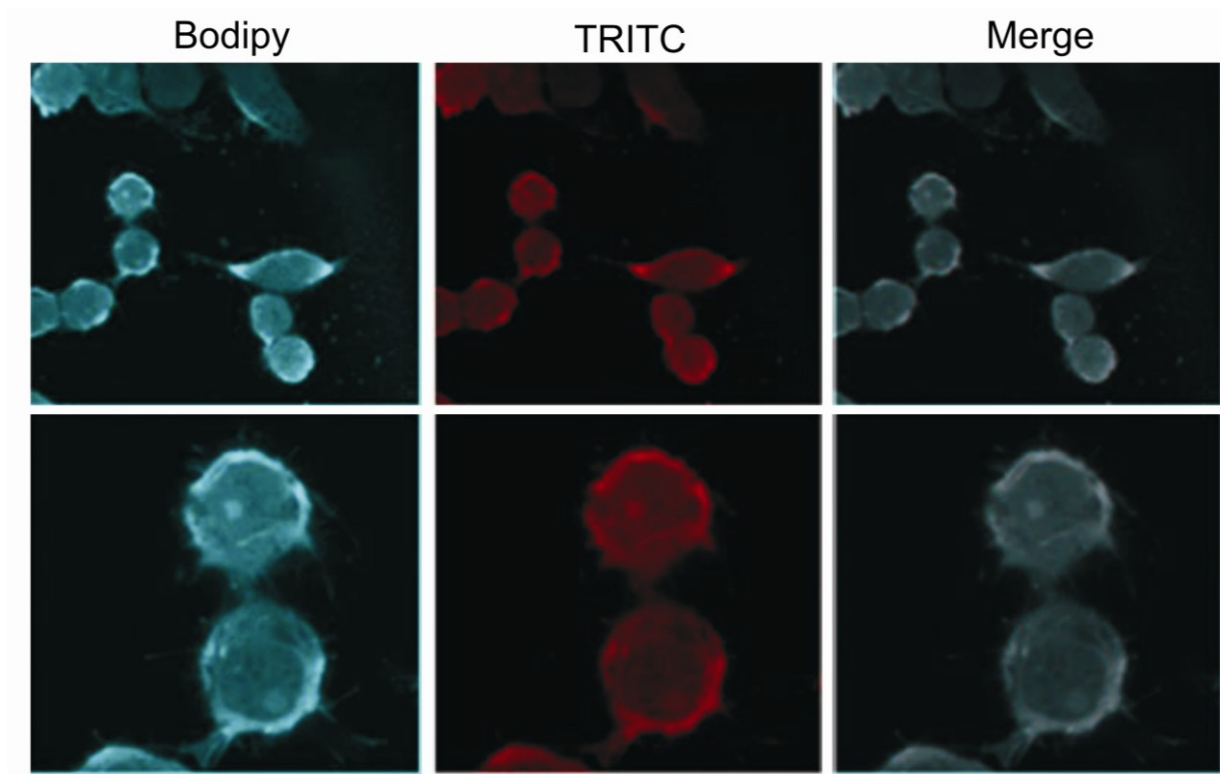


Abbildung 42: N2a-Zellen inkubiert mit Bodipy®-markiertem Prion-Protein. Die Immunofärbung erfolgt mit anti-PrP 4H11 und TRITC-konjugiertem anti-Maus IgG Antikörpern (Abbildung entnommen und modifiziert nach Wulff⁹²).

Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass die stärkste Fluoreszenzintensität, sowohl für das Bodipy®-markierte Prion als auch für das mittels Immunofluoreszenz detektierte Prion Protein, auf der Zelloberfläche gemessen wird. Die Fluoreszenz ist allerdings nicht gleichmäßig auf der Zelloberfläche verteilt. Es gibt Bereiche auf der Zelloberfläche an denen keine Fluoreszenz gemessen wird. Dies deutet darauf hin, dass das Protein nur in bestimmten Regionen der Membran verankert wird und dort größtenteils als Proteincluster vorliegt. Zusätzlich kann Fluoreszenz innerhalb der Zelle im Zytoplasma nachgewiesen werden. Neben der diffusen Verteilung im Zellinnern können auch hier Strukturen mit einer erhöhten Fluoreszenzintensität detektiert werden. Diese sind teilweise als feines Netzwerk zu erkennen. Hierbei könnte es sich um Zellorganellen oder Transportvesikel handeln, welche das Prion Protein bei einem Internalisierungsprozess anreichern.

Um genauer zu untersuchen, ob das Protein nach Verankerung an der Zellmembran anschließend in die Zelle aufgenommen wird, werden zeitabhängige Messungen an lebenden N2a Zellen durchgeführt. Hierbei wird das Bodipy®-markierte Prion Protein auf die Zellen gegeben, inkubiert, gewaschen und die Fluoreszenzintensität des Bodipy® ohne vorherige Fixierung detektiert (Abbildung 43).

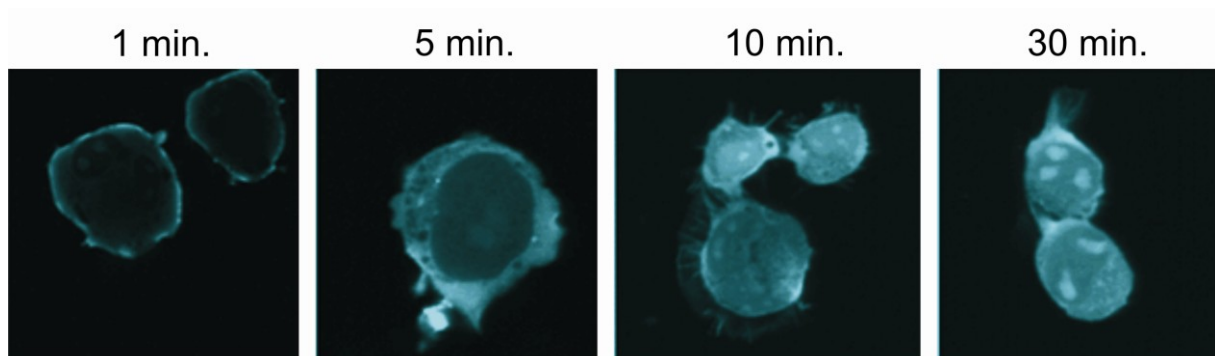


Abbildung 43: Zeitabhängige Messungen der Internalisierung des Bodipy®-markierten Prion Proteins an N2a-Zellen (Abbildung entnommen und verändert nach Wulff⁹²).

Bei einer Inkubation des Prion Proteins von 1 min. ist die Fluoreszenzintensität nur an der Zelloberfläche zu detektieren. Hierbei zeigt sich eine relativ gleichmäßige Verteilung des Prion Proteins auf der Zellaußenseite. Im Inneren der Zelle wird kein Protein detektiert. Bereits nach einer Inkubation von 5 min. erkennt man die Zunahme der Fluoreszenz im Zytoplasma der Zelle. Der Zellkern wird dabei nicht angefärbt. Bei längerer Inkubation (10 min.) kommt es zu einer weiteren Zunahme der Fluoreszenz im Zellinneren, wobei nach einer Inkubationszeit von 30 min. keine Änderung der Fluoreszenzintensität im Zellinnern mehr detektiert wird.

Innerhalb der Zelle sind nach den längeren Inkubationszeiten (10 bzw. 30 min.) Bereiche mit einer erhöhten Fluoreszenzintensität zu erkennen. Diese grenzen sich als eindeutige Strukturen vom Zytoplasma der Zelle ab. Hierbei handelt es sich vermutlich um Zellorganellen, welche an der Internalisierung des Proteins beteiligt sind. Dazu zählen neben den Transportvesikeln auch die Lysosomen und Endosomen. Eine genaue Charakterisierung der Organellen kann nur durch eine spezifische Färbung erreicht werden.

4.7. Untersuchung des Aggregationsverhaltens von PrP-GPI

Ein wichtiger Schritt in der Pathogenese der Prion-Erkrankungen ist die Konformationsänderung des α -helikalen PrP^C in seine pathogene Isoform PrP^{Sc}. Aufgrund des erhöhten Anteils an β -Faltblattstrukturen des fehlgefalteten PrP^{Sc} kommt es zur Ausbildung fibrillärer Strukturen, welche eine erhöhte Resistenz gegenüber proteolytischen Verdau mit Proteinase K aufweisen. Die Bildung der amyloiden Strukturen läuft über ein teilweise entfaltetes Intermediat ab, welches zunächst lösliche Oligomere bildet, die anschließend zu Fibrillen assemblieren³⁵. Die Generierung solcher amyloiden Strukturen aus rekombinanten Prionen wird *in vitro* durch die Inkubation unter leicht denaturierenden Bedingungen erreicht. Hierbei wird postuliert, dass der pH-Wert des Puffers einen Einfluss auf die Bildung von Oligomeren (pH 3.7) bzw. Fibrillen (pH 6.8) hat⁹⁰.

Um das Aggregationsverhalten des Prion Proteins mit GPI-Verankerung (PrP-GPI) unter den verschiedenen Pufferbedingungen genauer zu untersuchen, wird das Protein mittels PD10-Säule in die verschiedenen Puffer aufgenommen und für 1-3 Tage bei 37°C inkubiert. Die Umfaltung wird zunächst mittels Gelfiltration analysiert (Abbildung 44). Dazu wird das Prion Protein aus einer Stammlösung in 6 M GdnHCl in 20 mM NaOAc pH 5.0 umgepuffert (α -PrP). Das Prion Protein eluiert bei einem Volumen von 4 mL von der Gelfiltrationssäule. Hierbei wird nur ein Peak bei 280 nm detektiert, welcher dem monomeren Prion Protein (α -PrP) mit einem Molekulargewicht von ~ 40 kDa, zugeordnet werden kann. Für alle weiteren Untersuchungen wird das monomere Prion Protein als Ausgangsprotein verwendet und in die jeweiligen Puffer umgepuffert. Die Inkubation erfolgt für mehrere Tage bei 37°C, wobei jeweils Proben vor der Inkubation bei 37°C (0 h), sowie nach 3 h bzw. 47 h Inkubation entnommen und mittels Gelfiltration untersucht werden, wobei nur Moleküle mit einer Masse von bis zu 700 kDa analysiert werden können. Größere Strukturen, wie Fibrillen, werden mit dieser Methode nicht erkannt, sondern befinden sich im Ausschlussvolumen der Säule.

Betrachtet man die zeitabhängige Messung des Prion Proteins in Puffer A (1 M GdnHCl, 3 M Harnstoff, 150 mM NaCl, 20 mM NaOAc pH 3.7), erkennt man die Abnahme der Absorption bei 280 nm bei einem Elutionsvolumen von 4 mL. Stattdessen ist eine Zunahme von zwei Peaks bei 3,5 und 2,3 mL Elutionsvolumen detektierbar, wobei die

Absorption des Peaks bei 2,3 mL über die Zeit stark zunimmt. Die Absorption bei einem Elutionsvolumen bei 3,5 mL hingegen zeigt nur eine geringe Zunahme.

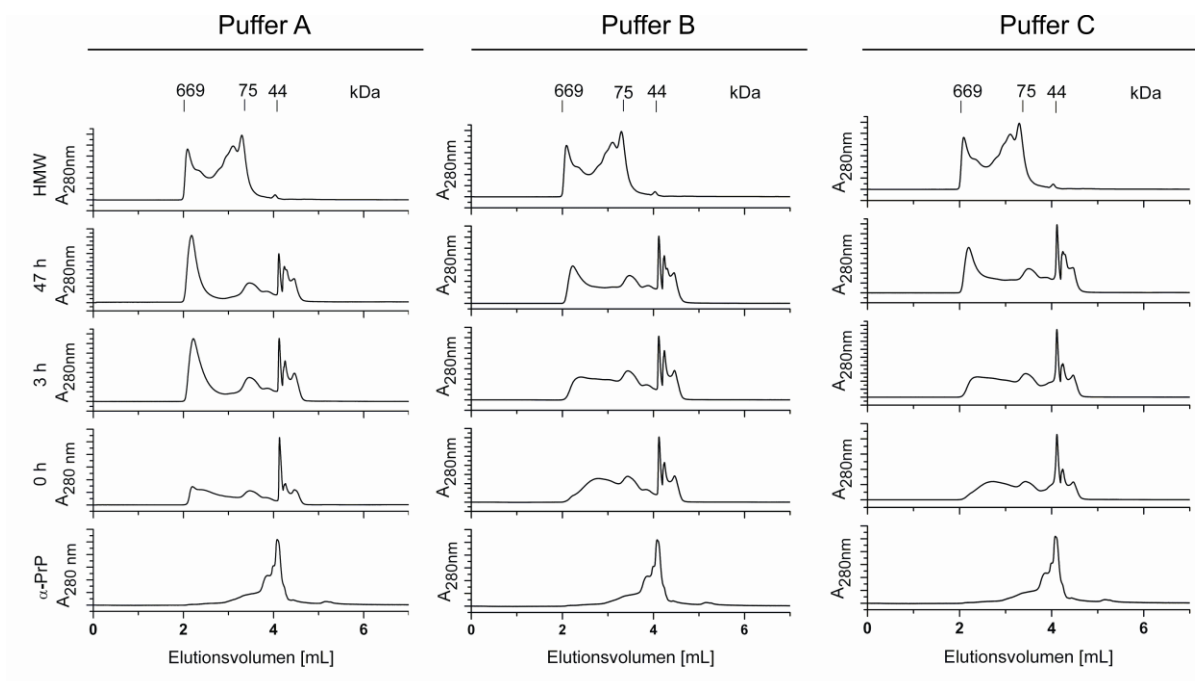
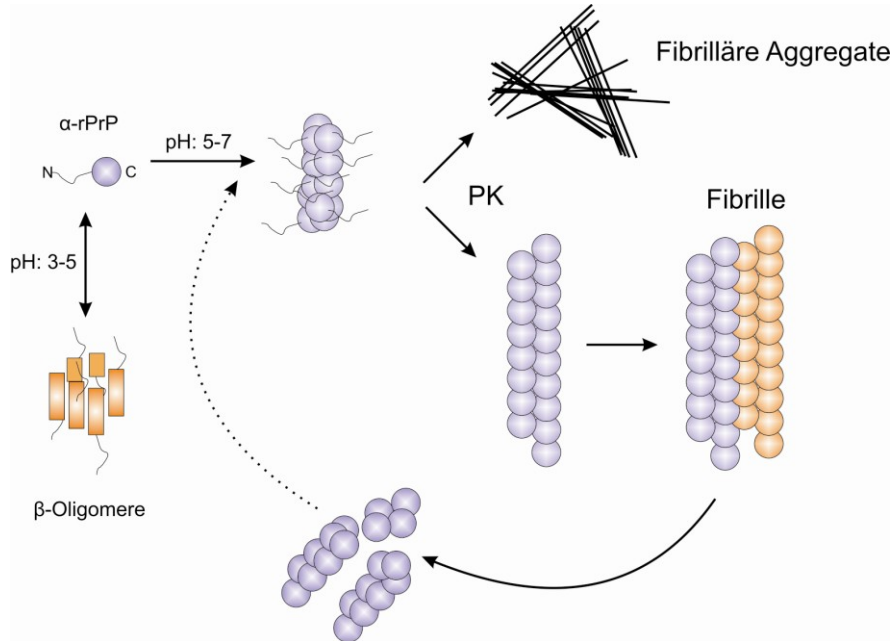


Abbildung 44: Zeitabhängige Analyse der Oligomerisierung des Prion Proteins mittels Gelfiltration unter verschiedenen Pufferbedingungen, Puffer A: 1 M GdnHCl, 3 M Harnstoff, 150 mM NaCl, 20 mM NaOAc pH 3.7; Puffer B: 1 M GdnHCl, 3 M Harnstoff, 150 mM NaCl, 20 mM NaOAc pH 5.5; Puffer C: 1 M GdnHCl, 3 M Harnstoff, 150 mM NaCl, PBS, pH 6.8.

Auffällig ist, dass bereits vor der Inkubation der Probe bei 37°C (0 h) die Entstehung von größeren Strukturen beobachtet werden kann. Zwar ist die Absorption der Peaks bei 3,5 und 2,5 mL Elutionsvolumen geringer als bei den Proben, welche über einen längeren Zeitraum bei 37°C inkubiert wurden, jedoch sind diese beiden Peaks bei der Analyse des monomeren Prion Proteins noch nicht zu detektieren. Hierbei könnte es sich um Oligomere des Prion Proteins handeln. Die Proteine bei einem Elutionsvolumen von 3,5 mL haben ein durchschnittliches Molekulargewicht von 75 kDa und die bei 2,3 mL von 669 kDa (vgl. hierzu Spektrum des HMW-Marker). Es handelt sich somit wahrscheinlich um das Prion Dimer (~80 kDa) und Oligomere aus ungefähr 16 Prion Protein Monomeren (640 kDa).

Vergleicht man dazu die Spektren der Proteine in Puffer B (1 M GdnHCl, 3 M Harnstoff, 150 mM NaCl, 20 mM NaOAc pH 5.5) und C (1 M GdnHCl, 3 M Harnstoff, 150 mM NaCl in PBS pH 6.8), kann man ebenfalls das Auftreten und die Zunahme der Peaks, bereits vor der Inkubation der Proben bei 37°C, bei einem Elutionsvolumen von 3,5 mL und 2,3 mL erkennen. In beiden Puffern ist die Menge an gebildeten Prion Dimer mit der Probe in Puffer A vergleichbar (Absorption bei 3,5 mL). Allerdings erkennt man deutliche Unterschiede bei der Oligomerisierung des Proteins. So kommt es erst nach einer Inkubationszeit der Probe von 47 h zur Entstehung von Oligomeren, welche zusätzlich eine geringere Absorption bei 2,3 mL aufweisen als die Probe in Puffer A. Die Probe in Puffer C zeigt zwar einen höheren Anteil an Oligomeren als die Probe in Puffer B, jedoch werden in beiden Proben weniger Oligomere detektiert als bei der Probe in Puffer A. Somit scheint die Oligomerisierung des Prion Proteins bei einem pH-Wert des Puffers von 3.7 begünstigt zu sein.

Da mit Hilfe der Gelfiltration nur die Oligomerisierung des Prion Proteins und nicht die Fibrillenbildung untersucht werden kann, wird die Bildung amyloider Strukturen zunächst über die Interaktion spezieller Farbstoffe analysiert werden. Ein Farbstoff, welcher in der Diagnostik von Amyloidosen häufig verwendet wird, ist Thioflavin T (ThT). ThT assoziiert mit den entstandenen Fibrillen und führt zu einer batho- und hyperchromen Verschiebung der Fluoreszenz des ThT/Amyloidkomplexes gegenüber der des freien Farbstoffs.

Für diese Messung werden Proben des Prion Proteins in den verschiedenen Puffern nach 0 h, 3 h und 47 h Inkubation genommen, mit 10 µM ThT versetzt und die Emission bei 485 nm mit Hilfe eines Fluoreszenzspektrometers detektiert.

