
Biophysikalische Charakterisierung von Oligomeren des rekombinanten Prionproteins

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

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Fabian Sokolowski
aus Berlin

Juni 2005

1. Gutachter: Prof. Dr. D. Naumann
2. Gutachter: Prof. Dr. W. Saenger

Disputation am 1. August 2005

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Das Prionprotein	1
1.1.1 Allgemeines	1
1.1.2 Grundlagen der Proteinfaltung	4
1.1.3 Das Prionprotein des Syrischen Hamsters	7
1.1.4 Das Prionprotein des Menschen	9
1.1.5 Prionkrankheiten	11
1.2 Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie	12
1.2.1 Physikalische Grundlagen	12
1.2.1.1 Allgemeines	12
1.2.1.2 Harmonischer Oszillator	13
1.2.1.3 Anharmonischer Oszillator	15
1.2.1.4 Molekülschwingungen	17
1.2.2 Messprinzip und Datenprozessierung	18
1.2.3 Infrarotspektroskopie an Proteinen	24
1.2.3.1 Messungen in wässriger Lösung	26
1.2.3.2 Sekundärstrukturbestimmung	27
1.2.3.3 Absorptionen der Aminosäureseitenketten	30
1.3 Zielsetzung	31
2 Material und Methoden	35
2.1 Proteinsynthese und -reinigung	35
2.1.1 Synthese und Reinigung von SHaPrP ⁹⁰⁻²³²	35
2.1.1.1 Expressionskonstrukt	35
2.1.1.2 Expression	36
2.1.1.3 Isolierung und Reinigung	36
2.1.1.4 Zweite Reinigungsstufe	40
2.1.1.5 Dot-Blot-Analyse	41
2.1.2 Synthese und Reinigung von ¹³ C- ¹⁵ N-SHaPrP ⁹⁰⁻²³²	42
2.1.3 Synthese und Reinigung von huPrP ⁹¹⁻²³¹	43

2.2	Darstellung von reinem SHaPrP ⁹⁰⁻²³² -Oligomer	43
2.3	FTIR-Spektroskopie	45
2.3.1	Zeitaufgelöste FTIR-Spektroskopie	45
2.3.1.1	Die Stopped-Flow-Apparatur	45
2.3.1.2	Allgemeine Messparameter	48
2.3.1.3	Durchführung der Proteinmessungen	49
2.3.1.4	Auswertung der Messdaten	51
2.3.1.5	Langzeitmessungen	53
2.3.2	Statische FTIR-Spektroskopie	54
2.3.3	FTIR-Spektroskopie bei variabler Temperatur	55
2.4	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	56
2.5	Lichtstreuung	57
2.6	Elektronenmikroskopie	58
2.7	Rasterkraftmikroskopie	58
2.8	FRET-Spektroskopie	58
2.9	Rekonstituierte planare Membranen	59
2.9.1	Prinzip der Membranpräparation	60
2.9.2	Aufbau der Messapparatur	61
2.9.3	Durchführung der Membranpräparation	63
2.10	Zellkulturexperimente	64
2.11	NMR-Spektroskopie	64
3	Ergebnisse	67
3.1	Charakterisierung der rekombinanten Prionproteine	67
3.1.1	Reinigungseffizienz und Identität der Konstrukte	67
3.1.2	FTIR-Spektren	69
3.2	Das kritische Oligomer des SHaPrP ⁹⁰⁻²³²	72
3.2.1	Rahmenbedingungen	72
3.2.2	Stopped-Flow-FTIR-Spektroskopie	73
3.2.3	Lichtstreuung und Elektronenmikroskopie	79
3.2.4	Rasterkraftmikroskopie	81
3.2.5	Langzeit-FTIR-Spektroskopie	84
3.2.6	Einfluss der Temperatur auf die Generierung des Oligomers	86
3.2.7	Darstellung von reinem Oligomer	87
3.3	Weitere Umfaltungs- und Aggregationsbedingungen	90
3.3.1	Einfluss der Ionenstärke	90
3.3.2	Einfluss von reduzierenden und oxidierenden Substanzen	95
3.3.2.1	Reduktion	96
3.3.2.2	Oxidation	97
3.3.3	Einfluss der Temperatur	97
3.4	Wechselwirkungen von SHaPrP ⁹⁰⁻²³² mit Membranen	101
3.4.1	FRET-Spektroskopie	101
3.4.2	Rekonstituierte planare Membranen	103
3.4.3	Neurotoxizität des kritischen Oligomers	105

4 Diskussion	107
4.1 Überblick	107
4.2 Rekombinantes Prionprotein als Modell für die Faltung des PrP ^C .	108
4.3 Stopped-Flow-FTIR-Spektroskopie	111
4.3.1 Zeitauflösung	112
4.3.2 Temperierung	113
4.4 Das kritische Oligomer des SHaPrP ⁹⁰⁻²³²	115
4.4.1 Stand der Literatur	115
4.4.2 Bildung des kritischen Oligomers	116
4.4.2.1 Bestimmung der Reaktionsordnung	116
4.4.2.2 Auswirkungen auf Aminosäureseitenketten	118
4.4.2.3 Oberflächenabhängige Aggregatgröße	119
4.4.2.4 Varianten der Bildungsbedingungen	119
4.4.3 Biologische Funktion von Oligomeren	121
4.4.3.1 Infektiosität	122
4.4.3.2 Rolle von Oligomeren und Fibrillen auf dem Fehlfaltungsweg des PrP ^C	122
4.4.3.3 Toxizität	123
4.4.4 Struktur des kritischen Oligomers	126
4.4.4.1 FTIR-spektroskopisch ermittelte Sekundärstruktur	126
4.4.4.2 Mögliche alternative Sekundärstrukturen	127
4.4.4.3 Morphologische Charakterisierung	129
4.4.4.4 Vergleich mit der Struktur amyloider Fibrillen . . .	129
4.5 Temperaturinduzierte Denaturierung/Aggregation	130
4.6 Wechselwirkung des SHaPrP ⁹⁰⁻²³² mit Membranen	131
4.6.1 Molekulare Ursachen der Wechselwirkung	131
4.6.2 Auswirkungen der Interaktion auf die Membranen	133
4.7 Ausblick	134
5 Zusammenfassung	139
6 Abstract	143
Literaturverzeichnis	147
Abkürzungen	159
Publikationen	163
Danksagung	165
Lebenslauf	167

Abbildungsverzeichnis

1.1	Faltungstrichter zur Illustrierung von Proteinfaltungswegen	6
1.2	Primärstruktur des Hamster-Prionproteins	7
1.3	NMR-Struktur des Hamster-Prionproteins	8
1.4	Primärstruktur des Prionproteins des Menschen	9
1.5	Potenzialkurven des harmonischen und anharmonischen Oszillators	16
1.6	Übersicht über die Molekülschwingungen	17
1.7	Schema eines Michelson-Interferometers	20
1.8	Berechnung von Spektren aus Interferogrammen	21
2.1	Chromatogramme der Größenausschluss-Chromatographie zur Trennung von oligomerem und monomerem SHaPrP ⁹⁰⁻²³²	44
2.2	Schema der Stopped-Flow-Apparatur	46
2.3	Verweilzeitkurve von einer Probe in der Küvette der Stopped-Flow-Apparatur	47
2.4	Schematischer Ablauf eines zeitaufgelösten Experiments	51
2.5	Präparation planarer Lipid-Doppelschichten	60
2.6	Apparatur zur Untersuchung planarer Lipid-Doppelschichten	61
3.1	Gel und HPLC-Chromatogramm von gereinigtem SHaPrP ⁹⁰⁻²³²	67
3.2	Detektion von Hamster-Prionprotein durch einen Antikörper mittels eines Dot-Blots	68
3.3	FTIR-Spektren vom SHaPrP ⁹⁰⁻²³² bei pH 4,2 und 7,0	69
3.4	FTIR-Spektren vom SHaPrP ⁹⁰⁻²³² und vom huPrP ⁹¹⁻²³¹	70
3.5	FTIR-Spektrum vom ¹³ C- ¹⁵ N-SHaPrP ⁹⁰⁻²³²	72
3.6	Differenzspektren der GuHCl-induzierten $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltungsreaktion des SHaPrP ⁹⁰⁻²³²	74
3.7	Verlauf der Differenzbanden-Intensitäten während der durch GuHCl induzierten $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltungsreaktion des SHaPrP ⁹⁰⁻²³²	75
3.8	2-D-Korrelationsanalyse der GuHCl-induzierten $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltungsreaktion des SHaPrP ⁹⁰⁻²³²	76
3.9	Asynchroner 2-D-Korrelationsplot der GuHCl-induzierten $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltungsreaktion des SHaPrP ⁹⁰⁻²³²	78
3.10	Totzeitereignisse während der GuHCl-induzierten $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltungsreaktion des SHaPrP ⁹⁰⁻²³²	79