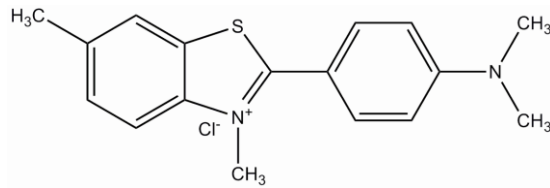


Abbildung 45: Strukturformel von Thioflavin T (ThT)

Das Ergebnis ist in Abbildung 46 oben dargestellt. Betrachtet man zunächst die Probe in Puffer A mit einem pH-Wert von 3.7, so erkennt man, dass die Fluoreszenzintensität nach Inkubation von 3 h im Vergleich zur Ausgangsprobe (0 h) abnimmt und erst bei weiterer Inkubation bei 37°C wieder ansteigt (47 h). Die Probe in Puffer B mit einem pH-Wert von 5.5 zeigt schon bei der Ausgangsprobe die höchste Fluoreszenzintensität verglichen mit den beiden anderen Proben. Jedoch ist auch hier keine Zunahme der Fluoreszenzintensität nach 3 h Inkubation zu erkennen. Erst bei weiterer Inkubation ist ein Anstieg der Fluoreszenzintensität detektierbar. Die Probe in Puffer B weist hierbei mit ~50000 cps den höchsten Wert von allen Proben auf. Die Probe in Puffer C zeigt ebenfalls einen Anstieg in der Fluoreszenzintensität nach Inkubation bei 37°C. So kommt es zu einer kontinuierlichen Zunahme der Fluoreszenzintensität, jedoch weist die Probe in Puffer C nach einer Inkubation von 47 h die geringste Fluoreszenzintensität (~ 35000 cps) aller drei Proben auf.

Anhand dieser Daten lässt sich festhalten, dass die Probe in Puffer B (1 M GdnHCl, 3 M Harnstoff, 150 mM NaCl, 20 mM NaOAc pH 5.5) die höchste Tendenz zur Bildung amyloider Fibrillen aufweist. Die Proben in Puffer A (1 M GdnHCl, 3 M Harnstoff, 150 mM NaCl, 20 mM NaOAc pH 3.7) und C (1 M GdnHCl, 3 M Harnstoff, 150 mM NaCl, PBS, pH 6.8) sind zwar auch in der Lage amyloide Fibrillen auszubilden, jedoch zeigen sie eine geringere Fluoreszenzintensität.

Betrachtet man die Fibrillenbildung über einen Zeitraum von 120 h (Abbildung 46, unten) so zeigt sich, dass es zu einer Annäherung der Fluoreszenzintensitäten der Proben unter den verschiedenen Pufferbedingungen kommt. Zwar zeigt die Probe in Puffer B einen schnelleren Anstieg in der Fluoreszenzintensität und geringere Schwankungen während der Messung, jedoch kann bei der Probe in Puffer A nach einer Inkubationszeit von 120 h bei 37°C die gleiche Fluoreszenzintensität wie bei der Probe in Puffer B (~ 50000 cps) detektiert werden. Lediglich die Probe in Puffer C zeigt eine

geringere Tendenz zur Fibrillenbildung. Die Fluoreszenzintensität steigt hier nur langsam an und erreicht nach 120 h einen Maximalwert von ~ 45000 cps.

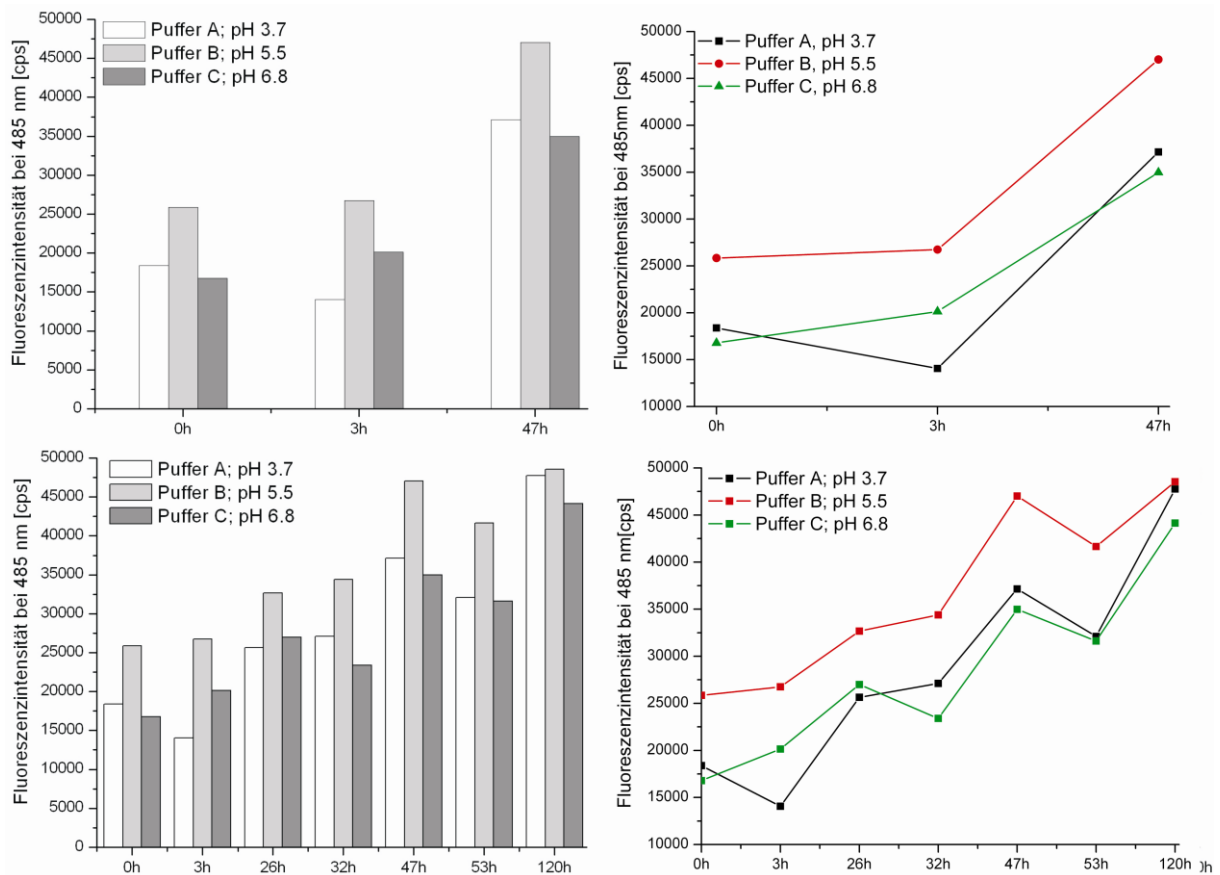


Abbildung 46: Zeitabhängige Analyse der Fibrillenbildung des PrP-GPI mittels Thioflavin T (λ_{EX} : 445 nm; λ_{EM} : 485nm), korrigiert um das Pufferspektrum; Puffer A: 1 M GdnHCl, 3 M Harnstoff, 150 mM NaCl, 20 mM NaOAc pH 3.7; Puffer B: 1 M GdnHCl, 3 M Harnstoff, 150 mM NaCl, 20 mM NaOAc pH 5.5; Puffer C: 1 M GdnHCl, 3 M Harnstoff, 150 mM NaCl, PBS, pH 6.8.

Die mittels ThT-Test erhaltenen Daten verifizieren das Ergebnis der Gelfiltrationsanalyse. So ist die Oligomerisierung des Prion Proteins bei einem pH-Wert des Puffers < 5 begünstigt, wohingegen bei einem pH-Wert des Puffers > 5 es zur Bildung von Fibrillen kommt. Auch hier zeigen bereits die Proben vor Inkubation bei 37°C (0 h) die Entstehung amyloider Strukturen, deren Anzahl und Größe während der weiteren Inkubation (3 h und 47 h) zunimmt. Dies ist ebenfalls bei der Analyse der Proben mittels Gelfiltration zu beobachten. Nach einer Inkubation der Proben für 120 h bei 37°C lässt sich aber erkennen, dass sich die Werte der ThT-Fluoreszenz nach dieser Zeit für die verschiedenen Puffersysteme nicht mehr voneinander unterscheiden. Nur anhand der

Fluoreszenzintensität lassen sich jedoch keine eindeutigen Aussagen darüber machen, ob es sich hierbei um Fibrillen handelt oder ob sich einfach eine vermehrte Anzahl an Oligomeren gebildet hat, da das ThT nicht spezifisch an (eine bestimmte Länge) amyloider Fibrillen bindet. Ferner bindet es an β -faltblattreiche amyloide Oligomere, wobei nur Monomere und kleine Oligomere nicht zu einer Änderung der Fluoreszenzintensität des ThT führen.

Zur genaueren Bestimmung der entstandenen Oligomere und Fibrillen werden die Proben mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) weiter untersucht. Hierbei wird die Diffusionsgeschwindigkeit der Moleküle aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung gemessen, indem die Fluktuationen der Intensität des gestreuten Lichts detektiert werden. Große Moleküle zeigen geringere Fluktuationen in ihrer Intensität über die Zeit als kleinere Moleküle. Dies führt dazu, dass die Korrelation des Signals zu längeren Zeiten verschoben ist.

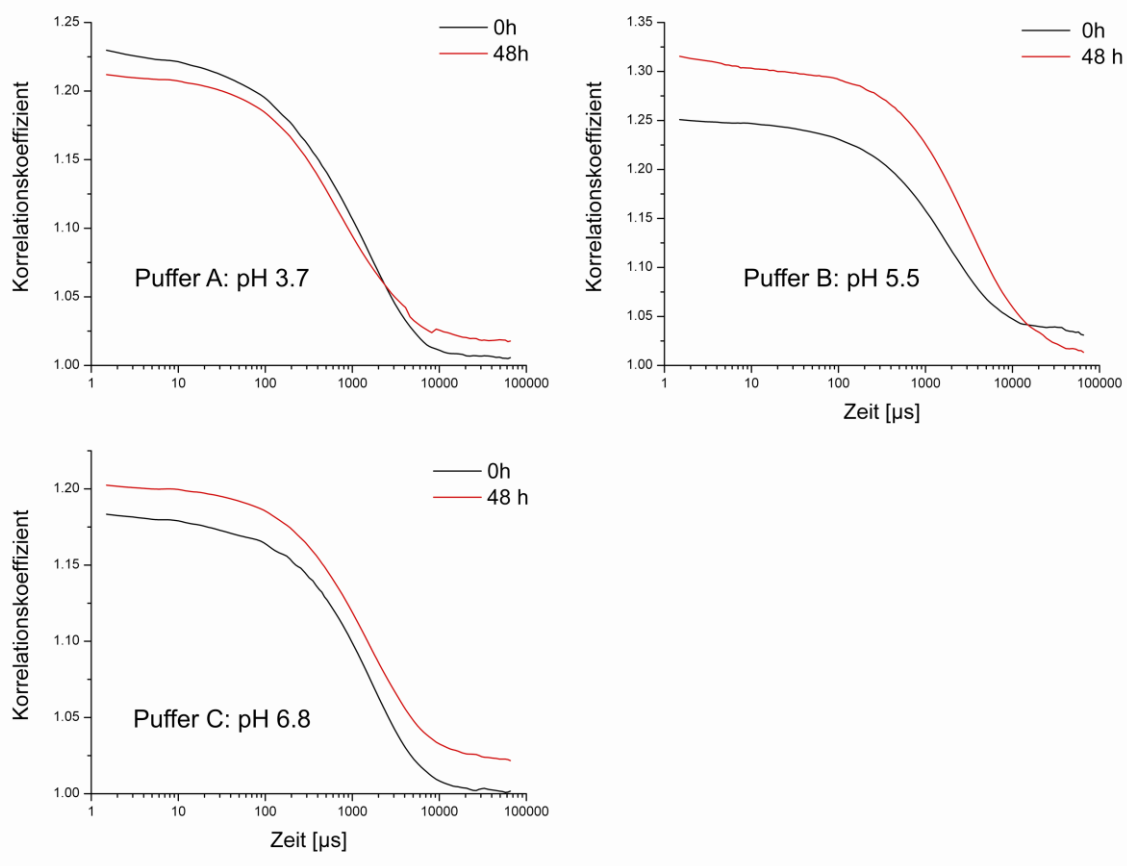


Abbildung 47: Korrelogramm des PrP-GPI, gemessen unter verschiedenen Pufferbedingungen nach einer Inkubationszeit von 0 h (schwarz) bzw. 48 h (rot). Puffer A: 1 M GdnHCl, 3 M Harnstoff, 150 mM NaCl, 20 mM NaOAc pH 3.7; Puffer B: 1 M GdnHCl, 3 M Harnstoff, 150 mM NaCl, 20 mM NaOAc pH 5.5; Puffer C: 1 M GdnHCl, 3 M Harnstoff, 150 mM NaCl, PBS, pH 6.8.

Anhand der Korrelogramme, dargestellt in Abbildung 47, erkennt man bei den Proben in Puffer B und C eine deutliche Verlängerung der Abnahme der Signale nach einer Inkubation der Proben für 48 h (rot) im Gegensatz zu den nicht inkubierten Proben (0 h, schwarz). Lediglich die Probe, welche in Puffer A inkubiert wurde, zeigt eine geringe Änderung in ihrer Abfallrate.

Vergleicht man die Proben untereinander (Abbildung 48) so erkennt man, dass vor Beginn der Inkubation die Korrelationsfunktionen der Proben in Puffer A und C ähnliche Abfallraten aufweisen. Lediglich die Probe in Puffer C (grün) zeigt schon vor der Inkubation bei 37°C die Entstehung größerer Partikel, gekennzeichnet durch die Verschiebung der Korrelationsfunktion. Besonders nach der Inkubation für 48 h bei 37°C wird deutlich, dass bei einem pH von 5.5 (Puffer B, rot) die längste Abfallrate für die Korrelation detektiert wird. Aber auch die Probe in Puffer C zeigt, im Gegensatz zur Probe in Puffer A (pH 3.7), eine längere Abklingzeit der Korrelation. Es kommt also zur Entstehung größerer Partikel abhängig vom eingesetzten Puffer.

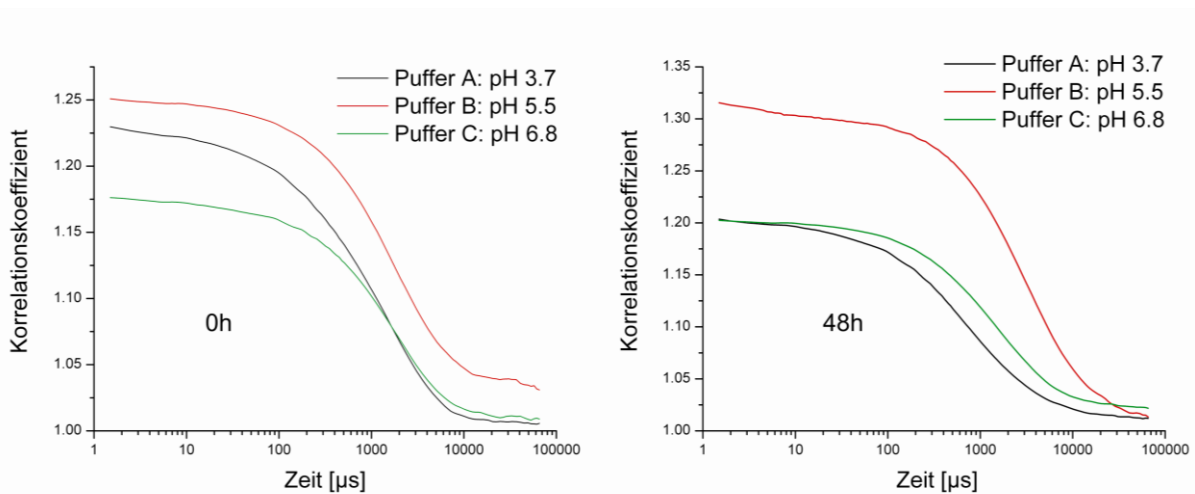
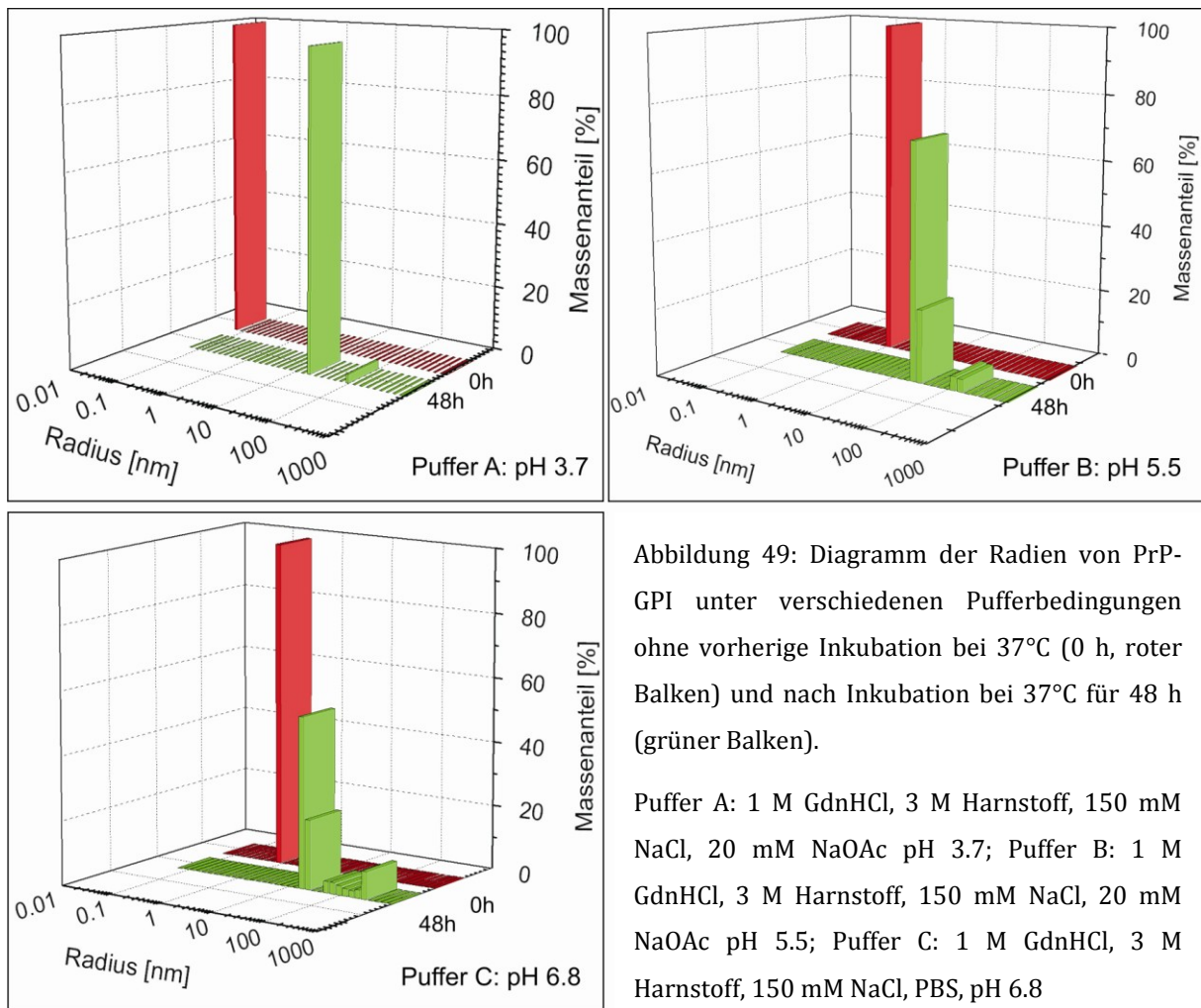


Abbildung 48: Vergleich der Korrelogramme des PrP-GPI unter verschiedenen Pufferbedingungen vor der Inkubation bei 37°C (0 h, links) und nach einer Inkubation bei 37°C für 48 h (rechts). Puffer A: 1 M GdnHCl, 3 M Harnstoff, 150 mM NaCl, 20 mM NaOAc pH 3.7; Puffer B: 1 M GdnHCl, 3 M Harnstoff, 150 mM NaCl, 20 mM NaOAc pH 5.5; Puffer C: 1 M GdnHCl, 3 M Harnstoff, 150 mM NaCl, PBS, pH 6.8.