3.11	Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit des GuHCl-induzierten SHaPrP ⁹⁰⁻²³² -Aggregationsprozesses mittels Lichtstreuung . . .	80
3.12	Langzeituntersuchung des GuHCl-induzierten SHaPrP ⁹⁰⁻²³² -Aggregationsprozesses mittels Lichtstreuung	81
3.13	Elektronenmikroskopische Aufnahmen von kritischen Oligomeren und Protofibrillen des SHaPrP ⁹⁰⁻²³²	82
3.14	Rasterkraftmikroskopische Aufnahme von kritischen Oligomeren des SHaPrP ⁹⁰⁻²³²	83
3.15	FTIR-Langzeituntersuchung des GuHCl-induzierten Aggregationsprozesses von SHaPrP ⁹⁰⁻²³²	85
3.16	Einfluss der Bildungstemperatur auf die Sekundärstruktur kritischer Oligomere des SHaPrP ⁹⁰⁻²³²	87
3.17	MALDI-TOF-massenspektrometrische Analyse der Stabilität kritischer Oligomere des SHaPrP ⁹⁰⁻²³²	89
3.18	Differenzspektren der durch NaCl induzierten $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltungsreaktion des SHaPrP ⁹⁰⁻²³²	91
3.19	Verlauf der Differenzbanden-Intensitäten während der durch NaCl induzierten $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltungsreaktion des SHaPrP ⁹⁰⁻²³²	92
3.20	2-D-Korrelationsanalyse der NaCl-induzierten $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltungsreaktion des SHaPrP ⁹⁰⁻²³²	94
3.21	Asynchroner 2-D-Korrelationsplot der NaCl-induzierten $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltungsreaktion des SHaPrP ⁹⁰⁻²³²	95
3.22	Differenzspektren der temperaturinduzierten Denaturierung und Aggregation des SHaPrP ⁹⁰⁻²³² in H ₂ O	98
3.23	Differenzspektren der temperaturinduzierten Denaturierung und Aggregation des SHaPrP ⁹⁰⁻²³² in D ₂ O	99
3.24	FTIR-spektroskopische Bestimmung der Denaturierungs-/Aggregationstemperatur des SHaPrP ⁹⁰⁻²³²	100
3.25	FRET-spektroskopische Untersuchung der SHaPrP ⁹⁰⁻²³² -Membranwechselwirkungen	102
3.26	Kapazitätskurven rekonstituierter planarer Membranen nach Inkubation mit SHaPrP ⁹⁰⁻²³²	104
4.1	Verlauf von Absorptionsbanden-Intensitäten bei einem temperierten Stopped-Flow-Experiment	114
4.2	Größenausschluss-Chromatogramme von bei unterschiedlichen Bedingungen gebildeten kritischen Oligomeren des SHaPrP ⁹⁰⁻²³² . . .	119
4.3	TROSY-Spektren vom monomeren und vom oligomeren ¹³ C- ¹⁵ N-SHaPrP ⁹⁰⁻²³²	135
4.4	Übersicht über bislang im TROSY-Spektrum identifizierte Aminosäurereste des ¹³ C- ¹⁵ N-SHaPrP ⁹⁰⁻²³²	137

Tabellenverzeichnis

1.1	Übersicht über die Amidbanden im Infrarotspektrum	25
1.2	Absorptionen der Protein-Sekundärstruktur im Infrarotspektrum . .	28
1.3	Absorptionen der Aminosäureseitenketten im Infrarotspektrum . . .	31
2.1	Elutionsgradient für die analytischen HPLC-Läufe	38
2.2	Elutionsgradient für die präparativen HPLC-Läufe	40
2.3	Kinetik-Messprotokolle für die zeitaufgelösten Messungen	50

5 Zusammenfassung

Das Prionprotein repräsentiert – der Nur-Protein-Hypothese folgend – den alleinigen Erreger der sog. Prionkrankheiten, einer Gruppe von übertragbaren neurodegenerativen Erkrankungen beim Menschen und bei Tieren. Die krankheitsauslösende Eigenschaft erhält das Prionprotein durch Umwandlung seiner apathogenen zellulären Form PrP^C in die pathogene Scrapie-Form PrP^{Sc}. Diese Umwandlung geht u. a. mit einer Änderung der vorwiegend durch α -Helices dominierten Sekundärstruktur in eine überwiegend von β -Faltblättern beherrschte Struktur ($\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltung) sowie einer damit verbundenen Aggregation des Proteins einher.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden diese $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltung und diese Aggregation am Modell des rekombinanten Prionproteins des Hamsters SHaPrP⁹⁰⁻²³² mit mehreren unabhängigen Methoden unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Der methodische Schwerpunkt lag dabei auf der zeitaufgelösten Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR-Spektroskopie).