Um die Größe dieser Strukturen und ihren Massenanteil genauer bestimmen zu können, werden aus den Autokorrelationsfunktionen mit Hilfe der Stokes-Einstein-Beziehung, unter Annahme einer globulären Struktur der Proteine, die Radien ermittelt. Die Probe

in Puffer A (pH 3.7) zeigt bei Bestimmung der Radien (Abbildung 49) nach 0 h bzw. 48 h, dass es zur Ausbildung größerer Strukturen kommt.



Ohne Inkubation (roter Balken) können in der Probe Strukturen mit einem Radius von unter 0,1 nm mit einem Massenanteil von 100 % detektiert werden. Erst nach einer Inkubation (grüner Balken) von 48 h bei 37°C bilden sich Strukturen aus, die einen Radius von 17 nm (Massenanteil 97 %) bzw. 92 nm (Massenanteil 3 %) aufweisen. Auch in der in Puffer B (pH 5.5) inkubierten Probe können nach einer Inkubationszeit von 48 h größere Strukturen detektiert werden. Vor Inkubation (roter Balken) der Probe werden zu 100 % Proteine mit einem Radius von 1 nm bestimmt. Nach Inkubation jedoch zeigt die Probe eine erhöhte Polydispersität. Hierbei sind Proteine mit einem Radius von 22 nm (Massenanteil 70 %), sowie einem Radius von 30 nm (Massenanteil 32 %) am häufigsten vertreten. Es können aber auch größere Strukturen mit einem Radius von 122 nm bzw. 162 nm detektiert werden, deren Massenanteil mit 4 % relativ gering ist.

Die Probe in Puffer C (pH 6.8) zeigt ebenfalls eine Zunahme der Polydispersität nach Inkubation bei 37 °C für 48 h (grünes Spektrum). Den größten Massenanteil von 74 % weisen Proteine mit einem Molekulargewicht von 22 nm und 22,9 nm auf, gefolgt von Proteinen mit einem Radius von 284 nm mit einem Massenanteil von 8,6 %. Die anderen Radien liegen zwischen 53 nm und 214 nm und haben jeweils einen Massenanteil von 2 – 3 %. Die eingesetzte Probe in Puffer C (0 h, roter Balken) hingegen ist monodispers. Die Moleküle haben hierbei zu 100 % einen Radius von 0,8 nm.

Zum besseren Vergleich der Pufferbedingungen untereinander sind die Diagramme noch einmal in einer Übersicht in Abbildung 50 dargestellt.

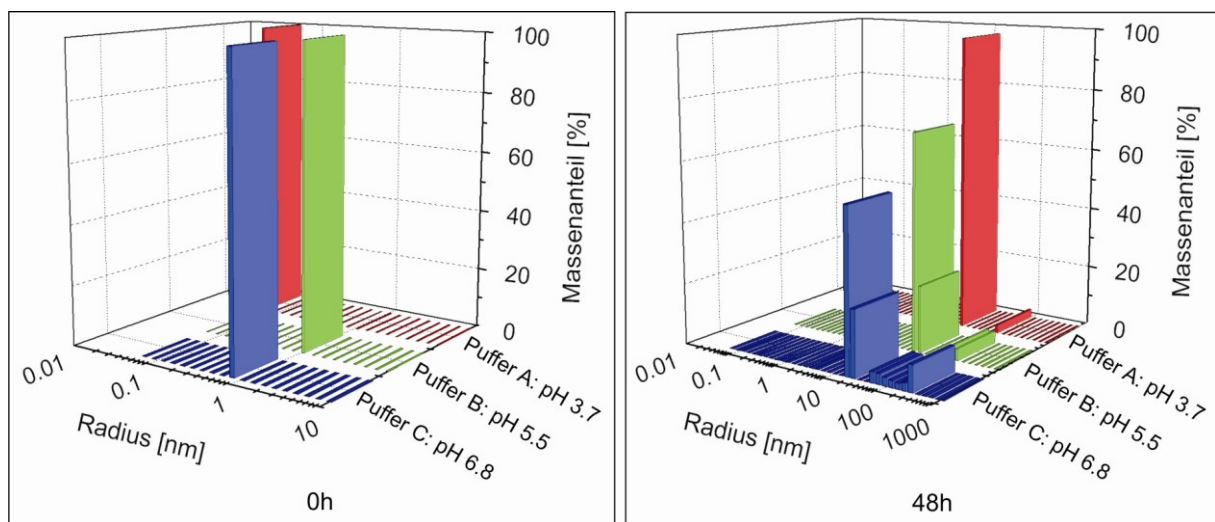


Abbildung 50: Diagramm zum Vergleich der PrP-GPI-Proben unter verschiedenen Pufferbedingungen ohne vorherige Inkubation (0 h, linkes Diagramm) und mit einer Inkubation für 48 h bei 37°C (48 h, rechtes Diagramm). Puffer A: 1 M GdnHCl, 3 M Harnstoff, 150 mM NaCl, 20 mM NaOAc pH 3.7; Puffer B: 1 M GdnHCl, 3 M Harnstoff, 150 mM NaCl, 20 mM NaOAc pH 5.5; Puffer C: 1 M GdnHCl, 3 M Harnstoff, 150 mM NaCl, PBS, pH 6.8.

Hierbei erkennt man, dass es bereits Unterschiede in den Molekülgrößen ohne vorherige Inkubation bei 37°C unter den verschiedenen Pufferbedingungen gibt (Abbildung 50, linkes Diagramm). So haben die Proteine der Probe in Puffer A (pH 3.7; roter Balken) mit 0,1 nm den geringsten Radius, wohingegen die Proteine der Proben in Puffer B (pH 5.5, grüner Balken) und C (pH 6.8; blauer Balken) einen Radius von ~ 1 nm aufweisen. Nach Inkubation der Proben bei 37°C für 48 h kommt es zur Generierung größerer Strukturen. Die Probe in Puffer A ist hierbei monodispers und es werden Strukturen mit einem Radius von 17 nm (97 %) bzw. 92 nm (3 %) gemessen. Die Proben

in den Puffern B und C hingegen sind polydispers. Allerdings zeigen beide Proben eine Proteinspezies mit einem Radius von 22 nm, welche den größten Massenanteil ausmacht. Zwar können in der Probe in Puffer B (grüner Balken) auch größere Moleküle mit einem Radius von 122 nm bzw. 162 nm gemessen werden, allerdings sind die größten Moleküle mit einem Radius von 284 nm und einem Massenanteil von 8,6 % in der in Puffer C inkubierten Probe zu detektieren. Zusätzlich weist diese Probe, im Gegensatz zu den Proben in Puffer A und B, die größte Polydispersität (Radien von 53 nm - 214 nm) auf.

Damit entsprechen diese Ergebnisse denen mit analytischer Gelfiltrationschromatographie und ThT-Assay erhaltenen Daten. Bei einem pH-Wert des Puffers < 5 kommt es bevorzugt zur Bildung von oligomeren Strukturen, wohingegen bei einem pH-Wert des Puffers > 5 zur Ausbildung größerer Strukturen kommt. Zwar können hier auch Oligomere detektiert werden, jedoch ist ihre Anzahl geringer als bei der Probe im Puffer mit einem pH-Wert < 5.

4.8. Darstellung von rPrP-GPI mittels Protein *Trans*-Spleißen

Für die *in vivo* Modifikation des rPrP mit einem GPI-Anker wird die Hamster-Maus Chimäre des Prion Proteins mit einem N-terminalen Fragment des natürlich vorkommenden Split-Inteins *Npu DnaE* aus *Nostoc punctiforme* (PrP-Int^N) und einem His-tag in *E. coli* exprimiert. Die verwendeten Plasmide für den N-, sowie den C-terminalen Teil des Split-Inteins *Npu DnaE* wurden von der AG Prof. H. Mootz der TU Dortmund zur Verfügung gestellt.

Die Aufreinigung des in *E.coli* exprimierten PrP-Int^N erfolgt unter denaturierenden Bedingungen mittels Ni-NTA-Agarose und der anschließenden Rückfaltung des Proteins. Der C-terminale Teil des *Npu DnaE* wird entweder in *S. cerevisiae* oder N2a-Zellen exprimiert. Neben dem C-terminalen Fragment des Split-Inteins besitzt das Konstrukt die Signalsequenzen für die posttranslationale Modifikation des Proteins (Kre5p und Gas1p). Das Gas1p ermöglicht die Modifikation des Proteins mit einem GPI-Anker und die anschließende Verankerung auf der Außenseite der Plasmamembran. Das Schema des Protein *Trans*-Spleißens *in vivo* ist in Abbildung 51 dargestellt.

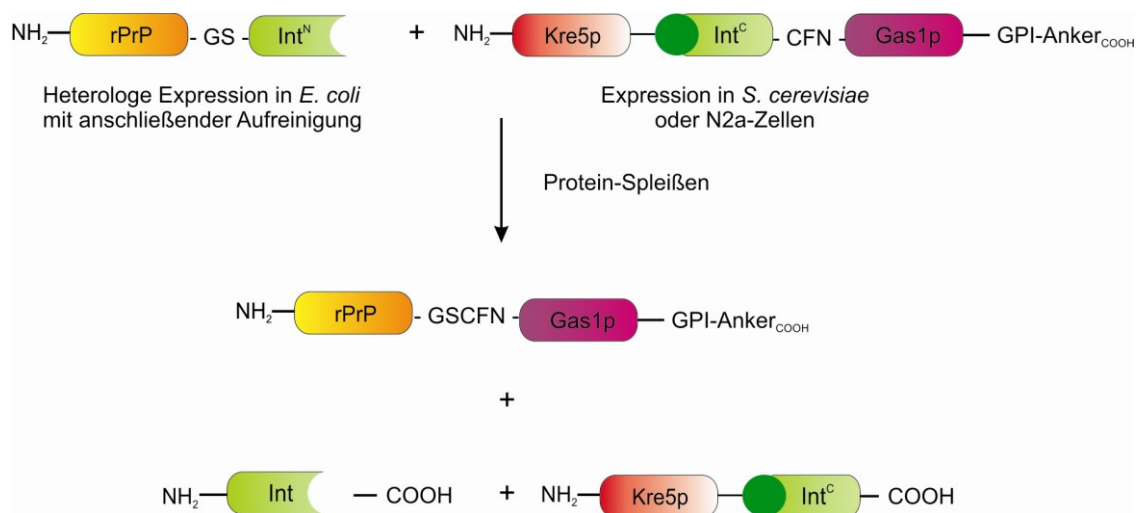


Abbildung 51: Schematische Darstellung des Protein-Trans-Spleißens *in vivo*

4.8.1. Trans-Spleißreaktion von PrP-Int^N an *S. cerevisiae in vivo*

Nach dem Verdau der Zellwand mit Lytikase wird das PrP-Int^N in NaOAc pH 5.5 und 2 mM DTT zu den Hefezellen gegeben und durch den *Trans*-Spleißmechanismus kommt es zur Modifikation des Prion Proteins mit einem GPI-Anker, welcher die Lokalisation des Proteins auf der Zellaußenseite erlaubt. In Abbildung 52 ist zu erkennen, dass die Fluoreszenz nur auf der äußeren Membran der Hefezellen und nicht im Zellinneren detektiert wird. Dies zeigt die Lokalisation des Prion Proteins auf der Außenseite der Hefezelle.

Allerdings ist die Fluoreszenzverteilung nicht gleichmäßig. So gibt es auf der Außenseite Bereiche geringerer Fluoreszenzintensität. Um auszuschließen, dass die Fluoreszenz durch unspezifisch gebundenen Antikörper hervorgerufen wird, werden zur Kontrolle *Trans*-Spleißexperimente mit Wildtyp-Hefezellen durchgeführt, die das Int^C-Fragment des Split-Inteins nicht exprimieren. Sie werden ebenfalls mit dem PrP-Int^N inkubiert und die Lokalisation des Proteins mittels Immunofärbung mit anti-PrP 4H11 und TRITC-konjugiertem anti-Maus IgG Antikörper detektiert (Abbildung 52, Kontrolle). Neben den Zellaufnahmen mittels Differential-Interferenzkontrast (DIC) sieht man die Fluoreszenz des TRITC, sowie eine Überlagerung der beiden Aufnahmen. Die Wildtyp Hefezellen zeigen allerdings nur eine diffuse Fluoreszenz geringer Intensität. Es handelt sich bei

dem Ergebnis somit lediglich um eine leichte Hintergrundfluoreszenz der verwendeten Antikörper oder um auf der Zelloberfläche aggregiertes PrP-Int^N, welches mit Hilfe der Antikörper detektiert wird.

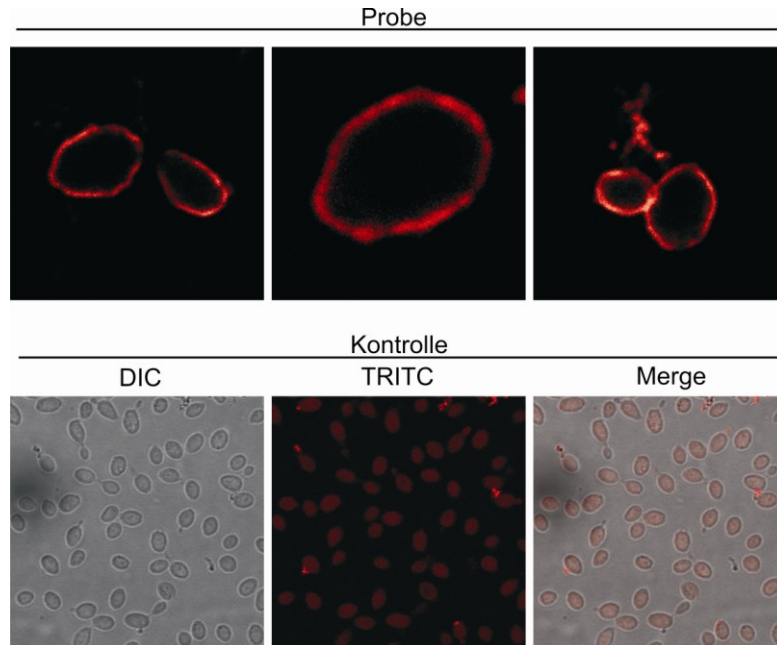


Abbildung 52: *Trans*-Spleißreaktion von PrP-Int^N mit Kre-Int^C-Gas1p exprimierenden Hefezellen (Probe), sowie Kontrollreaktion von PrP-Int^N mit Wildtyp-Hefezellen (Kontrolle). Die Detektion erfolgt mit anti-PrP 4H11 Antikörper und mit TRITC-konjugiertem anti-Maus IgG Antikörper.

Zur genaueren Überprüfung der Reaktion werden in einem nächsten Versuch verschiedene Hefezellen miteinander gemischt und Kontrolle und Probe gemeinsam in einem Reaktionsansatz analysiert. Ein Teil der Hefezellen exprimiert GFP und dient zur Reaktionskontrolle. Der andere Teil der Zellen exprimiert das Kre5p-Int^C-Gas1p und ist somit in der Lage die *Trans*-Spleißreaktion zu durchlaufen. Die Abbildung 53 zeigt neben den Differential-Interferenzkontrast-Aufnahmen (DIC), die Fluoreszenz der GFP-exprimierenden Zellen, die Fluoreszenz der Zellen der *Trans*-Spleißreaktion (TRITC), sowie der Überlagerung der GFP- und TRITC-Fluoreszenz (Merge).

Betrachtet man die Ergebnisse der *Trans*-Spleißreaktion, so erkennt man, ebenso wie in Abbildung 52, die Lokalisation der Fluoreszenz auf der Außenseite der Zelle. Sie ist als deutlicher Ring um die gesamte Zelle zu erkennen. Einige der Zellen zeigen die Fluoreszenz allerdings nur in Teilen der Zelloberfläche. Da man anhand des DIC erkennen kann, dass die Zellen sehr dicht auf den Deckgläschen ausgesät und fixiert

sind, kann es aufgrund von Zell-Zell-Kontakten zu einer unvollständigen *Trans*-Spleißreaktion oder Immunofärbung gekommen sein.

Die GFP-exprimierenden Zellen zeigen bei genauerer Betrachtung ebenfalls eine verstärkte Fluoreszenzintensität auf der Zellaußenseite, welche als Ring sichtbar wird. Zusätzlich sind im Inneren der Zelle Strukturen mit einer erhöhten GFP-Fluoreszenz zu erkennen. Da es sich bei den verwendeten Zellen um Hefezellen handelt, welche GFP-GPI exprimieren, ist dieses ebenfalls auf der Zellaußenseite und in den verschiedenen Strukturen wie dem ER oder Golgi der Zelle zu detektieren (vgl. Kapitel 4.4)

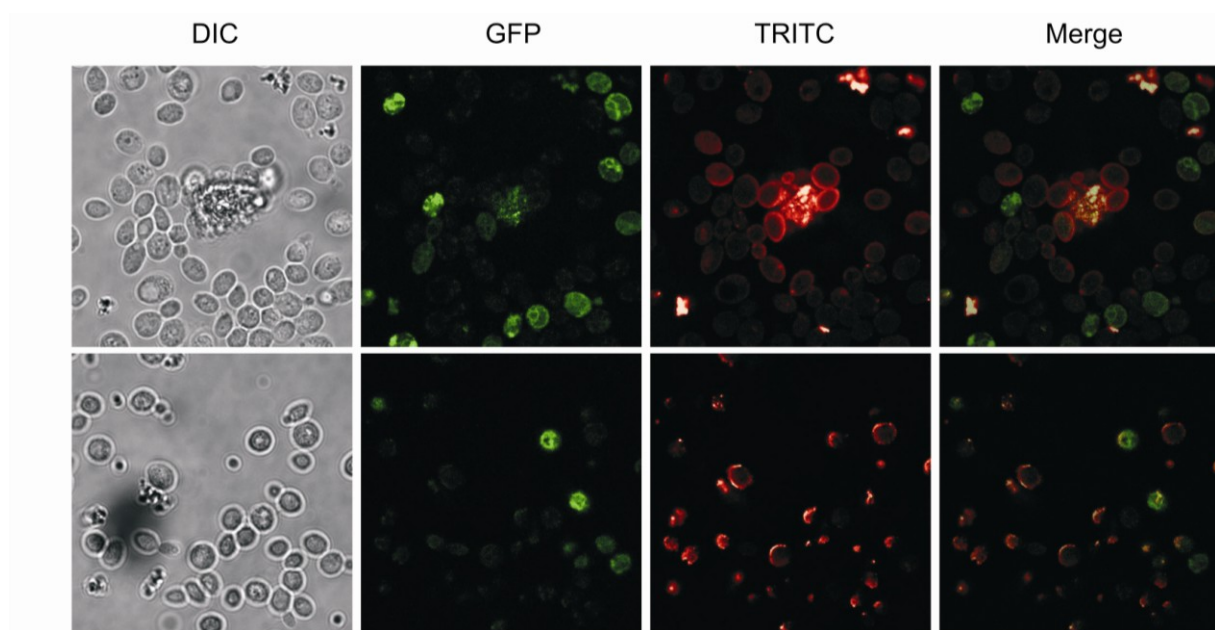


Abbildung 53: *Trans*-Spleißreaktion von PrP-Int^N mit Hefezellen, welche entweder Kre5p-Int^C-Gas1p oder GFP-GPI exprimieren. Hierbei werden die Fluoreszenz des GFP, sowie des TRITC detektiert.