Die monomere α -helikale Isoform des SHaPrP⁹⁰⁻²³² konnte unter geeigneten Bedingungen in eine β -Faltblatt-reiche oligomere Isoform überführt werden. Die während der $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltung abnehmenden α -helikalen Anteile der Sekundärstruktur spiegelten sich in IR-Differenzbanden bei 1653 cm^{-1} (Amid-I-Bereich) und 1551 cm^{-1} (Amid-II-Bereich) wider, während die entstehenden β -Faltblatt-Strukturen Differenzbanden bei 1691 und 1621 cm^{-1} (Amid-I-Bereich) sowie bei 1529 cm^{-1} (Amid-II-Bereich) hervorriefen. Die Lage der Amid-I- β -Faltblatt-Banden ist charakteristisch für intermolekulare und antiparallele β -Faltblatt-Strukturen mit starken Wasserstoffbrückenbindungen. Der Verlust an α -helikaler Sekundärstruktur und die Bildung von β -Faltblatt-Struktur fanden gleichzeitig statt, ohne dass eine ungefaltete intermediäre Isoform identifiziert werden konnte. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass innerhalb der experimentellen Totzeit von 250 ms kein β -Faltblatt gebildet wurde.

Der parallel zur $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltung erfolgte Aggregationsprozess des SHaPrP⁹⁰⁻²³² wurde mittels Lichtstreuung zeitaufgelöst untersucht. Dabei zeigte sich, dass das

monomere Protein über ein transient stabiles Oligomer – das sog. kritische Oligomer – zu Protofibrillen aggregierte. Die für die Bildung des kritischen Oligomers benötigte Zeit war ebenso wie dessen Größe von der Proteinkonzentration abhängig. Es wurde eine minimale Größe des kritischen Oligomers von 8 Monomereinheiten bestimmt.

Mittels Elektronenmikroskopie und Rasterkraftmikroskopie wurde das kritische Oligomer morphologisch charakterisiert. Es konnten sowohl kompakte als auch ringförmige Oligomere mit einem Durchmesser von 10–15 nm identifiziert werden, deren Höhe rund einem Viertel ihrer lateralen Ausdehnung entsprach.

Kritische Oligomere des SHaPrP^{90–232} wurden rein dargestellt und durch geeignete Pufferbedingungen stabilisiert; ihre Stabilität wurde mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie überprüft.

Die Wechselwirkungen zwischen dem SHaPrP^{90–232} in seiner monomeren und seiner oligomeren Form mit Modellmembranen wurden mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer-Spektroskopie und Experimenten an rekonstituierten planaren Membranen vergleichend untersucht. Es wurden deutliche Interaktionen bei der SHaPrP^{90–232}-Isoformen mit Membranen, die aus dem negativ geladenen Phosphatidylserin aufgebaut waren, beobachtet. Keine Interaktionen konnten hingegen mit Membranen, die aus dem neutralen Phosphatidylcholin aufgebaut waren, festgestellt werden. Das kritische Oligomer zeigte dabei in Abhängigkeit des pH-Werts im Vergleich zum Monomer ähnlich starke oder schwächere Wechselwirkungen mit den untersuchten Membranen. Weder das kritische Oligomer noch das monomere SHaPrP^{90–232} konnten Poren in den untersuchten Membranen bilden. Negativ geladene Membranen wurden jedoch durch beide Isoformen des Proteins signifikant destabilisiert.

Um die Bildung der kritischen Oligomere von der Entstehung temperaturinduzierter Aggregate des SHaPrP^{90–232} abgrenzen zu können, wurde die thermische Denaturierung des Proteins FTIR-spektroskopisch untersucht. Die durch Inkubation oberhalb der Denaturierungstemperatur entstandenen β -Faltblatt-Strukturen riefen Absorptionsbanden hervor, die von denen der kritischen Oligomere klar unterschieden werden konnten. So zeigten die bei der thermischen Denaturierung beobachteten β -Faltblatt-spezifischen Amid-I-Differenzbanden bei 1 690 und 1 624 cm^{-1} zwar auch eine antiparallele, intermolekulare β -Faltblatt-Struktur an, doch waren deren Wasserstoffbrücken deutlich schwächer als die des β -Faltblatts in den kritischen Oligomeren.

Um hochaufgelöste Informationen zur Struktur der kritischen Oligomere zu gewinnen, wurde vollständig mit dem Kohlenstoffisotop ^{13}C und dem Stickstoffisotop ^{15}N markiertes ^{13}C - ^{15}N -SHaPrP⁹⁰⁻²³² hergestellt, zu Oligomeren umgesetzt und ersten NMR-spektroskopischen Experimenten unterzogen. In den NMR-Spektren der kritischen Oligomere konnten nach vorläufiger Auswertung hauptsächlich Signale von Aminosäuren aus dem flexiblen N-terminalen Bereich des Proteins detektiert werden. Demgegenüber konnten praktisch keine Signale von Aminosäuren aus strukturell geordneten Abschnitten beobachtet werden. Durch weitergehende Auswertung der bislang gewonnenen Daten sollten aber sequenzspezifische Strukturinformationen zugänglich sein, anhand deren sich in naher Zukunft – durch Kombination mit den FTIR-Daten dieser Arbeit – erstmals ein Strukturmodell für die kritischen Oligomere des Prionproteins entwickeln ließe.

6 Abstract

According to the protein-only hypothesis, the prion protein represents the sole infectious agent of so-called prion diseases, which are a group of transmissible neurodegenerative diseases in both humans and animals. The prion protein gains its disease-causing function by conversion of its apathogenic cellular form PrP^C into the pathogenic scrapie form PrP^{Sc}. This conversion causes a change of the predominantly α -helical secondary structure into a structure dominated by β -sheets ($\alpha \rightarrow \beta$ refolding) and thereby leads to an aggregation of the protein.

Within the scope of the work at hand, this $\alpha \rightarrow \beta$ refolding and aggregation were studied using several independent methods under a variety of conditions with recombinant Syrian hamster prion protein (SHaPrP⁹⁰⁻²³²) as a model. Methodical emphasis was placed on time-resolved Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR spectroscopy).

Under appropriate conditions, the monomeric α -helical isoform of SHaPrP⁹⁰⁻²³² was transformed into a β -sheet rich oligomeric isoform. The loss of α -helical parts of the secondary structure during $\alpha \rightarrow \beta$ refolding was represented by IR difference bands at 1653 cm⁻¹ (amide I region) and 1551 cm⁻¹ (amide II region), whereas the formation of β -sheets was indicated by difference bands at 1691 and 1621 cm⁻¹ (amide I region) and at 1529 cm⁻¹ (amide II region). The position of the amide I β -sheet difference band is characteristic for intermolecular and antiparallel β -sheet structures with strong hydrogen bonds. The loss of α -helical secondary structure and the formation of β -sheets occurred concomitantly; an unfolded intermediate state has not been observed. Furthermore, it could be shown that no β -sheet was formed within the experimental dead time of 250 ms.

The aggregation process of SHaPrP⁹⁰⁻²³², which paralleled the $\alpha \rightarrow \beta$ refolding, was investigated by time-resolved light scattering. Thereby, it was observed that monomeric protein aggregated to protofibrils via a transient stable oligomer: the so-called critical oligomer. Both the time required for formation of the critical

oligomer and its size were dependent on protein concentration. The minimal size of the critical oligomer was assigned to 8 monomer units.

By electron microscopy and atomic force microscopy the critical oligomer was morphologically characterised. Both compact and annular shaped oligomers were identified. Their diameter was 10–15 nm with their height being only a quarter of their width.

Pure critical oligomers of SHaPrP^{90–232} were produced and stabilised by appropriate buffer conditions; their stability was checked by MALDI-TOF mass spectrometry.

Interactions between SHaPrP^{90–232} in its monomeric and in its oligomeric form with model membranes were comparatively investigated by fluorescence resonance energy transfer spectroscopy and by experiments with reconstituted planar membranes. Significant interactions of both isoforms with membranes constituted of negatively charged phosphatidylserine could be observed. No interactions, however, were detected with membranes constituted of neutral phosphatidylcholine. Compared to the monomer, the critical oligomer showed—depending on pH—equally strong or weaker interactions with the examined membranes. Neither the critical oligomer nor the monomeric SHaPrP^{90–232} were able to form pores within the examined membranes. However, negatively charged membranes were significantly destabilised by both isoforms of the protein.