Anhand der in Abbildung 53 dargestellten Überlagerung der beiden Fluoreszenzen (Merge) erkennt man sehr deutlich, dass es keine gemeinsame Lokalisation der GFP- und der TRITC-Fluoreszenz gibt. Es kommt zu keiner Reaktion des PrP-Int^N mit den GFP-GPI exprimierenden Zellen und auch die zuvor in Abbildung 52 detektierte Hintergrundfluoreszenz ist vernachlässigbar. Das PrP-Int^N reagiert hierbei nur mit den Zellen, welche das C-terminale Fragment des Split-Inteins exprimieren und auf der Zelloberfläche präsentieren. Eine Aussage darüber, ob es sich hierbei jedoch nur um eine Assoziation der beiden Intein-Fragmente oder um eine vollständige *Trans*-Spleißreaktion handelt, kann anhand dieses Experiments nicht beurteilt werden. So kann es unter anderem zu einer Zusammenlagerung der beiden Inteinhälften

kommen, ohne dass eine Verknüpfung der beiden Exteine (rPrP und Gas1p-GPI) erfolgt. In diesem Fall verbleiben die beiden Inteinhälften in dem Konstrukt und eine Modifikation des rPrP mit dem GPI-Anker findet nicht statt.

4.8.2. *Trans*-Spleißreaktion von PrP-Int^N an N2a-Zellen *in vivo*

Da bei der Verwendung der Hefezellen für die *Trans*-Spleißreaktion die Zellwand vor der eigentlichen Reaktion mittels Lytikase verdaut werden muss und die Zellen für die anschließende Immunfärbung mittels FluorSave Reagent® auf den Deckgläsern fixiert werden müssen, werden in weiteren Versuchen murine Neuroblastomazellen (N2a) für die *Trans*-Spleißreaktion verwendet. Diese bieten den Vorteil, dass sie als Monolayer in Zellkulturschalen wachsen und anders als die Hefen keine Zellwand besitzen. Sie können somit direkt für die *Trans*-Spleißreaktion eingesetzt werden und Artefakte aufgrund von Vorbehandlungen werden reduziert.

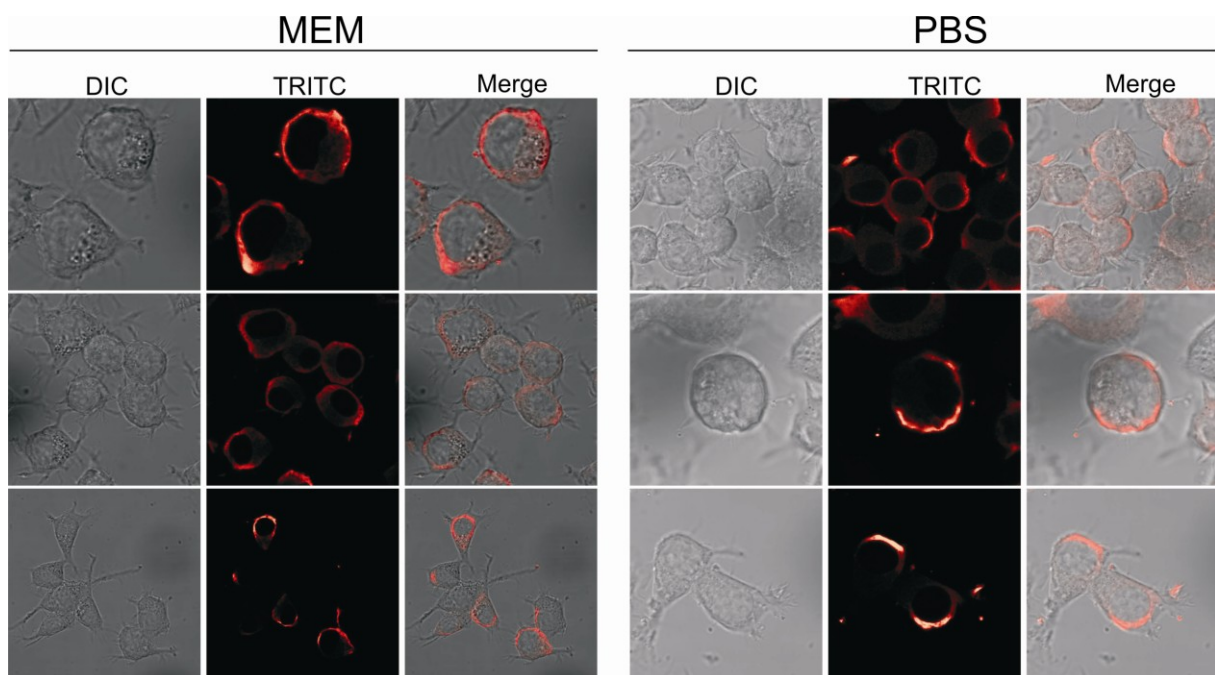


Abbildung 54: *Trans*-Spleißreaktion von PrP-Int^N mit Kre5p-Int^C-Gas1p-exprimierenden N2a Zellen unter Verwendung verschiedener Reaktionspuffer. Die Reaktion wird mit anti-PrP 4H11 und TRITC-konjugiertem anti-Maus IgG Antikörpern durchgeführt.

Für die *Trans*-Spleißreaktion wird das PrP-Int^N zunächst über Nacht gegen Spleißpuffer dialysiert und anschließend in einer Konzentration von 10 μ M auf die N2a-Zellen,

welche das C-terminale Fragment des Split-Inteins exprimieren, gegeben. Hierzu wird das Protein für die Reaktion entweder in MEM oder PBS mit 2 mM DTT verdünnt, 1 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und nach anschließender Paraformaldehydfixierung die Immunofärbung mit anti-PrP 4H11 und TRITC-konjugiertem anti-Maus IgG durchgeführt.

Betrachtet man das Ergebnis in Abbildung 54 so ist kein Unterschied zwischen den Reaktionen in den verschiedenen Puffern zu erkennen. In beiden Fällen ist eine Lokalisation der Fluoreszenz an den Randbereichen der Zellen zu detektieren. Diese ist aber, anders als bei den Hefezellen, nicht gleichmäßig auf der Außenseite der Zellen verteilt. Die Fluoreszenz ist auf bestimmte Bereiche der Membran begrenzt. Betrachtet man die Überlagerung der Fluoreszenzaufnahme mit der DIC-Aufnahme so erkennt man, dass ein Teil der Fluoreszenz auch im Innern der Zelle lokalisiert ist. Zwar ist die Fluoreszenzintensität im Zytoplasma der Zelle schwächer als auf der Zellaußenseite, aber dafür ist sie im gesamten Zellinnern, mit Ausnahme des Zellkerns, zu finden.

Zur Kontrolle werden N2a-Zellen verwendet, welche GFP exprimieren, um die Aggregation des PrP-Int^N auf der Zelloberfläche, sowie eine Reaktion des Proteins oder der Antikörper mit den Zellen auszuschließen. So wird im nachfolgenden Experiment neben den DIC-Aufnahmen auch die Fluoreszenz des GFP und des TRITC-markierten Antikörpers analysiert. In Abbildung 55 ist die Fluoreszenz der GFP-exprimierenden Zellen zu erkennen. Anhand des Vergleichs der DIC-Aufnahme und der Fluoreszenzaufnahme des GFP wird deutlich, dass nur ein geringer Teil der Zellen erfolgreich mit dem Plasmid pcDNA3.1-Kre5p-Int^C-Gas1p transfiziert wurde. Viele Zellen exprimieren das gewünschte GFP nicht. Allerdings erhält man bei Analyse der Reaktion des PrP-Int^N mit den N2a Zellen Signale für die TRITC-Fluoreszenz. Diese sind zum Teil identisch mit den Signalen für die GFP-Fluoreszenz, wie man deutlich anhand der Überlagerung der Fluoreszenzkanäle erkennen kann (Merge). Dabei sind die Fluoreszenzsignale diffus über die gesamte Zelle verteilt und nicht wie bei den Experimenten der *Trans*-Spleißreaktion an der Zellaußenseite lokalisiert. Dies legt den Schluss nahe, dass es sich hierbei eventuell um eine Kreuzanregung des TRITC-Antikörpers handeln kann. Auffällig ist jedoch, dass auch die Zellen, welche kein GFP exprimieren, ein positives TRITC-Signal zeigen. Hierbei ist die Fluoreszenz jedoch erneut auf die Randbereiche der Zellen beschränkt. Zwar kann das Protein auch im Zellinnern detektiert werden, jedoch ist die Fluoreszenzintensität, verglichen mit der

GFP-Fluoreszenz und dem Fluoreszenzsignalen auf der Zellaußenseite, sehr viel geringer.

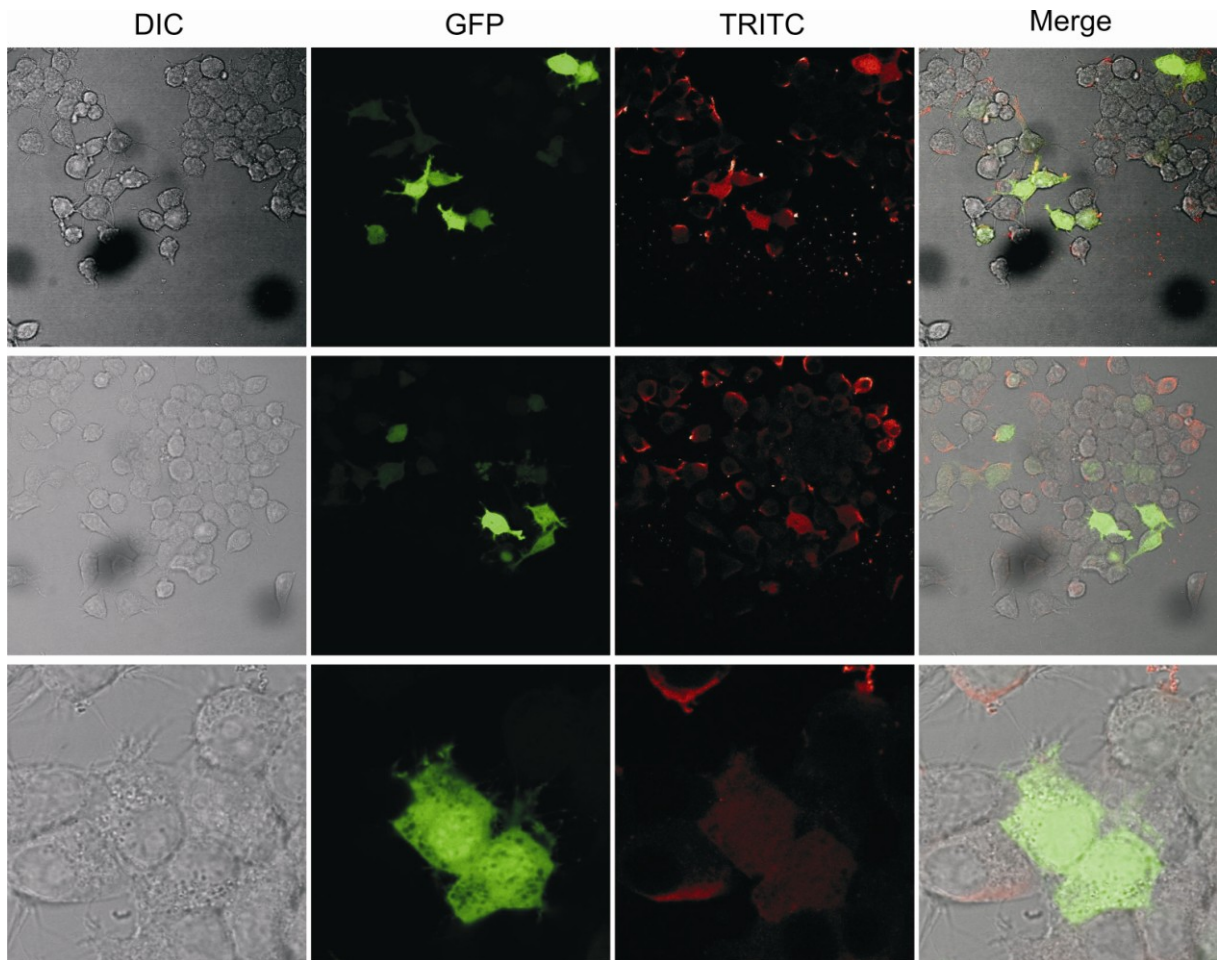


Abbildung 55: *Trans*-Spleiß-Kontrollreaktion des PrP-Int^N mit GFP-exprimierenden N2a Zellen. Detektion der Reaktion mittels Immunofärbung unter Verwendung von anti-PrP 4H11 und TRITC-konjugiertem anti-Maus IgG Antikörpern.

5. Diskussion

5.1. Semisynthese von GPI-verankertem Prion-Protein

5.1.1. Isolation des GPI-Ankers

Die semisynthetische Modifikation des Prion Proteins mit einem GPI-Anker ermöglicht es den Umfaltungsmechanismus ohne den Einfluss der Seitenketten-Glykosylierung zu untersuchen, um somit Erkenntnisse über die Auswirkungen der Verankerung auf die TSE zu erhalten. Deshalb wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Methode etabliert, um ein GPI-Synthon aus Hefen zu isolieren, welches für die chemische Modifikation rekombinant hergestellter Proteine genutzt werden kann. Ein Schwerpunkt liegt hierbei auf der Etablierung einer Methode zur Modifikation des Prion Proteins mit einem nativen GPI-Anker.

Dazu werden, wie bereits beschrieben, zwei GPI-verankerte Proteine (GFP-GPI und PrP-GPI) in Hefen exprimiert, isoliert, aufgereinigt und charakterisiert. Die Proteine besitzen beide eine TEV-Protease Schnittstelle, welche nach Proteolyse zur Freisetzung des GPI-Peptids mit N-terminalem Cystein führt.

GFP-GPI sollte für die Isolation des GPI-verankerten Peptids verwendet werden, da es, im Gegensatz zum Prion Protein, in nahezu allen eukaryontischen Zellen als nicht-toxisch einzustufen ist und sich daher perfekt für die Untersuchung biologischer Prozesse *in vivo* eignet. Zusätzlich ermöglicht die Fluoreszenz des GFP die direkte Detektion innerhalb der Zelle. Allerdings wird unter Verwendung des GFP-GPI keine Proteolyse des Proteins mittels TEV-Protease detektiert. Ein Grund könnte die Unzugänglichkeit der TEV-Protease- Schnittstelle sein, welche sich zwischen dem GFP und dem GPI-Anker befindet (Abbildung 56). Das GFP ist unter nativen Bedingungen in ein β -Barrel gefaltet, bestehend aus einer α -Helix, welche von elf β -Faltblättern umgeben ist. Die Aminosäuren, welche für die intrinsische Fluoreszenz des GFP verantwortlich sind, sind ebenfalls im Zentrum des Zylinders lokalisiert¹⁰². Während der Expression in Hefen wird das GFP mit einem GPI-Anker modifiziert und mittels Cyclodextrin aus der Zellmembran isoliert. Der GPI-Anker selbst besitzt neben den Zuckern noch zwei

Fettsäurereste, welche sich durch ihre Hydrophobizität auszeichnen. Aufgrund des hydrophoben Effekts ist eine Faltung der Polypeptidkette mit der TEV-Protease-Schnittstelle, den Affinitätstags und dem GPI-Anker ins Innere des β -Barrels möglich. Dadurch wäre die Zugänglichkeit der TEV-Protease-Schnittstelle stark beeinträchtigt und die Isolation des GPI-verankerten Peptids ist nicht möglich.

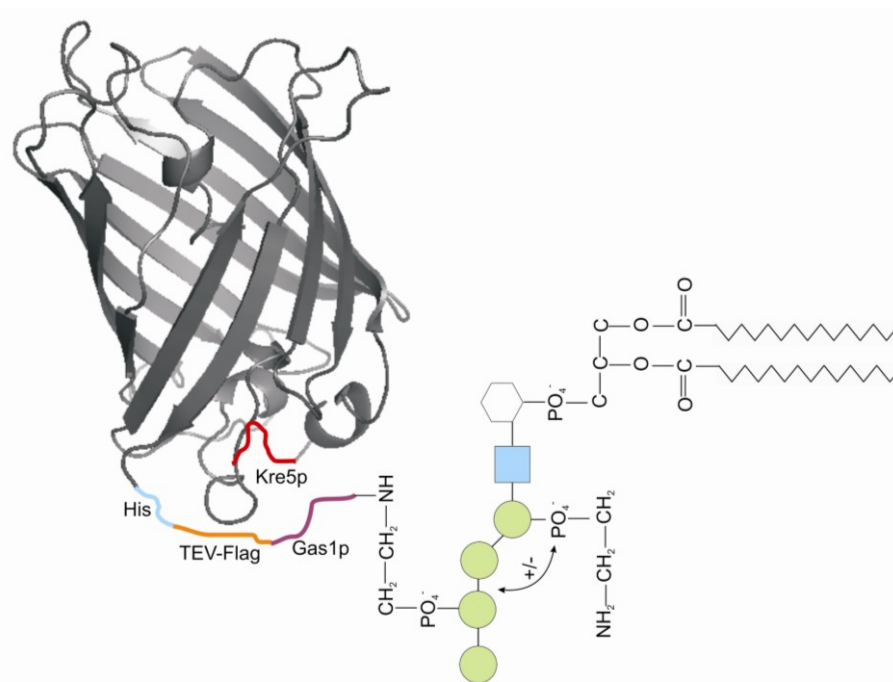


Abbildung 56: Schematische Darstellung der Struktur des GFP-GPI mit den Signalsequenzen und Affinitätstags. GFP (2-238) ist als Zylinder dargestellt.

Bei Verwendung von PrP-GPI ist es dagegen kann das Protein durch die TEV-Protease gespalten werden, wobei das abgespaltene GPI-Peptid mit dem N-terminalen Cystein anhand eines Western Blot Transfers und anschließendem immunologischen Nachweises auf Nitrocellulose mit Hilfe des Flag-Antikörpers nicht nachgewiesen werden.. Daher sollte auf alternative Methoden wie In-Gel-Immunodetektion, Slot- bzw. Dot-Blot oder Immunopräzipitation zum Nachweis GPI-verankerter Proteine zurückgegriffen werden. Zwar wird die Spaltung des PrP-GPIs mit Hilfe des anti-PrP 4H11 Antikörpers detektiert, aber nur das direkte Aufbringen des Proteins auf die Membran mittels Dot-Blot führt zur Detektion mit dem anti-Flag Antikörper. Da hierbei allerdings keine Größenauftrennung der Proteine erfolgt, müssen Western Blot Transfer und Dot Blot immer analog durchgeführt werden, um Reaktionen von ungeschnittenen Protein auszuschließen. Aus diesem Grund muss für die Analytik das GPI-Peptid vom

ungeschnittenen Protein abgetrennt werden. Als erfolgreiche Methode zur Aufreinigung von Peptiden mit einem N-terminalen Cystein hat sich die Covalent Capture-Technology erwiesen⁹⁹. Hierbei bindet das N-terminale Cystein des Peptids an ein Aldehyd-modifiziertes Harz und wird anschließend von den anderen Bestandteilen der Reaktion abgetrennt und ankonzentriert. Zusätzlich führt die Elution mit O-Methylhydroxylamin dazu, dass das N-terminale Cystein nicht modifiziert wird und für weitere Reaktionen zugänglich bleibt. Die erfolgreiche Aufreinigung wird anschließend mit RP-HPLC, sowie Western- und Dot-Blot kontrolliert. Hierbei zeigt sich, dass die über Nacht Inkubation des Harzes mit dem Elutionsmittel zur vollständigen Elution des Peptids führt. Allerdings erkennt man anhand der HPLC-Analyse, dass es bei der Inkubation über Nacht zur Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den Peptiden kommt, welche vor der weiteren Verwendung reduziert werden müssen.

Die genaue Identifizierung des GPI-verankerten Peptids erfolgt durch MALDI-MS unter Verwendung von DHB und MSA als Matrix, welche besonders für glykosylierte Proteine geeignet ist. Die Messung wird im Negativ-Modus durchgeführt. Anhand der erhaltenen Masse wird die Struktur des GPI-Ankers bestimmt, wobei die exakte Position der Ethanolamin-Modifikation dadurch nicht ermittelt wird. Hierzu müssten, wie von Omaetxebarria *et al.*, Sequenzierungsstudien des GPI-Peptids durchgeführt werden¹⁰⁸. Das Ergebnis der MALDI-Messung zeigt, dass der verwendete GPI-Anker nicht homogen in Hefen synthetisiert wird. So besitzt der GPI-Anker zwar, sowohl vom GFP-GPI als auch vom PrP-GPI, vier Mannosereste und DAG als Lipidrest, allerdings ist die Modifikation mit Ethanolamin nicht bei beiden Proteinen zu finden. Somit zeigt der aus Hefen isolierte GPI-Anker, im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen synthetischen GPI-Analoga, keine Homogenität bezüglich seiner Ethanolamin-Modifikation. Jedoch besitzt er, im Gegensatz zu dem von Becker *et al.* verwendeten GPI-Anker Analogon, zwei Fettsäurereste zur Verankerung des Proteins in der Membran¹⁰⁹. Das verwendete Analogon zeigt zwar die Bindung des Prion Proteins, auch mit nur einer Fettsäure, an artifizielle SUVs, jedoch bleibt unklar, ob dies auch auf die Bindung an Membranen *in vivo* übertragbar ist.

5.1.2. *Expressed Protein Ligation*

Vor der Modifikation des Prion Proteins mit dem zuvor isolierten GPI-Synthon, werden die optimalen Ligationsbedingungen mit Hilfe eines RBD-Thioester-Testproteins getestet. Zusätzlich wird die Ligation zur Kontrolle der RBD-Thioesterfunktionalität mit einem NBD-markierten Testpeptid mit N-terminalem Cystein durchgeführt. Unter nativen Bedingungen, bei Verwendung von MESNA als Reduktionsmittel, kommt es zur Ligation des RBD-Thioesters mit dem Testpeptid. Das entstandene Ligationsprodukt ist dabei sowohl mittels Coomassie-gefärbten SDS-Gel, Fluoreszenzscan und ESI-MS nachweisbar. Ein immunologischer Nachweis nach Western Transfer auf eine NC-Membran ist jedoch nicht möglich.

Bei der Ligation des GPI-Peptids wird ebenfalls eine Bande in Höhe des Ligationsprodukts detektiert, doch auch hier zeigt der anschließende immunologische Nachweis unter Verwendung des anti-Flag Antikörpers kein Signal. Sowohl die Kontrollreaktion der RBD mit dem NBD-Peptid als auch die Ligation mit dem GPI-Peptid führt somit zu keinem positiven Ergebnis im Western Blot. Da die erfolgreiche Ligation der RBD mit dem NBD-Peptid aber analytisch nachgewiesen wird, kann davon ausgegangen werden, dass es aufgrund der geringen Größe der Ligationsprodukte von ca. 10 kDa zu Problemen während des Western Transfers kommt. So führt eine unvollständige Bindung der kleinen Proteine an die Membran zu einer negativen Western Blot Analyse. Durch die Verwendung von speziellen Blotmembranen mit einem sehr geringen Porendurchmesser oder verbesserten Bindungseigenschaften kleiner Proteine, sowie die vorherige Analyse mittels Gradienten Gels kann dieser Effekt umgangen werden.

Mit Hilfe der analytischen RP-HPLC wird das Ligationsprodukt (RBD-GPI), anhand der Entstehung eines Peaks nach erfolgter Ligation, nachgewiesen. Die anschließende Analyse mittels ESI-MS führt zu keinem eindeutigen Ergebnis. Die Signale der ESI-MS Messungen weisen ein starkes Signal-Rausch-Verhältnis auf. Da die Ligationsprobe nach Inkubation nicht weiter aufgereinigt wird, ist der eingesetzte Thioester ebenfalls im ESI-MS zu detektieren. Dieser ist sehr gut ionisierbar und überlagert das Signal des Ligationsprodukts. Allerdings lassen sich trotz des schlechten Signals mehrere Massen aus dem ESI-MS-Spektrum dekonvolvieren, wobei die Masse von 14647,76 g/mol der Masse des Ligationsprodukts mit zwei BME-Molekülen entspricht. Allerdings wird diese Masse nur anhand zweier Ladungszustände (+9 und +12) bestimmt. Somit müssten für

den Nachweis der Ligation weitere Messungen durchgeführt werden. Da sich aber bereits bei der Isolation des GPI-Synthons gezeigt hat, dass dieses nur unter Verwendung des Negativ-Modus und einer speziellen Matrix erfolgreich mittels Massenspektrometrie nachgewiesen wird, kann dies die schlechte Ionisierbarkeit des Ligationsprodukts erklären. Das GPI-Peptid macht, aufgrund der geringen Größe der RBD, ca. 1/3 der gesamten Masse des Ligationsprodukts aus. Zusätzlich ist die Ionisierbarkeit durch die Fettsäurereste und das Zuckergerüst des GPI-Ankers stark eingeschränkt. Für eine erfolgreiche Analyse müsste der GPI-Anker unter Umständen zuvor chemisch oder enzymatisch entfernt werden^{110,111}. Eine weitere Möglichkeit ist die von Omaetxebarria beschriebene Aufreinigung des Ligationsansatzes durch Hydrophile-Interaktions-Chromatographie (HILIC) und die anschließende Analyse mittels MALDI Tandem Massen Spektrometrie¹⁰⁸. Durch die HILIC-Aufreinigung wird der Ligationsansatz zum einen ankonzentriert und zum anderen wird der RBD-Thioester aus der Reaktion entfernt. Dies führt zu einer Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses und erleichtert somit die Detektion des Ligationsprodukts.

Da es aufgrund der GPI-Verankerung und der geringen Größe der RBD zu Problemen im Western Blot, als auch bei der anschließenden Detektion der Ligation mittels ESI-MS, kommt, wird das GPI-Peptid an einen PrP-Thioester ligiert. Aufgrund des Aggregationsverhaltens des Prion Proteins wird die Ligation, wie von Becker *et al.* beschrieben, unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt¹⁰⁹. Allerdings wird auch unter Verwendung dieser Methode keine Ligation des PrP-Thioesters mit dem GPI-Peptid mittels Massenspektroskopie beobachtet. Ein Grund liegt möglicherweise in der Struktur des verwendeten GPI-Ankers. Das von Becker *et al.* verwendete GPI-Analogon besitzt lediglich eine C18-Fettsäure, wohingegen der in dieser Arbeit verwendete native GPI-Anker Diacylglycerin mit einer C16- und einer C24-Fettsäure als Lipideinheit besitzt. Dadurch wird eine Messung des Ligationsprodukts erschwert. Ein Ansatz zur Umgehung dieser Problematik ist die chemische oder enzymatische Entfernung der GPI-Verankerung nach erfolgter Ligation. Durch die Abspaltung des GPI-Ankers kommt es zu einer besseren Ionisierbarkeit des Ligationsprodukt und es wird die Massenzunahme um den Peptidanteil des GPI-Ankers detektiert.

Die Western Blot Analyse liefert zwar ein positives Signal, jedoch bindet hierbei der anti-Flag Antikörper unspezifisch an den PrP-Thioester. Dadurch wird sowohl vor als auch nach der Ligation eine Proteinbande auf der Nitrocellulosemembran mittels anti-Flag Antikörper nachgewiesen. Insgesamt gibt es zwar Hinweise darauf, dass es zur Ligation

des GPI-Peptids mit der RBD gekommen ist, allerdings sind diese Ergebnisse nicht eindeutig.

In der vorliegenden Arbeit wurde bisher immer versucht das vollständige Ligationsprodukt mit dem GPI-Anker nachzuweisen. In den meisten Veröffentlichungen, welche sich mit der Charakterisierung GPI-verankerter Proteine beschäftigen, wird der Anker zur Charakterisierung der Proteine chemisch oder enzymatisch entfernt^{110,112-114}. Dadurch werden Probleme während der Analytik, sowohl mit massenspektrometrischen als auch mit proteinchemischen Methoden, umgangen.

5.1.3. Protein *Trans*-Spleißreaktion des PrP-Int^N *in vivo*

Anders als die semisynthetische Darstellung von Proteinen mittels EPL erfordert der Prozess des Protein *Trans*-Spleißens nicht die Generierung eines Thioesters und bietet somit die Möglichkeit Proteine *in vivo* posttranslational zu modifizieren. Hierbei macht man sich die Technologie der Split-Inteine zu nutze, welche in zwei oder mehr Teile gespalten sind und in diesem Zustand keine katalytische Aktivität aufweisen. Kombiniert man jedoch die Fragmente kommt es zur Assoziation und sie bilden ein intaktes Protein Spleiß-Element aus. Bei dem hier verwendeten *Npu* DnaE aus *Nostoc punctiforme* handelt es sich um ein solches Split Intein. Der C-terminale Teil des Split-Inteins wird zunächst in Hefen exprimiert. Neben dem Intein besitzt dieses Konstrukt Kre5p als ER-Import-Signal und Gas1p als Signal für die GPI-Verankerung des Proteins. Wie bereits in vorherigen Experimenten gezeigt wird, kommt es bei Verwendung dieser Sequenzen zur posttranslationalen Modifikation und zur Lokalisation des Proteins auf der Außenseite der Plasmamembran.

Mit Hilfe des *Trans*-Spleißens ist es möglich das PrP-Int^N an das GPI-verankerte Int^C-Fragment auf der Außenseite der Hefezelle zu binden und durch eine Immunfluoreszenzreaktion nachzuweisen. Durch diese Methode ist es somit möglich, das rekombinant hergestellte Prion Protein *in vivo* mit einem GPI-Anker zu modifizieren. Bei den Kontrollexperimenten in denen eine Probe bestehend aus GFP-exprimierenden Zellen und Kre5p-Int^C-Gas1p-exprimierenden Zellen verwendet wird, zeigen lediglich die Kre5p-Int^C-Gas1p exprimierenden Zellen eine Immunreaktion mit dem anti-PrP 4H11 Antikörper. Die GFP-exprimierenden Zellen zeigen diese Fluoreszenz nicht. Es handelt sich somit nicht um eine unspezifische Reaktion des PrP-Int^N mit der

Plasmamembran der Hefezellen. Wie bereits in den vorherigen Lokalisationsuntersuchungen des PrP-GPI erkennt man eine ungleichmäßige Verteilung des Proteins auf der Oberfläche der Zelle. So gibt es Bereiche in denen eine stärkere Fluoreszenz detektiert werden kann. Diese wird durch die Lokalisation des GPI-Ankers in den DRM erklärt^{115,116}. Es könnte sich aber auch um Artefakte handeln, welche aufgrund eines unvollständigen Verdauens der Zellwand mit Lytikase hervorgerufen werden. Bei Verwendung von Kre5p-Int^C-Gas1p-exprimierenden N2a Zellen für die Protein *Trans*-Spleißreaktion ist die ungleichmäßige Verteilung der Proteine auf der Zelloberfläche jedoch noch stärker ausgeprägt. Zusätzlich ist eine geringe Fluoreszenz im Innern der Zelle zu detektieren. Hierbei handelt es sich um zum Teil internalisiertes Protein, da die N2a-Zellen anders als die Hefezellen nicht vor der Reaktion fixiert worden sind. Bei der Kontrollreaktion, welche an GFP-exprimierenden N2a-Zellen und wtN2a-Zellen durchgeführt wird, kommt es ebenfalls zu einer Reaktion des anti-PrP 4H11 Antikörpers mit den Zellen. Allerdings ist hierbei die Fluoreszenzintensität geringer als bei Reaktionen mit Zellen, welche das Kre5p-Int^C-Gas1p exprimieren. Zusätzlich wird das Protein in der gesamten Zelle unabhängig von der Expression des GFP nachgewiesen. Eine mögliche Erklärung ist die unspezifische Reaktion des PrP-Int^N mit der Zellmembran der N2a-Zellen. Hinzu kommt, dass die N2a Zellen endogenes PrP^C exprimieren, welches von dem verwendeten anti-PrP 4H11 Antikörper erkannt wird^{117,118}. Dadurch kommt es zu falsch-positiven Ergebnissen während des Zellexperiments. Um die Detektion des endogenen Prion Proteins auszuschließen, muss der anti-PrP 3F4 Antikörper verwendet werden, welcher epitop-spezifisch für die Hamster-Maus-Chimäre (AS 109-112)des Prion Proteins ist¹¹⁹.

Zwar liefert das *Trans*-Spleißexperiment auf den Hefezellen, im Gegensatz bei der Verwendung der N2a-Zellen, ein eindeutiges Ergebnis, allerdings wird hierbei bereits die spezifische Assoziation des PrP-Int^N mit den Kre5p-Int^C-Gas1p exprimierenden Zellen nachgewiesen. Um zu belegen, dass die beiden Inteinhälften den gesamten Prozess des *Trans*-Spleißes durchlaufen haben, müssen die Zellen lysiert und das neu entstandene *Trans*-Spleißprodukt mittels Western Transfer nachgewiesen werden.

Bei den Hefezellen ist dies aufgrund der Fixierung auf den Deckgläschen nicht möglich. Hier könnte ein Ansatz gewählt werden, welcher die *Trans*-Spleißreaktion mit den Hefezellen in Suspension ermöglicht. Im Falle der N2a- Zellen kann die Lyse der Zellen durchgeführt werden.

Die *in vivo* Modifikation des Prion Proteins mit einem nativen GPI-Anker ist somit prinzipiell, sowohl in Hefezellen als auch in N2a-Zellen, möglich. Jedoch bedarf es weiterer Analysen der Reaktion, um eine bloße Assoziation der beiden Inteinhälften vollständig auszuschließen.

5.2. Charakterisierung von PrP-GPI

5.2.1. GPI-Verankerung und Protein-Internalisierung

Das Prion Protein ist für die Entstehung von TSE verantwortlich. Zahlreiche Untersuchungen zeigen, dass die posttranslationale Modifikation des Proteins einen entscheidenden Einfluss auf den Krankheitsverlauf hat. Neben der N-Glykosylierung stellt vor allem die Membranverankerung des Proteins mittels GPI-Anker einen zentralen Punkt in der Ausbildung einer TSE dar.

Untersuchungen mit transgenen Mäusen, welche das Prion Protein ohne GPI-Anker exprimieren (PrP Δ GPI) zeigen, dass es zwar zu einer Konversion des PrP^C in PrP^{Sc} kommt, aber das Auftreten von klinischen Symptomen ausbleibt^{120,121}. Findet allerdings eine Ko-Expression von PrP Δ GPI mit Wildtyp-PrP statt, kommt es zu einer Beschleunigung des Krankheitsverlaufs. Des Weiteren beschreiben Winklhofer *et al.* eine Veränderung des Glykosylierungsmusters beim Prion Protein nach Deletion des GPI-Ankers, wodurch die Entstehung von PrP^{Sc} begünstigt ist¹²².

Für die Untersuchung der Biochemie, Struktur und Funktion des GPI-verankerten Prion Proteins ist es also nicht nur wichtig, die Bindung an die Zellmembran über Lipide zu untersuchen, sondern auch den Einfluss der Glykosylierung nicht zu vernachlässigen. Daher erfordert das Fehlen der posttranslationalen Modifikationen bei den in *E. coli* exprimierten Proteinen die nachträgliche Einführung eines GPI-Ankers, zur Aufklärung des Einflusses der Membranverankerung auf den Krankheitsverlauf der TSE.

Trotz großer Fortschritte in der Zucker-, Lipid- und Peptidchemie sind erst wenige GPI-Anker Analoga zur Charakterisierung der Membranverankerung chemisch hergestellt worden. Bei all diesen Analoga wird der GPI-Anker durch weniger komplexe lipidierte Moleküle ersetzt. Olschewski und Becker modifizierten das Prion mit zwei Palmitoylresten, um die Verankerung des Proteins mit der Membran zu untersuchen¹²³. Ein ähnlicher Ansatz wurde von Breydo *et al.* verfolgt. Sie verankerten das Prion Protein, unter Verwendung einer N-Myristoylamidomaleimidyl-Gruppe, an die Membran⁷⁶. Diese Variante des lipidierten Prion Proteins zeigt jedoch Unterschiede im Fibrillierungsverhalten gegenüber unlipidiertem Protein. Durch Störung der lateralen Assoziation wird die Zusammenlagerung der Oligomere zu komplexen Fibrillen verhindert und der Gehalt an Fibrillen reduziert.

Ein Problem dieser Experimente ist, dass GPI-Anker Analoga verwendet worden sind, denen entweder die Oligosaccharid-Kernstruktur, die Seitenkettenmodifikationen oder die Fettsäurereste fehlen, oder diese durch einfachere Strukturen ersetzt worden sind. Diese Änderungen haben einen Einfluss auf die GPI-Anker-Struktur, sowie seiner Flexibilität und den Abstand des Proteins zur Membran¹²⁴⁻¹²⁶.

Zur Umgehung dieser Problematik wird das in dieser Arbeit verwendete Prion Protein zunächst mit einem nativen GPI-Anker in Hefen exprimiert. In einem zweiten Ansatz wird GFP als Reporterprotein verwendet, welches ebenfalls mit einem GPI-Anker modifiziert wird. Aufgrund seiner besseren Löslichkeit wird dieses GFP-GPI sowohl für die Lokalisationsuntersuchungen als auch für die Charakterisierung der GPI-Verankerung verwendet. Beide Proteine besitzen für den ER-Import die Signalsequenz des Hefeproteins Kre5p, sowie die Gas1p-Signalproteinsequenz für die Modifikation mit dem GPI-Anker. Bereits in anderen Veröffentlichungen konnte gezeigt werden, dass es bei der Verwendung der Kre5p-Signalsequenz, sowohl in Hefen als auch mammalischen Zellen, zu einem co-translationalen Transport des Proteins ins ER kommt¹²⁷. Dieser Schritt ist für die anschließende Modifikation des Proteins mit einem GPI-Anker essentiell.