To distinguish between formation of critical oligomers and creation of temperature induced aggregates of SHaPrP^{90–232}, thermal denaturation of the protein was investigated by FTIR spectroscopy. The β -sheet structures formed by incubation above the denaturation temperature evoked absorption bands that could be clearly distinguished from those of the critical oligomers: Although also the β -sheet specific amide I difference bands at 1690 and at 1624 cm⁻¹, observed during thermal denaturation, were indicative for antiparallel intermolecular β -sheet structure, the hydrogen bonds of this structure were clearly weaker than those of the β -sheets of critical oligomers.

To gain high resolution information on the structure of critical oligomers, ¹³C-¹⁵N-SHaPrP^{90–232} completely labelled with the carbon isotope ¹³C and the nitrogen isotope ¹⁵N was produced, transformed into critical oligomers and used for initial experiments by NMR spectroscopy. After primary evaluation of the data, mainly signals from the flexible N-terminal region of the protein could be observed in the NMR spectra of critical oligomers. Contrary, almost no signals from amino acids

lying in structured parts of the protein could be observed. After further evaluation of the data, more sequence specific structural information should be available, on the basis of which it should soon be possible to develop—in combination with the FTIR data of this work—a structural model of the critical oligomers of the prion protein.

Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
A β	β -Amyloid
AFM	Rasterkraftmikroskopie (für engl.: atomic force microscopy)
$\alpha \rightarrow \beta$	α -Helix \rightarrow β -Faltblatt
AU	Absorptionseinheit (für engl.: absorbance unit)
BSE	bovine spongiforme Enzephalopathie
CD	Zirkulardichroismus (für engl.: circular dichroism)
D	Deuteron (^2H)
D ₂ O	$^2\text{H}_2\text{O}$
DLS	dynamische Lichtstreuung
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DTGS	deutერიertes Triglycinsulfat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskopie
FKS	fötales Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
FTIR	Fourier-Transform-Infrarot
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GuHCl	Guanidinhydrochlorid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (für engl.: <i>high performance liquid chromatography</i>)
HSQC	heteronukleare Einquantenkohärenz-Spektroskopie (für engl.: <i>heteronuclear single quantum coherence</i>)
huPrP ^{nnn-nnn}	Fragment vom Prionprotein des Menschen, die Aminosäuren nnn- nnn umfassend
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid

IR	Infrarot
LB	Luria-Bertani
M	$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$
MALDI-TOF	matrixunterstützte Laser-Desorptions-/Ionisations-Flugzeit-analyse (für engl.: <i>matrix assisted laser desorption ionisation —time of flight</i>)
MCT	Quecksilber-Cadmium-Tellur (für engl.: <i>mercury-cadmium-telluride</i>)
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
muPrP ^{nnn–nnn}	Fragment vom Prionprotein der Maus, die Aminosäuren nnn–nnn umfassend
MUSIC	multiplizitätselektiver In-Phasen-Kohärenztransfer (für engl.: <i>multiplicity selective in-phase coherence transfer</i>)
MWCO	Molekulargewichtsausschluss (für engl.: <i>molecular weight cut off</i>)
NBD-PE	N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamin
NMR	kernmagnetische Resonanz (für engl.: <i>nuclear magnetic resonance</i>)
NOESY	Kern-Overhauser-Effekt-Spektroskopie (für engl.: <i>nuclear Overhauser and exchange spectroscopy</i>)
NTA	Nitrilotriessigsäure (für engl.: <i>nitrilotriacetic acid</i>)
ovPrP ^{nnn–nnn}	Fragment vom Prionprotein des Schafs, die Aminosäuren nnn–nnn umfassend
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (für engl.: <i>phosphate-buffered saline</i>)
PC	Phosphatidylcholin
PK	Proteinase K
PMCA	zyklische Amplifikation von fehlgefaltetem Prionprotein (für engl.: <i>protein misfolding cyclic amplification</i>)
POPG	Palmitoyl-oleoylphosphatidylglycerin
PrP	Prionprotein
PrP ^C	zelluläres, apathogenes Prionprotein
PrP ^{res}	gegen Proteinase K resistentes Fragment des PrP ^{Sc}
PrP ^{Sc}	pathogenes Scrapie-Prionprotein