Anhand der Daten der Lokalisationsuntersuchung, sowohl für das GFP als auch für das Prion Protein, kann gezeigt werden, dass es zu einer Modifikation der Proteine mit einem nativen GPI-Anker gekommen ist. Es kommt zu einer Verankerung des Proteins auf der Außenseite der Plasmamembran und wird dort mit Hilfe von Antikörpern detektiert. Durch einen anschließenden PI-PLC Verdau, des auf N2a Zellen verankerten PrP-GPI, kann das Protein von der Zellmembran freigesetzt werden. Hierbei wird allerdings deutlich, dass die Freisetzung des unglykosylierten Prion Proteins, sowohl beim PrP-GPI als auch beim wtPrP, nur teilweise erfolgt. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis ist, dass das Protein in der Scrapie-Isoform vorliegt, da die aggregationsverlangsamenden Seitenketten-Glykosylierungen fehlen. In dieser Konformation ist PrP allerdings weitestgehend resistent gegenüber der Spaltung mit PI-PLC^{128,129}.

Das Signal, welches für den Anhang des GPI-Ankers verwendet wird, stammt vom Gas1p aus *S. cerevisiae*. Der GPI-Anker des Proteins ist nicht homogen und besitzt eine fünfte Mannose entweder in α 2- oder α 3- Verknüpfung. Als Lipideinheit besitzt es Diacylglycerol mit zwei C26-Fettsäuren, wobei eine der Fettsäuren hydroxyliert vorliegt (Abbildung 57, Mitte). Der GPI-Anker des Prion Proteins aus Hamster (Abbildung 57,

links) besitzt zusätzlich zur Grundstruktur, bestehend aus Phosphoinositol, Glucosamin und vier Mannoseresten, noch N-Acetylglucosamin und eine Modifikation mit Phosphoethanolamin. Auch dieser Anker weist Heterogenität auf. So ist teilweise eine zusätzliche Mannose oder N-Acetylneuraminsäure zu finden¹³⁰.

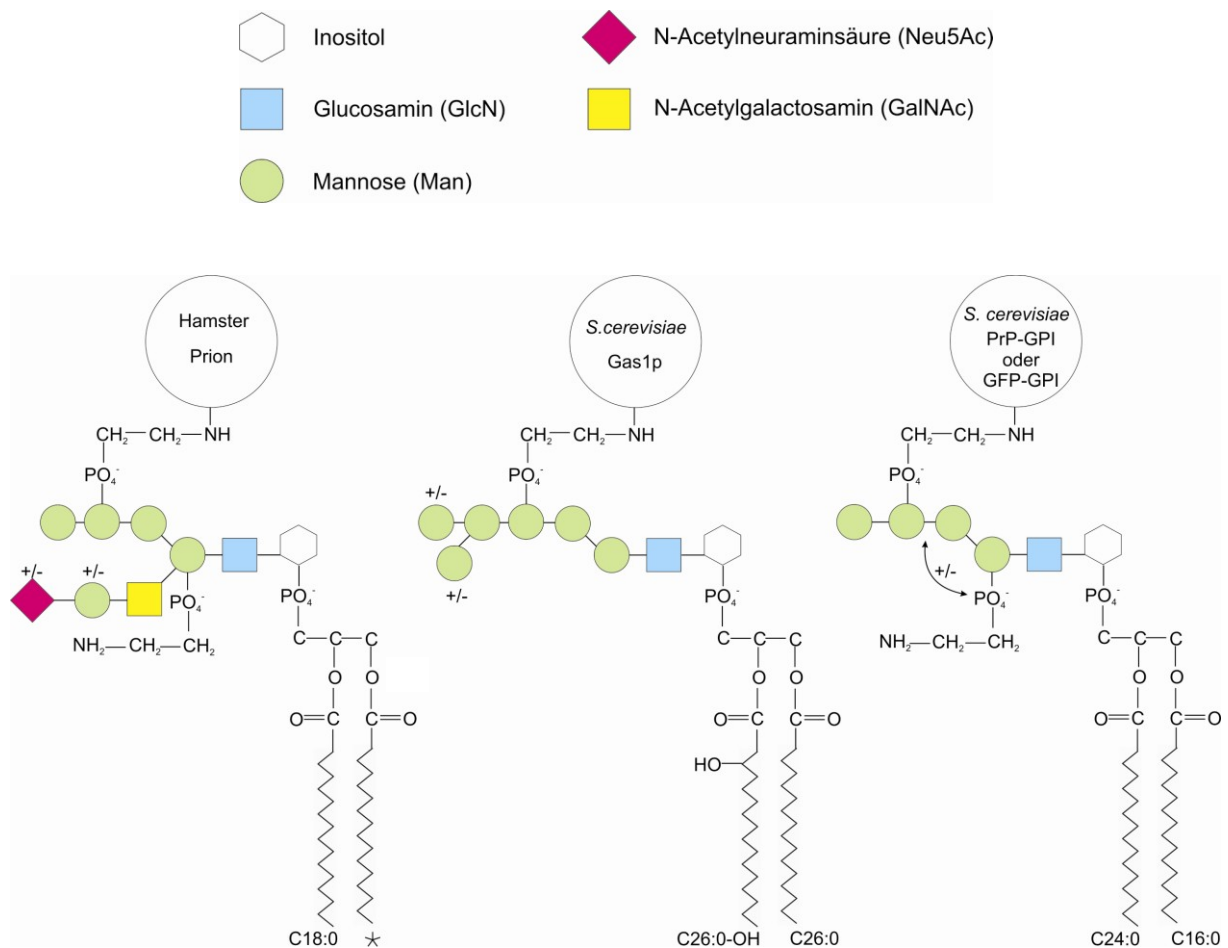


Abbildung 57: Vergleich der GPI-Anker Strukturen des Prion Proteins aus Hamster, des Gas1p aus Hefen und des PrP-GPI bzw. GFP-GPI aus Hefe. (+/-) Heterogenität ; (*) unbekannter Lipidtyp oder -länge. Kettenlängen der Lipide und die Anzahl an ungesättigten Fettsäuren ist angegeben¹³¹.

Trotz intensiver Studien der GPI-Anker Modifikation des Prion Proteins ist die genaue Zusammensetzung des Lipidrests nicht bekannt¹³². Der Anker verfügt neben einer C18-Fettsäure über einen weiteren Fettsäurerest unbekannter Länge. Anhand der Massenspektrometrie-Daten des GFP-GPI bzw. PrP-GPI erkennt man, dass auch hier der GPI-Anker nicht homogen ist. So besitzt der GPI-Anker des GFP-GPI keine zusätzliche Modifikation mit Phosphoethanolamin, welche hingegen beim PrP-GPI zu finden ist. Allerdings kann man anhand des MALDI-MS die genaue Position der Modifikation nicht

bestimmen (Abbildung 57, gekrümmter Pfeil). Hierzu müssten MS-MS Fragmentierungsexperimente des Ankers durchgeführt werden^{108,133,134}. Die Lipideinheit des Ankers besteht aus Diacylglycerol mit einer C26- und einer C16-Fettsäure. Aufgrund der Länge seiner Fettsäuren weist dieser Anker ähnliche Eigenschaften, bezüglich Abstand des Proteins zur Membran sowie seiner Flexibilität auf, wie der Anker des Prion Proteins. Außerdem ist die zusätzliche Modifikation des Ankers bei Verwendung des PrP-GPI mit Phosphoethanolamin festzustellen. Lediglich N-Acetylgalactosamin und N-Acetylneuraminsäure sind nicht zu finden, wodurch es zu einer geringeren Verzweigung der Zuckereinheit kommt. Dies kann ebenfalls bei der Membranbindung und der Flexibilität des GPI-Ankers eine Rolle spielen. Da die Addition von Sialinsäure allerdings eine relativ ungewöhnliche Modifikation innerhalb der mammalischen GPI-Anker darstellt und sie sowohl im GPI-Anker des PrP^C als auch das PrP^{Sc} zu finden ist, scheint sie keine Rolle in der Pathologie der TSE zu spielen¹³⁰.

Einige Studien gehen davon aus, dass die Lokalisation des Prion Proteins in Mikrodomänen, den sogenannten Lipid Rafts oder Detergenz-resistenten Membranen (DRM), eine entscheidende Rolle während der Umfaltung des Proteins in seine pathologische Isoform spielt. Diese Bereiche sind reich an Cholesterin, Sphingolipiden und Glykosphingolipiden. In ihnen sind besonders häufig GPI-verankerte Proteine zu finden, deren gesättigten Fettsäurereste mit den Lipiden der Mikrodomänen interagieren^{115,135,136}. So setzten Legler *et al.* GPI-verankertes GFP als Lipid Raft Marker ein und zeigten, dass die Lipideinheit einen entscheidenden Einfluss auf die Lokalisation der Proteine in die DRM hat¹³⁷.

In der vorliegenden Arbeit kann gezeigt werden, dass der verwendete GPI-Anker zu einer Lokalisation des Proteins in Lipid Rafts führt. So wird während der Aufreinigung des GFP-GPI unter nativen Bedingungen das Protein unter Zuhilfenahme von Cyclodextrin aus der Zellmembran isoliert. Cyclodextrine sind in der Lage Cholesterin aus der Membran zu extrahieren und somit die Akkumulation von Proteinen in Rafts zu verändern oder sogar ganz zu verhindern¹³⁸⁻¹⁴¹. Durch die Zerstörung der Membranstruktur ist es möglich, das Protein zu solubilisieren. Allerdings zeigt sich auch, dass nur ein Teil des Proteins auf diesem Wege zugänglich gemacht werden kann. Zwar legen verschiedene Studien die Existenz von Detergenz-unlöslichen Glykolipid-angereicherten Komplexen (DIGs), einem Analogon der DRM in mammalischen Zellen, in Hefen nahe, jedoch bestehen diese Strukturen hauptsächlich aus Glykosphingolipiden und Ergosterol¹⁴²⁻¹⁴⁴. Somit könnte es zu einer schlechteren Solubilisierung des Proteins

mit Cyclodextrin kommen oder aber das Protein ist nicht ausschließlich in den DRMs lokalisiert. Zusätzlich zeigen die Ergebnisse der Lokalisationsuntersuchungen des GFP-GPI und des PrP-GPI, dass die Proteine in Hefezellen nicht gleichmäßig auf der Zelloberfläche verteilt sind. Auch hier sind Bereiche stärkerer Lokalisation zu detektieren, wodurch die Theorie der Assoziation in DIGs bzw. DRMs unterstützt wird. Ein Teil der Proteine befindet sich im Zytoplasma der Zelle bzw. ist im ER, Golgi oder Transportvesikeln lokalisiert. Dies erklärt, warum nur ein geringer Teil der Proteine unter nativen Bedingungen mit Cyclodextrin aus der Zellmembran isoliert werden kann. Da die Assoziation des Prion Proteins mit DRMs eine entscheidende Rolle im Umfaltungsprozess von PrP^C zu PrP^{Sc} spielt, ist die Assoziation des verwendeten GPI-Ankers mit DRMs von großer Bedeutung⁴⁶. So gibt es verschiedene Hinweise darauf, dass der Abbau von Cholesterin oder Sphingolipiden zu einer Neuverteilung des PrP^C innerhalb der Membran und einer Verringerung der PrP^{Sc}-Bildung in den infizierten Zellen führt⁴⁸⁻⁵⁰. Zusätzlich ist die transmembranständige Form des Prion Proteins nicht in der Lage sich in die PrP^{Sc} Isoform umzufalten. Untersuchungen an zellfreien Systemen von *Baron et al.* zeigen, dass lediglich durch die Insertion von PrP^{Sc} in die Membran des raft-assoziierten PrP^C eine Umfaltung des Prion Proteins erreicht werden kann. Dies legt den Schluss nahe, dass es während der TSE Infektion zum einen zur Entfernung des PrP^{Pres} von der Zielzelle, dem Membranaustausch zwischen den Zellen und der Aufnahme des PrP^{Pres} in die Lipid Raft Domäne der Empfängerzelle kommen muss¹⁴⁵.

Aguzzi postuliert, dass es durch die Assoziation in den Lipid Rafts zum Clustering und/oder einer Konformationsänderung des zellulären Prion Proteins kommt. Durch diese Konformationsänderung wird Apoptose induziert oder aber die zelluläre Toxizität wird durch die Aufnahme des Proteins in Lysosomen vermittelt. Hierbei wird vermutet, dass die späten Endosomen oder Lysosomen aufgrund ihres niedrigen pH-Wertes die Ent- und Rückfaltung der Proteine vereinfachen, wodurch diese anschließend den Zelltod induzieren können⁵⁵⁻⁵⁷.

Um dies gewährleisten zu können, muss das Prion Protein nach Bindung an die Zelloberfläche wieder in die Zelle internalisiert werden, wobei der genaue Mechanismus noch umstritten ist. Die Internalisierung kann hierbei entweder über den Clathrin-, Caveolae oder Raft-abhängigen Signalweg erfolgen^{27,58-61}. Paquet *et al.* zeigten, dass PrP^{Sc} trotz der Abwesenheit von PrP^C in die Zellen internalisiert wird, jedoch eine Umfaltung des Proteins auch bei anschließender Expression des PrP^C in den Zellen nicht erfolgt. Dies legte den Schluss nahe, dass die PrP^C-PrP^{Sc}-Interaktion entweder sehr früh

in einem Zellkompartiment oder bereits an der Zelloberfläche erfolgen muss⁶². Somit ist es von großer Bedeutung, dass das Prion Protein, neben der Bindung an die Zellmembran mittels GPI-Anker, auch in der Lage sein muss in die Zelle zu internalisieren, um eine TSE auszulösen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen mit Bodipy®-markiertem PrP-GPI zeigen, dass die Lokalisation des Proteins auf bestimmte Bereiche der Zellmembran beschränkt ist und zum Teil auch innerhalb der N2a-Zellen zu finden ist. Anhand der zeitabhängigen Messungen ist deutlich die Internalisierung des Proteins zu erkennen. Bei einer Inkubationszeit von einer Minute befindet sich das gesamte Protein auf der Zellmembran. Bereits nach einer Inkubationszeit der Zellen von 10 min. mit dem Bodipy®-markiertem PrP-GPI kann die Aufnahme des Proteins in die Zelle detektiert werden. Bei längerer Inkubation erfolgt eine Detektion im Inneren der Zelle, wobei der Zellkern ausgespart bleibt. Zur Bestimmung der vollständigen Internalisierung müssten in weiteren Experimenten *in vivo* Messungen gemacht werden, bei denen die Aufnahme des Proteins von der Plasmamembran ins Zellinnere durch Real Time Imaging bestimmt wird. So zeigten Untersuchungen von Nunziante *et al.*, dass bereits nach 45 min. 30 % und nach 60 min. 70 % des wtPrion Proteins in die Zelle internalisiert wurden²⁶. Beim Prion Protein mit einem verkürzten N-Terminus ($\Delta 23-51$) war die Internalisierung stark verzögert. Hier waren nach 45 min. lediglich 10 % bzw. 60 min. 30 % des Proteins internalisiert worden.

Das in dieser Arbeit verwendete PrP-GPI zeigt somit ein ähnliches Internalisierungsverhalten wie das wtPrP. Nach einer Inkubationszeit von 30 min. ist ein Großteil des Proteins in die Zelle aufgenommen worden. So können bereits nach 10 min. Strukturen mit einer erhöhten Fluoreszenzintensität im Zellinnern erkannt werden, welche sich nach einer Inkubationszeit von 30 min. deutlich vom Zytoplasma abheben. Hierbei handelt es sich vermutlich um Transportvesikel oder Lysosomen, welche an der Internalisierung des Proteins beteiligt sind. Für eine genauere Charakterisierung müssten sie durch entsprechende Fluoreszenzmarker sichtbar gemacht werden.

5.2.2. Untersuchung des Aggregationsverhaltens des PrP-GPI

Der Mechanismus, welcher zur Entstehung der Neurodegeneration durch Prionen führt ist, bis auf einige kürzlich errungene Fortschritte in diesem Bereich, immer noch ungeklärt. Die meisten der aktuellen Studien bestätigen zwar die „Protein-Only“-Hypothese, aber der genaue Mechanismus und die toxische Spezies sind bisher unbekannt¹⁴⁶. So ist es inzwischen mehreren Arbeitsgruppen gelungen, mit Hilfe von rekombinant hergestelltem Prion Protein, TSE zu induzieren^{40,41,147}. Hierbei wird das rekombinant hergestellte Protein (rPrP) in die β -faltblattreiche amyloide Isoform überführt und in Hamster oder Mäuse inokuliert. Alle Tiere zeigen daraufhin die Entstehung einer Prion Erkrankung, welche jedoch erst bei der zweiten Passage des Proteins und nach längeren Latenzzeiten auftritt. Supattapone und Simoneau *et al.* postulieren, dass nicht die Fibrillen die neurotoxische Spezies darstellen, sondern die Oligomere, eine weitaus höhere Infektiosität aufweisen^{148,149}. Alle diese Untersuchungen sind bisher lediglich mit rekombinant hergestelltem Prion Protein ohne Glykosylierung und GPI-Verankerung durchgeführt worden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen bezüglich der Faltung und Fibrillenbildung des Prion Proteins zeigen, dass es durch die posttranslationalen Modifikationen zu keiner Änderung im Faltungsverhalten des Proteins kommt. So lässt sich das Prion Protein, wie in der Literatur beschrieben, unter verschiedenen Pufferbedingungen entweder in die oligomere Form oder in die amyloide Form überführen⁹⁰. Bei einem pH des Puffers zwischen 3 und 5 bildet das Protein bevorzugt oligomere Strukturen aus, welche anhand von Untersuchungen mittels Gelfiltration und DLS-Messungen nachweisbar sind. Die Bildung der Fibrillen in Puffern mit einem pH von 5.5 oder 6.8 kann anhand der verwendeten Säule (Trennbereich 5 - 700 kDa) während der Gelfiltrationsanalyse nicht untersucht werden, da diese sich aufgrund ihrer Größe im Ausschlussvolumen befinden. Aber in den beiden Puffersystemen werden oligomere Strukturen nachgewiesen, welche die Zwischenstufen zur Bildung der Fibrillen darstellen. Dabei ist sehr gut zu erkennen, dass die Anfangsmenge an Oligomeren, im Gegensatz zu der Probe in dem Puffer mit einem pH von 3.7, wesentlich geringer ist und erst nach einer Inkubationszeit von 47 h als deutlicher Peak im Chromatogramm nachgewiesen werden kann. Da im Modell angenommen wird, dass Fibrillen oberhalb einer kritischen Länge in kleinere Fragmente zerbrechen, könnte es sich bei dem Peak nach 47 h um Fibrillenbruchstücke handeln^{10,35}.

Die DLS-Messung zeigt, dass sich nach einer Inkubationszeit von 48 h unterschiedlich große Fragmente in der Probe befinden, welche z. T. Stokes-Radien von 300 nm aufweisen. Die Größe der Fragmente ist, im Gegensatz zu Oligomeren, welche mit einer verkürzten Prion-Variante (90-231) erhalten werden, nicht homogen⁶³. Jedoch kann in allen drei Proben nach erfolgter Inkubation eine Proteinspezies mit einem ungefähren Radius von ca. 20 nm detektiert werden. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um oligomeres Prion Protein. Da diese Spezies auch in der Probe mit einem pH von 3.7 zu finden ist, wird angenommen, dass es sich um neu gebildeten Oligomere handelt¹⁵⁰.

Sobald die kritische Größe von ca. 669 kDa (entspricht einem Oligomer bestehend aus ca. 15-20 Monomeren, abhängig von ihrer posttranslationalen Modifikation) erreicht ist, bilden sich Fibrillen unterschiedlicher Längen, die mit Hilfe von Thioflavin T nachgewiesen werden können. Zwar ist die Fluoreszenzintensität der fibrillenbildenden Proben (pH > 5) zunächst deutlich höher als bei der oligomeren Probe (pH < 5), aber nach einer längeren Inkubationszeit gleichen sich die Fluoreszenzintensitäten an.

Dieses Ergebnis legt den Schluss nahe, dass in allen drei Puffersystemen Fibrillen gebildet werden, was jedoch anhand der DLS-Messungen nicht bestätigt wird. Da es sich bei den Fibrillen um größere Aggregate handelt, ist es durchaus möglich, dass diese während der Messung auf den Boden der Küvette sinken und somit die Messergebnisse verfälschen. Außerdem handelt es sich bei der Interaktion des ThT mit den amyloiden Strukturen unter anderem um ionische und hydrophobe Wechselwirkungen, welche keinen Rückschluss auf die Größe der gebildeten Strukturen zulassen. So kann es sein, dass bereits die Oligomere in der Lage sind ThT zu binden und es dadurch zur batho- und hyperchromen Verschiebung der Fluoreszenz ThT/Amyloidkomplexes gegenüber der des freien Farbstoffs kommt. Zusätzlich sind die ausgebildeten Fibrillen der Proben in den Puffern mit einem pH von 5.5 bzw. 6.8 nicht homogen, was ebenfalls zu einer Verfälschung der Messwerte führen kann. Der ThT Test sollte also nur als Hinweis für die Entstehung von amyloiden Strukturen gewertet werden.

Die genauere Charakterisierung muss über andere Methoden wie der Gelfiltration, DLS, analytischer Ultrazentrifugation oder nativer PAGE erfolgen.

Die Daten zeigen aber deutlich, dass das posttranslational modifizierte Prion Protein, ebenso wie das rPrP, in die verschiedenen Konformere umgefaltet isoliert und aufgereinigt werden kann. Die GPI-Anker-Modifikation hat *in vitro* keinen Einfluss auf das Aggregationsverhalten des Proteins. Jedoch kann, wie von Frankenfield beschrieben, nachgewiesen werden, dass das Vollängen-Prion Protein (23-231), im Gegensatz zur

verkürzten Variante, mehrere oligomere Spezies ausbildet, welche durch Bildung von Aggregationskeimen die Toxizität erhöhen⁶³.

In einem nächsten Schritt müssten die verschiedenen Konformere für *in vivo* Experimente eingesetzt werden, um die toxische Spezies genauer zu identifizieren. Inzwischen ist bekannt, dass Aggregation, Toxizität und Infektiösität zwar alle Eigenschaften des Prion Proteins sind, welche aber nicht zwingend koinduziert sein müssen. Daher kann anhand der GPI-verankerten rekombinanten Variante der Mechanismus der Konformationsänderung und Infektiösität *in vivo* genauer charakterisiert werden. Hierbei können, im Gegensatz bei der Verwendung mammalischer Proteinpräparationen, Verunreinigungen mit zellulärem PrP^C ausgeschlossen werden, da keine PrP-Homologen in Hefen bekannt sind.

6. Zusammenfassung

Viele eukaryontische Oberflächenproteine sind mit einem GPI-Anker modifiziert. Inzwischen sind mehr als 200 dieser posttranslational veränderten Proteine bekannt. Ein wichtiges Beispiel ist das Prion Protein, dem Auslöser der Prion-Erkrankung. Die Missfaltung des zellulären Prion Proteins (PrP^C) in seine pathogene Isoform PrP^{Sc} spielt eine zentrale Rolle bei der Pathogenese von BSE oder Creutzfeld-Jakob. Die Verankerung des Proteins auf der Außenseite der Zelle mittels GPI-Anker stellt eine wichtige Komponente für die Infektiösität der Erkrankung dar.

Da die Isolation von homogen GPI-verankerten Prion Protein bis jetzt nicht möglich ist, wurden die meisten Transmissionsexperimente mit rekombinant hergestellten Prion Proteinen ohne GPI-Verankerung oder heterogenen Proteinpräparationen aus mammalischen Zelllinien durchgeführt. Um einen Zugang zu homogen GPI-verankertem, rekombinant hergestelltem Prion Protein zu erhalten, wurde in der vorliegenden Arbeit *Saccharomyces cerevisiae* als Modellsystem benutzt. Durch die Verwendung hefespezifischer Signalsequenzen für den ER-Import und die GPI-Verankerung, erhält man posttranslational modifiziertes Protein (GFP-GPI und PrP-GPI).

Daraus ließ sich eine allgemeine Methode zur Isolation eines GPI-verankerten Peptids mit N-terminalem Cystein etablieren. Dieser Baustein wurde für die GPI-Verankerung eines in *E. coli* exprimierten Prion Proteins (recPrP) unter Verwendung der *Expressed Protein Ligation* (EPL) genutzt. Die in Hefe exprimierten Proteine (GFP-GPI bzw. PrP-GPI) wurden mit TEV-Protease gespalten und das entstandene GPI-Peptid mittels Covalent Capture Beads aufgereinigt. Durch MALDI-MS wurde die Struktur des GPI-Ankers bestimmt. Das erhaltene GPI-Synthon konnte anschließend erfolgreich an ein Testpeptid ligiert werden. Die Modifikation eines rekombinant in *E. coli* exprimierten Prion Proteins war durch EPL nicht möglich.

Mit Hilfe des Prozesses des Protein *Trans*-Spleißens wurde das recPrP jedoch *in vivo* mit einem GPI-Anker modifiziert und stabil auf die Plasmamembran von Hefezellen, sowie murinen Neuroblastomazellen übertragen. Der anschließende Nachweis mit Immunofluoreszenz zeigte dabei die Lokalisation des Proteins auf der Außenseite der Zellen und entsprach somit dem Lokalisationsmuster des PrP^C.

Der Einfluss der GPI-Verankerung, sowie des N-Terminus auf das Aggregationsverhalten des Prion Proteins (PrP-GPI) wurde untersucht. Hierbei konnte ebenfalls die Verankerung des Proteins auf der Außenseite der Plasmamembran mittels Immunofluoreszenz, sowohl in Hefezellen als auch in N2a-Zellen, nachgewiesen werden. Um zu verifizieren, dass es sich um eine Verankerung des Proteins auf der Zellaußenseite mittels GPI-Anker handelt, wurden N2a-Zellen mit phosphatidyl-inositolspezifischer Phospholipase C inkubiert. Dies führte zu einer Freisetzung der Proteine von der Zelloberfläche in das Medium und lieferte den Beweis für die Membranverankerung durch den GPI-Anker.

Durch die Bodipy®-Markierung am freien Cystein des PrP-GPI war es ebenfalls möglich, die Internalisierung des Proteins in N2a-Zellen nachzuweisen. Hierbei zeigte sich bereits nach fünf Minuten eine Aufnahme des GPI-verankerten Proteins von der Außenseite der Zelle ins Zellinnere.

Ein weiterer Teil der Arbeit befasste sich mit der biophysikalischen Charakterisierung der Umfaltung des PrP-GPI. Unter Verwendung von DLS, GFC und ThT-Test konnte gezeigt werden, dass der pH-Wert des eingesetzten Puffers die Bildung von Oligomeren und Fibrillen beeinflusst. So war die Oligomerisierung des PrP-GPI bei einem pH-Wert des Puffers ≤ 5 gegenüber der Fibrillenbildung begünstigt. Hierbei konnte kein Einfluss des GPI-Ankers auf den Aggregationsprozess festgestellt werden. Allerdings zeigte das PrP-GPI (23-231) im Gegensatz zu PrP ohne N-Terminus (90-231) die Ausbildung mehrerer oligomerer Spezies.

Die semisynthetische Darstellung des Prion Proteins mit einem nativen GPI-Anker, sowie die Expression von hmPrP in *S. cerevisiae* mit den bekannten posttranslationalen Modifikationen (N-Glykane und GPI-Verankerungen) bieten die Möglichkeit, die PrP^C-PrP^{Sc}-Konversion in neuronalen Maus-Zellen (N2a-Zellen) genauer zu charakterisieren. So kann unter anderem der Einfluss der GPI-Verankerung auf die Umfaltungsreaktion durch die Verwendung der semisynthetischen Methoden, unabhängig von der Seitenketten-Glykosylierung untersucht werden. Ferner können die so dargestellten Proteine chemisch modifiziert werden, um die Internalisierung des PrP-GPI und die Umfaltungsreaktion von endogenem PrP^C *in vivo* zu analysieren.

7. Literaturverzeichnis

1. Eisele, Y. S. et al. (2010) *Peripherally Applied A β -Containing Inoculates Induce Cerebral β -Amyloidosis*. Science.
2. Gibbons, R. A. and Hunter, G. D. (1967) *Nature of the Scrapie Agent*. Nature, 215, 5105, 1041-1043.
3. Gajdusek, D. C. et al. (1966) *Experimental Transmission of a Kuru-like Syndrome to Chimpanzees*. Nature, 209, 5025, 794-796.
4. Gray, Françoise et al. (1999) *Neuronal Apoptosis in Creutzfeldt-Jakob Disease*. Journal of Neuro pathology & Experimental Neurology, 58, 4, 321-328.
5. Betmouni, S. et al. (1996) *Evidence for an early inflammatory response in the central nervous system of mice with Scrapie*. Neuroscience, 74, 1, 1-5.
6. Budka, Herbert et al. (1995) *Neuropathological Diagnostic Criteria for Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD) and Other Human Spongiform Encephalopathies (Prion Diseases)*. Brain Pathology, 5, 4, 459-466.
7. MacDonald, S. T. et al. (1996) *Prion protein genotype and pathological phenotype studies in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease*. Neuropathology and Applied Neurobiology, 22, 4, 285-292.
8. Ghetti, Bernardino et al. (1995) *Gerstmann-Sträussler-Scheinker Disease and the Indiana Kindred*. Brain Pathology, 5, 1, 61-75.
9. Jeffrey, M. et al. (1995) *Pathology of the transmissible spongiform encephalopathies with special emphasis on ultrastructure*. Micron, 26, 3, 277-298.
10. Soto, Claudio (2006) *Prions: The new biology of proteins* CRC/Taylor & Francis
11. Cho, Hyun J. (1976) *Is the scrapie agent a virus?* Nature, 262, 5567, 411-412.
12. Alper, Tikvah et al. (1966) *The exceptionally small size of the scrapie agent*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 22, 3, 278-284.
13. Alper, T. I. K. V et al. (1967) *Does the Agent of Scrapie Replicate without Nucleic Acid?* Nature, 214, 5090, 764-766.
14. Griffith, J. S. (1967) *Nature of the Scrapie Agent: Self-replication and Scrapie*. Nature, 215, 5105, 1043-1044.
15. Aguzzi, Adriano and Heikenwalder, Mathias (2006) *Pathogenesis of prion diseases: current status and future outlook*. Nat Rev Micro, 4, 10, 765-775.
16. Cohen, Fred E. (1999) *Protein misfolding and prion diseases*. Journal of Molecular Biology, 293, 2, 313-320.

17. Meyer, David I. and Dobberstein, Bernhard (1980) *Identification and Characterization of a Membrane Component Essential for the Translocation of Nascent Proteins across the Membrane of the Endoplasmic Reticulum*. The Journal of Cell Biology, 87, 2, 503-508.
18. Gorlich, Dirk et al. (1992) *A protein of the endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation*. Nature, 357, 6373, 47-52.
19. Sanders, Sylvia L. et al. (1992) *Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the ER*. Cell, 69, 2, 353-365.
20. Pohlschröder, Mechthild et al. (1997) *Protein Translocation in the Three Domains of Life: Variations on a Theme*. Cell, 91, 5, 563-566.
21. Matlack, Kent E. S. et al. (1998) *Protein Translocation: Tunnel Vision*. Cell, 92, 3, 381-390.
22. Connolly, Timothy and Gilmore, Reid (1989) *The signal recognition particle receptor mediates the GTP-dependent displacement of SRP from the signal sequence of the nascent polypeptide*. Cell, 57, 4, 599-610.
23. Hill, Andrew F. et al. (2003) *Molecular classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease*. Brain, 126, 6, 1333-1346.
24. Parchi, P. et al. (1997) *Typing prion isoforms*. Nature, 386, 232-233.
25. Shyng, Show Ling et al. (1995) *The N-terminal Domain of a Glycolipid-anchored Prion Protein Is Essential for Its Endocytosis via Clathrin-coated Pits*. Journal of Biological Chemistry, 270: 14793-14800.
26. Nunziante, Max et al. (2003) *Essential Role of the Prion Protein N Terminus in Subcellular Trafficking and Half-life of Cellular Prion Protein*. Journal of Biological Chemistry, 278: 3726-3734.
27. Sunyach, C. et al. (2003) *The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein*. Embo J, 22, 14, 3591-3601.
28. Prusiner, Stanley B. (2001) *Neurodegenerative Diseases and Prions*. The New England Journal of Medicine, 344, 20, 1516-1526.
29. Oesch, Bruno et al. (1985) *A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein*. Cell, 40, 4, 735-746.
30. Chesebro, Bruce et al. (1985) *Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain*. Nature, 315, 6017, 331-333.
31. Stahl, Neil et al. (1993) *Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing*. Biochemistry, 32, 8, 1991-2002.
32. Pan, K. M. et al. (1993) *Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 90, 23, 10962-10966.

33. Riesner, Detlev (2003) *Biochemistry and structure of PrPC and PrPSc*. British Medical Bulletin, 66, 1, 21-33.
34. Cohen, Fred E. and Prusiner, Stanley B. (1998) *Pathologic conformations of prion proteins*. Annual Review of Biochemistry, 67, 1, 793-819.
35. Weissmann, Charles (2004) *The state of the prion*. Nat Rev Micro, 2, 11, 861-871.
36. Soto, Claudio (2004) *Diagnosing prion diseases: needs, challenges and hopes*. Nat Rev Micro, 2, 10, 809-819.
37. Caughey, Byron et al. (2001) *Interactions and conversions of prion protein isoforms* Volume 57, 139-169.
38. Caughey, B. and Lansbury, P. T. (2003) *Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders*. Annu.Rev Neurosci, 26, 267-298.
39. Wang, Fei et al. (2010) *Role of the Highly Conserved Middle Region of Prion Protein (PrP) in PrP–Lipid Interaction*. Biochemistry, 49, 37, 8169-8176.
40. Makarava, N. et al. (2010) *Recombinant prion protein induces a new transmissible prion disease in wild-type animals*. Acta Neuropathol., 119, 2, 177-187.
41. Wang, Fei et al. (2010) *Generating a Prion with Bacterially Expressed Recombinant Prion Protein*. Science, 327, 5969, 1132-1135.
42. DeMarco, Mari L. and Daggett, Valerie (2004) *From conversion to aggregation: Protofibril formation of the prion protein*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101, 8, 2293-2298.
43. Scott, M. R. et al. (2000) *Transgenic models of prion disease*. Arch Virol Suppl, 16, 113-124.
44. Telling, G. C. et al. (1996) *Interactions between wild-type and mutant prion proteins modulate neurodegeneration in transgenic mice*. Genes & Development, 10, 14, 1736-1750.
45. Nisbet, R. M. et al. (2010) *Residues Surrounding the Glycosylphosphatidylinositol Anchor Attachment Site of PrP Modulate Prion Infection: Insight from the Resistance of Rabbits to Prion Disease*. The Journal of Virology, 84, 13, 6678-6686.
46. Naslavsky, Naava et al. (1997) *Characterization of Detergent-insoluble Complexes Containing the Cellular Prion Protein and Its Scrapie Isoform*. Journal of Biological Chemistry, 272, 10, 6324-6331.
47. Elfrink, Kerstin et al. (2008) *Structural changes of membrane-anchored native PrP C*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 105, 31, 10815-10819.
48. Bate, Clive et al. (2010) *Glycosylphosphatidylinositol Anchor Analogues Sequester Cholesterol and Reduce Prion Formation*. Journal of Biological Chemistry, 285: 22017-22026.

49. Naslavsky, Naava et al. (1999) *Sphingolipid Depletion Increases Formation of the Scrapie Prion Protein in Neuroblastoma Cells Infected with Prions*. Journal of Biological Chemistry, 274, 30, 20763-20771.
50. Taraboulos, A. et al. (1995) *Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform*. The Journal of Cell Biology, 129, 1, 121-132.
51. Baron, Gerald S. and Caughey, Byron (2003) *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, 17, 14883-14892.
52. Radford, H. E. and Mallucci, G. R. (2010) *The role of GPI-anchored PrP^C in mediating the neurotoxic effect of scrapie prions in neurons*. Curr. Issues Mol Biol, 12, 2, 119-127.
53. Hizume, Masaki et al. (2010) *Amino acid conditions near the GPI anchor attachment site of prion protein for the conversion and the GPI anchoring*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 391, 4, 1681-1686.
54. Chesebro, Bruce et al. (2010) *Fatal Transmissible Amyloid Encephalopathy: A New Type of Prion Disease Associated with Lack of Prion Protein Membrane Anchoring*. PLoS Pathogens, 6, 3, e1000800-.
55. Aguzzi, Adriano and O'Connor, Tracy (2010) *Protein aggregation diseases: pathogenicity and therapeutic perspectives*. Nat Rev Drug Discov, 9, 3, 237-248.
56. Arnold, J. E. et al. (1995) *The abnormal isoform of the prion protein accumulates in late-endosome-like organelles in scrapie-infected mouse brain*. The Journal of Pathology, 176, 4, 403-411.
57. Taraboulos, A. et al. (1992) *Synthesis and trafficking of prion proteins in cultured cells*. Molecular Biology of the Cell, 3, 8, 851-863.
58. Shyng, S. L. et al. (1994) *A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits*. J Cell Biol, 125, 6, 1239-1250.
59. Peters, P. J. et al. (2003) *Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway*. J Cell Biol, 162, 4, 703-717.
60. Wadia, Jehangir S. et al. (2008) *Pathologic Prion Protein Infects Cells by Lipid-Raft Dependent Macropinocytosis*. PLoS ONE, 3, 10, e3314-.
61. Vey, Martin et al. (1996) *Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93, 25, 14945-14949.
62. Paquet, Sophie et al. (2007) *PrP^C Does Not Mediate Internalization of PrP^{Sc} but Is Required at an Early Stage for De Novo Prion Infection of Rov Cells*. The Journal of Virology, 81, 19, 10786-10791.