PS	Phosphatidylserin
Rh-PE	N-(Rhodamin-B-sulfonyl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamin
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (für engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SHaPrP ⁿⁿⁿ⁻ⁿⁿⁿ	Fragment vom Prionprotein des Syrischen Hamsters, die Aminosäuren nnn-nnn umfassend
SLS	statische Lichtstreuung
TBST	trisgepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20 (für engl.: <i>Tris-buffered saline with Tween 20</i>)
TBST-M	trisgepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20 und Milchpulver
TDC	Übergangsdipolkopplung (für engl.: <i>transition dipole coupling</i>)
TFA	Trifluoressigsäure (für engl.: <i>trifluoroacetic acid</i>)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TROSY	für die transversale Relaxation optimierte Spektroskopie (für engl.: <i>transverse relaxation-optimized spectroscopy</i>)
vCJD	variante Form der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung (für engl.: <i>variant Creutzfeldt-Jakob disease</i>)

Aminosäuren wurden mit den üblichen 1- und 3-Buchstaben-Codes abgekürzt, die hier nicht aufgeführt sind.

Publikationen

Artikel in Zeitschriften

- Sokolowski, F.; Modler, A. J.; Masuch, R.; Zirwer, D.; Baier, M.; Lutsch, G.; Moss, D. A.; Gast, K. und Naumann, D. 2003. Formation of critical oligomers is a key event during conformational transition of recombinant Syrian hamster prion protein. *J. Biol. Chem.*, **278**: 40481–40492.
- Kneipp, J.; Miller, L. M.; Spassov, S.; Sokolowski, F.; Lasch, P.; Beekes, M. und Naumann, D. 2004. Scrapie-infected cells, isolated prions, and recombinant prion protein: a comparative study. *Biopolymers*, **74**: 163–167.
- Kneipp, J.; Miller, L. M.; Spassov, S.; Sokolowski, F.; Lasch, P.; Beekes, M. und Naumann, D. 2004. Prion structure investigated *in situ*, *ex vivo*, and *in vitro* by FTIR spectroscopy. *Proc. SPIE*, **5321**: 17–25.
- Modler, A. J.; Fabian, H.; Sokolowski, F.; Lutsch, G.; Gast, K. und Damaschun, G. 2004. Polymerization of proteins into amyloid protofibrils shares common critical oligomeric states but differs in the mechanisms of their formation. *Amyloid*, **11**: 215–231.
- Sokolowski, F. und Naumann, D. 2005. FTIR study on thermal denaturation and aggregation of recombinant hamster prion protein SHaPrP^{90–232}. *Vib. Spectr.*, **38**: 39–44.

Poster

- Masuch, R.; Sokolowski, F.; Beekes, M.; Baier, M.; Moss, D. A. und Naumann, D.: FT-IR study on conformational changes of the recombinant hamster prion protein PrP^{90–233} induced by pH and denaturant variation. *9th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules*, Prag 2001.
- Sokolowski, F.; Masuch, R.; Modler, A. J.; Baier, M.; Gast, K. und Naumann, D.: Conformational conversion of the recombinant hamster prion protein SHaPrP^{90–232} studied by Fourier transform infrared spectroscopy and dynamic light scattering. *Zweites Treffen der Nationalen TSE-Forschungsplattform*, Berlin 2002.

Sokolowski, F.; Modler, A. J.; Gast, K. und Naumann, D.: Kinetic investigations of the structural transition of recombinant prion protein (SHaPrP⁹⁰⁻²³²) by FTIR spectroscopy and dynamic light scattering. *10th European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules*, Szeged 2003.

Danksagung

Prof. Dr. Dieter Naumann danke ich herzlich dafür, dass er mir die Anfertigung dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe am Robert-Koch-Institut (RKI) ermöglicht hat, für seine engagierte Unterstützung in allen Phasen dieses Projekts und nicht zuletzt für seine stetige Diskussionsbereitschaft und die konstruktive Kritik während der Planung von Experimenten und der Publikation von Ergebnissen.