63. Frankenfield, Kristen N. et al. (2005) *Influence of the N-terminal domain on the aggregation properties of the prion protein*. Protein Science, 14, 8, 2154-2166.
64. Chen, Shugui et al. (2010) *Interaction between Human Prion Protein and Amyloid-(A- β) Oligomers*. Journal of Biological Chemistry, 285, 34, 26377-26383.
65. Prusiner, Stanley B. (1998) *Prions*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95, 23, 13363-13383.
66. Priola, Suzette A. and Vorberg, Ina (2004) *Identification of possible animal origins of prion disease in human beings*. Lancet, 363, 9426, 2013-2014.
67. Weissmann, Charles et al. (2002) *Molecular biology of prions*. Acta Neurobiol.Exp., 62, 153-166.
68. Aguzzi, A. and Heppner, F. L. (2000) *Pathogenesis of prion diseases: a progress report*. Cell Death Differ, 7, 10, 889-902.
69. Dawson, Philip E. and Kent, Stephen B. H. (2000) *Synthesis of native proteins by chemical ligation*. Annual Review of Biochemistry, 69, 1, 923-960.
70. Muir, Tom W. et al. (1998) *Expressed protein ligation: A general method for protein engineering*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95, 12, 6705-6710.
71. Muir, Tom W. (2003) *Semisynthesis of proteins by expressed protein ligation*. Annual Review of Biochemistry, 72, 1, 249-289.
72. Paulus, H. (2000) *Protein splicing and related forms of protein autoprocessing*. Annu.Rev Biochem., 69, 447-496.
73. Zettler, Joachim et al. (2009) *The naturally split Npu DnaE intein exhibits an extraordinarily high rate in the protein trans-splicing reaction*. FEBS letters, 583, 5, 909-914.
74. Aranko, A. S. et al. (2009) *In vivo and in vitro protein ligation by naturally occurring and engineered split DnaE inteins*. PLoS.One., 4, 4, e5185-.
75. Olschewski, D. and Becker, C. F. (2008) *Chemical synthesis and semisynthesis of membrane proteins*. Mol Biosyst., 4, 7, 733-740.
76. Breydo, L. et al. (2007) *Nonpolar Substitution at the C-Terminus of the Prion Protein, a Mimic of the Glycosylphosphatidylinositol Anchor, Partially Impairs Amyloid Fibril Formation*. Biochemistry, 46, 3, 852-861.
77. Eberl, Heike et al. (2004) *Characterization of Recombinant, Membrane-attached Full-length Prion Protein*. Journal of Biological Chemistry, 279, 24, 25058-25065.
78. Paulick, M. G. et al. (2007) *Synthetic Analogues of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins and Their Behavior in Supported Lipid Bilayers*. Journal of the American Chemical Society, 129, 37, 11543-11550.

79. Doering, T. L. and Schekman R. (1996) *GPI anchor attachment is required for Gas1p transport from the endoplasmic reticulum in COP II vesicles*. EMBO Journal, 15, 182-191.
80. Liu, Ya Wen et al. (2006) *Arl1p is involved in transport of the GPI-anchored protein Gas1p from the late Golgi to the plasma membrane*. Journal of Cell Science, 119, 18, 3845-3855.
81. Smirnov, M. N. et al. (1967) *Red pigment of adenine-deficient yeast Saccharomyces cerevisiae*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 27, 3, 299-304.
82. Weisman, L. S. et al. (1987) *Multiple methods of visualizing the yeast vacuole permit evaluation of its morphology and inheritance during the cell cycle*. The Journal of Cell Biology, 105, 4, 1539-1547.
83. Sambrook, J. et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2*, Cold Spring Harbor Laboratory Press
84. Ausubel, F. M. et al. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology* Greene Publishing Associates / Wiley Interscience, New York
85. Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979) *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res, 7, 6, 1513-1523.
86. Mullis, Kary B. and Faloona, Fred A. (1987) *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods Enzymol., 155, 335-350.
87. Dower, William J. et al. (1988) *High efficiency transformation of E.coli by high voltage electroporation*. Nucleic Acids Research, 16, 13, 6127-6145.
88. Sanger, F. et al. (1977) *DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 74, 12, 5463-5467.
89. Printen, J. A. and Sprague, Jr (1994) *Protein-Protein Interactions in the Yeast Pheromone Response Pathway: Ste5p Interacts With All Members of the MAP Kinase Cascade*. Genetics, 138, 3, 609-619.
90. Bocharova, Olga V. et al. (2005) *In vitro Conversion of Full-length Mammalian Prion Protein Produces Amyloid Form with Physical Properties of PrPSc*. Journal of Molecular Biology, 346, 2, 645-659.
91. LEVINE-III, H. (1993) *Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease {beta}-amyloid peptides: Detection of amyloid aggregation in solution*. Protein Science, 2, 3, 404-410.
92. Wulff, Melanie (2010) *Zellbasierte Untersuchung des fluoreszenzgelabelten Vollängen-Prion-Proteins*.
93. Schröder, S. et al. (1995) *The Golgi-localization of yeast Emp47p depends on its di-lysine motif but is not affected by the ret1-1 mutation in alpha-COP*. The Journal of Cell Biology, 131, 4, 895-912.

94. Laemmli, U. K. (1970) *Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4*. Nature, 227, 5259, 680-685.
95. Merril, Carl R. et al. (1981) *Ultrasensitive Stain for Proteins in Polyacrylamide Gels Shows Regional Variation in Cerebrospinal Fluid Proteins*. Science, 211, 4489, 1437-1438.
96. Pace, C. N. et al. (1995) *How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein*. Protein Sci., 4, 11, 2411-2423.
97. Gill, Stanley C. and von Hippel, Peter H. (1989) *Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data*. Analytical Biochemistry, 182, 2, 319-326.
98. Edelhoch, Harold (1967) *Spectroscopic Determination of Tryptophan and Tyrosine in Proteins**. Biochemistry, 6, 7, 1948-1954.
99. Villain, Matteo et al. (2001) *Covalent capture: a new tool for the purification of synthetic and recombinant polypeptides*. Chemistry & Biology, 8, 7, 673-679.
100. Yan, Bing and Li, Wenbao (1997) *Rapid Fluorescence Determination of the Absolute Amount of Aldehyde and Ketone Groups on Resin Supports*. The Journal of Organic Chemistry, 62, 26, 9354-9357.
101. Schnölzer, Martina et al. (1992) *In situ neutralization in Boc-chemistry solid phase peptide synthesis*. International Journal of Peptide and Protein Research, 40, 3-4, 180-193.
102. Tsien, Roger Y. (1998) *The green fluorescent protein*. Annual Review of Biochemistry, 67, 1, 509-544.
103. Lu, Bao Yuan et al. (2001) *Oxidative folding of murine prion mPrP(23-231)*. European Journal of Biochemistry, 268, 13, 3767-3773.
104. Caughey, Byron W. et al. (1991) *Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy*. Biochemistry, 30, 31, 7672-7680.
105. Safar, J. et al. (1993) *Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein*. Journal of Biological Chemistry, 268, 27, 20276-20284.
106. Greenfield, Norma J. (2007) *Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure*. Nat.Protocols, 1, 6, 2876-2890.
107. Sasaki, K. et al. (2008) *Reversible monomer-oligomer transition in human prion protein*. Prion, 2, 3, 118-122.
108. Omaetxebarria, M. J. et al. (2006) *Isolation and Characterization of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Peptides by Hydrophilic Interaction Chromatography and MALDI Tandem Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 78, 10, 3335-3341.

109. Becker, C. F. et al. (2008) *Semisynthesis of a glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein*. *Angew.Chem.Int.Ed Engl.*, 47, 43, 8215-8219.
110. Doering, T. L. et al. (2001) *Detection of glycosphospholipid anchors on proteins*. *Curr.Protoc.Mol Biol*, Chapter 17, Unit17-.
111. Smith, D. F. and Prieto, P. A. (2001) *Special considerations for glycolipids and their purification*. *Curr.Protoc.Mol Biol*, Chapter 17, Unit17-.
112. Meri, S. et al. (1996) *Structural composition and functional characterization of soluble CD59: heterogeneity of the oligosaccharide and glycosphosphoinositol (GPI) anchor revealed by laser-desorption mass spectrometric analysis*. *Biochem J*, 316 (Pt 3), 923-935.
113. Baldwin, Michael A. (2005) *Analysis of Glycosylphosphatidylinositol Protein Anchors: The Prion Protein* Volume 405, 172-187.
114. Fankhauser, C. et al. (1993) *Structures of glycosylphosphatidylinositol membrane anchors from Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 35, 26365-26374.
115. Hooper, N. M. (2001) *Determination of glycosyl-phosphatidylinositol membrane protein anchorage*. *Proteomics.*, 1, 6, 748-755.
116. van Zanten, Thomas S. et al. (2009) *Hotspots of GPI-anchored proteins and integrin nanoclusters function as nucleation sites for cell adhesion*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
117. Mange, Alain et al. (2002) *PrP-dependent cell adhesion in N2a neuroblastoma cells*. *FEBS Letters*, 514, 2-3, 159-162.
118. Fioriti, Luana et al. (2005) *Cytosolic Prion Protein (PrP) Is Not Toxic in N2a Cells and Primary Neurons Expressing Pathogenic PrP Mutations*. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 12, 11320-11328.
119. Wang, Xinhe et al. (2006) *The Interaction between Cytoplasmic Prion Protein and the Hydrophobic Lipid Core of Membrane Correlates with Neurotoxicity*. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 19, 13559-13565.
120. Chesebro, Bruce et al. (2005) *Anchorless Prion Protein Results in Infectious Amyloid Disease Without Clinical Scrapie*. *Science*, 308, 5727, 1435-1439.
121. Aguzzi, Adriano (2005) *Cell Biology: Prion Toxicity: All Sail and No Anchor*. *Science*, 308, 5727, 1420-1421.
122. Winklhofer, K. F. et al. (2003) *Inhibition of Complex Glycosylation Increases the Formation of PrPsc*. *Traffic*, 4, 5, 313-322.
123. Olschewski, Diana et al. (2007) *Semisynthetic Murine Prion Protein Equipped with a GPI Anchor Mimic Incorporates into Cellular Membranes*. *Chemistry & Biology*, 14, 9, 994-1006.

124. Homans, S. W. et al. (1989) *Solution structure of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor glycan of Trypanosoma brucei variant surface glycoprotein*. *Biochemistry*, 28, 7, 2881-2887.
125. Weller, C. T. et al. (1994) *Solution structure and dynamics of a glycoinositol phospholipid (GIPL-6) from Leishmania major*. *Biopolymers*, 34, 9, 1155-1163.
126. Zuegg, Johannes and Gready, Jill E. (2000) *Molecular dynamics simulation of human prion protein including both N-linked oligosaccharides and the GPI anchor*. *Glycobiology*, 10, 10, 959-974.
127. Heller, Ulrich et al. (2003) *Post-translational Import of the Prion Protein into the Endoplasmic Reticulum Interferes with Cell Viability: A critical role for the putative transmembrane domain*. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 38, 36139-36147.
128. Stahl, Neil et al. (1990) *Differential release of cellular and scrapie prion proteins from cellular membranes by phosphatidylinositol-specific phospholipase C*. *Biochemistry*, 29, 22, 5405-5412.
129. Taraboulos, A. et al. (1990) *Acquisition of protease resistance by prion proteins in scrapie-infected cells does not require asparagine-linked glycosylation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 21, 8262-8266.
130. Stahl, Neil et al. (1992) *Glycosylphospholipid Anchors of the Scrapie and Cellular Prion Proteins Contain Sialic Acid*. *Biochemistry*, 31, 21, 5043-5053.
131. Varki, Ajit (2009) *Essentials of glycobiology 2nd ed*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
132. Stahl, Neil et al. (1987) *Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid*. *Cell*, 51, 2, 229-240.
133. Elortza, Felix et al. (2003) *Proteomic Analysis of Glycosylphosphatidylinositol-anchored Membrane Proteins*. *Molecular Cellular Proteomics*, 2, 12, 1261-1270.
134. Jung, Hye Ryung and Jensen, Ole Nørregaard (2006) *Proteomic analysis of GPI-anchored membrane proteins*. *Drug Discovery Today: Technologies*, 3, 3, 339-346.
135. Maeda, Yusuke et al. (2007) *Fatty Acid Remodeling of GPI-anchored Proteins Is Required for Their Raft Association*. *Molecular Biology of the Cell*, 18, 4, 1497-1506.
136. Paladino, Simona et al. (2004) *Protein oligomerization modulates raft partitioning and apical sorting of GPI-anchored proteins*. *The Journal of Cell Biology*, 167, 4, 699-709.
137. Legler, Daniel F. et al. (2004) *Differential insertion of GPI-anchored GFPs into lipid rafts of live cells*. *The FASEB Journal*, 03-1338fje.
138. Ohtani, Y et al. (1989) *Differential effects of α -, β - and γ -cyclodextrins on human erythrocytes*. *European Journal of Biochemistry*, 186, 1-2, 17-22.

139. Christian, A. E. et al. (1997) *Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content*. Journal of Lipid Research, 38, 11, 2264-2272.
140. Simons, Mikael et al. (1998) *Cholesterol depletion inhibits the generation of β -amyloid in hippocampal neurons*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95, 11, 6460-6464.
141. Pralle, A. et al. (2000) *Sphingolipid-Cholesterol Rafts Diffuse as Small Entities in the Plasma Membrane of Mammalian Cells*. The Journal of Cell Biology, 148, 5, 997-1008.
142. Bagnat, M. et al. (2000) *Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast*. Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A, 97, 7, 3254-3259.
143. Bagnat, M. and Simons, K. (2002) *Lipid Rafts in Protein Sorting and Cell Polarity in Budding Yeast Saccharomyces cerevisiae*. Biological Chemistry, 383, 10, 1475-1480.
144. Wachtler, Volker and Balasubramanian, Mohan K. (2006) *Yeast lipid rafts? - An emerging view*. Trends in Cell Biology, 16, 1, 1-4.
145. Baron, G. S. et al. (2002) *Conversion of raft associated prion protein to the protease-resistant state requires insertion of PrP-res (PrP(Sc)) into contiguous membranes*. Embo J, 21, 5, 1031-1040.
146. Solomon, Isaac H. et al. (2010) *Neurotoxic Mutants of the Prion Protein Induce Spontaneous Ionic Currents in Cultured Cells*. Journal of Biological Chemistry, 285, 34, 26719-26726.
147. Kim, Jae Il et al. (2010) *Mammalian Prions Generated from Bacterially Expressed Prion Protein in the Absence of Any Mammalian Cofactors*. Journal of Biological Chemistry, 285, 19, 14083-14087.
148. Supattapone, Surachai (2010) *What Makes a Prion Infectious?* Science, 327, 5969, 1091-1092.
149. Simoneau, Steve et al. (2007) *In Vitro and In Vivo Neurotoxicity of Prion Protein Oligomers*. PLoS Pathogens, 3, 8, e125-.
150. Sokolowski, Fabian et al. (2003) *Formation of Critical Oligomers Is a Key Event during Conformational Transition of Recombinant Syrian Hamster Prion Protein*. Journal of Biological Chemistry, 278, 42, 40481-40492.

8. Anhang

Ein herzliches Dankeschön...

...an Herrn Prof. Dr. M. Engelhard für die Überlassung dieses interessanten Themas und die fortwährende Unterstützung im Verlaufe meiner Arbeit.

...an Dr. Ralf P. Seidel für seine fachliche Unterstützung, seine Diskussionsbereitschaft, sein Engagement, seine unermüdliche Motivation und nicht zuletzt für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

...an Herrn Prof. Dr. H. Mootz nicht nur für die Übernahme des Zweitgutachtens, sondern auch für die wundervolle und interessante Kooperation.

...an Herrn Prof. Dr. R. S. Goody für die Aufnahme in seine Abteilung am MPI in Dortmund.

...an Prof. Dr. Jörg Tatzelt und Ulrike Resenberger für die fortwährende Unterstützung bei den Experimenten mit den mammalischen Zellen, die Bereitstellung der PrP-Antikörper, sowie der Hilfe bei allen Fragen rund um das Prion Protein.

...an Tulika Dhar für die Hilfe bei den *Trans*-Spleißexperimenten und die permanente Versorgung mit N2a-Zellen, Medien und Informationen.

...an alle Kolleginnen und Kollegen, insbesondere Jörg Saueremann, Kester Lausecker, Ines Heinrich, Marc Dittmann, Holger Gerlach, David Wiegand, Andrea Braunhausen und Frank Hoffmann, geht mein ausdrücklicher Dank für die schöne Zeit und die freundschaftliche Atmosphäre sowie die interessanten Diskussionen und vielen aufmunternden Worte.

...an Nina Ludwigs und Sascha Gentz geht mein ausdrücklicher Dank für die Hilfe bei der Durchführung vieler Experimente. Sie waren mir eine große Hilfe bei Klonierungen,

Expressionen, Protein- und Peptidaufreinigungen, sowie der SPPS und HPLC. Ohne sie wäre ich manches Mal in großen Zeitdruck geraten.

...an Martina Wischnewski die mir stets bei allen Fragen des Laboralltags sehr geholfen hat und auch immer für ein nettes Laborgespräch bereit war.

...an meine Bachelorstudentin Ann Katrin Greifenberg, welche mir nach ihrer Bachelorarbeit noch hilfreich und tatkräftig als Hiwi zur Seite stand.

...an meine Masterstudentin Melanie Wulff für die Modifikation des Prion Proteins mit einem Fluoreszenzmarker und die anschließenden Zellexperimente, sowie die weitere Unterstützung im Laboralltag.

...an meine Mutter und meinen Bruder für die unermüdliche Unterstützung und Motivation.

...an meine Mädels, die immer zu mir halten und mich einfach in allen Lebenslagen unterstützen und aufmuntern.

...an alle hier nicht namentlich genannten Kollegen und Kolleginnen Abteilung III für die schöne Arbeitsatmosphäre und die stets vorhandene Hilfsbereitschaft bei allen Laborproblemen.

...an Jens Moser, der mir nicht nur fachlich sondern auch menschlich jederzeit zur Seite steht und auf den ich mich in allen Lebenslagen verlassen kann. Für seine andauernde Unterstützung, Motivation und vieles mehr.

Lebenslauf

Name: Miria Christin Schumacher

Geburtsdatum 27.08.1978

Geburtsort Soest

Promotion:
seit Februar 2007 Promotion am Max-Planck Institut für molekulare Physiologie, Abteilung für physikalische Biochemie mit dem Hauptschwerpunkt auf Proteinexpression, -aufreinigung und Charakterisierung amyloider Proteine

Studium:
01.10.2002 – 16.02.2007 Diplomstudium Biologie HHU Düsseldorf, Abschluss als Diplom-Biologin mit der Note sehr gut (ETCS grade: A)

01.03.2006 – 16.02.2007 Diplomarbeit „Expression und Charakterisierung von Polyglutaminsequenzen“ bei apl. Prof. Dr. Martin Engelhard am MPI für molekulare Physiologie Dortmund

Berufsausbildung:
10.08.1998 – 21.06.2000 Berufskolleg Olsberg des HSK,
Abschluss: Staatlich geprüfte Biologisch-Technische Assistentin

Beruflicher Werdegang:
04.07.2000 – 30.09.2002 Biologisch-technische Assistentin am Max-Planck Institut für molekulare Physiologie in Dortmund, Abteilung für physikalische Biochemie mit dem Hauptschwerpunkt Proteinexpression und Aufreinigung sensorischer Rhodopsine.

Schulbildung:
03.08.1985 – 30.08.1989 Petri-Grundschule, Soest
01.08.1989 – 03.06.1998 Conrad-von-Soest Gymnasium, Soest