Prof. Dr. Wolfram Saenger danke ich für seine Bereitschaft, das Zweitgutachten für diese Arbeit anzufertigen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Klaus Gast und Dr. Andreas Modler (Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Berlin-Buch; jetzt an der Universität Potsdam) für die überaus konstruktive Kooperation, die zahlreichen fruchtbaren Diskussionen und die Durchführung der Lichtstreuungsexperimente. Dr. Gudrun Lutsch (Max-Delbrück-Centrum) danke ich für die Erstellung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Prof. Dr. Ulrich Seydel danke ich für die Ermöglichung meines Forschungsaufenthalts in seiner Arbeitsgruppe am Forschungszentrum Borstel. Ihm und seiner gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die freundliche Aufnahme und die interessanten Diskussionen. Dr. Sven-Olaf Hagge hat mich in die Methode der Untersuchungen an rekonstituierten planaren Membranen eingeführt und mir gute Anregungen zu den entsprechenden Abschnitten dieser Arbeit gegeben, Dr. Thomas Gutschmann hat die rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen erstellt, und Christine Hamann hat die FRET-spektroskopischen Experimente durchgeführt. Dafür danke ich ihnen herzlich.

Prof. Dr. Bernd Reif und Muralidhar Dasari (Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie Berlin) danke ich für die gute und konstruktive Zusammenarbeit und die Erstellung und Auswertung der NMR-Spektren.

Bei Dr. Eberhard Hildt (RKI) bedanke ich mich für anregende Diskussionen und die gute Kooperation. Dr. Michael Baier (RKI) danke ich für die gute Zusammen-

arbeit und Wing Fai Simon Mok (RKI) für die Durchführung der Zellkulturexperimente.

Bei Dr. Carolin Kirschner, Dr. Janina Kneipp und Dr. Ralf Moritz möchte ich mich für den guten und netten Start in diese Promotion und ihre stete Hilfsbereitschaft bedanken. Ralf Moritz bin ich zu großem Dank für seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft und Unterstützung, die Durchführung einiger massenspektrometrischer Analysen sowie die gründliche Durchsicht dieser Arbeit verpflichtet.

Allen Mitgliedern von Dieter Naumanns Arbeitsgruppe danke ich für die angenehme Atmosphäre während meiner Promotion. Maren Stämmler danke ich außerdem für die Unterstützung am MALDI-TOF-Massenspektrometer, Roswitha Puttkammer für ihre Hilfe bei der Prionproteinherstellung und Sashko Spassov für die Erstellung des Dot-Blots.

Bei Agnes Krewer bedanke ich mich für das Korrekturlesen dieser Arbeit und bei Marei Hacke für die Korrektur des Abstracts. Meinen Eltern, Dr. Tobias Sokolowski, Stefanie Märshenz, Ruth Krewer, www.e-fellows.net und der Konsul Karl und Dr. Gabriele Sandmann Stiftung danke ich für ihre ideelle und finanzielle Unterstützung während meiner Promotion.

Lebenslauf

Zur Person

Name: Fabian Heinz Stephan Sokolowski
Geburtstag und -ort: 30. Juli 1975 in Berlin-Charlottenburg

Schule

1982–1995: Wald-Grundschule und Wald-Oberschule (Gymnasium) in Berlin
Juni 1995: Abitur mit den Leistungskursen Chemie und Geschichte

Zivildienst

1995–1996: Zivildienst im Umweltamt der Hansestadt Lübeck

Studium

1996–2001: Studium der Biochemie an der Freien Universität Berlin
Okt. 1998: Vordiplom in Biochemie
Juli 2001: Diplom in Biochemie (Diplomarbeit „Expression, Reinigung und FTIR-spektroskopische Strukturuntersuchung des rekombinanten Prionproteins des Syrischen Hamsters (SHaPrP^{90–233})“ am Robert-Koch-Institut in Berlin)

Jobs und Praktika

Aug.–Okt. 1999: Praktikum im Labor des Botanischen Gartens in Kiew, Ukraine
Feb.–Juli 2000: Studentische Hilfskraft im Institut für Angewandte Genetik der Freien Universität Berlin
Aug. 2001–Juni 2005: Doktorarbeit am Robert-Koch-Institut; von Aug. 2001 bis Jan. 2005 als wissenschaftlicher Angestellter beschäftigt
seit Aug. 2004: Teilzeittätigkeit bei der Patentverwertungsagentur der Berliner Hochschulen (ipal GmbH)

Stipendien

Nov. 2000–Okt. 2005: Online-Stipendium von www.e-fellows.net
Jan. 2005–Juni 2005: Promotionsstipendium der Konsul Karl und Dr. Gabriele Sandmann Stiftung