

2 Material und Methoden

Alle Standardchemikalien wurden in höchster Reinheitsstufe von Applichem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Die Hersteller von speziellen Materialien und Chemikalien sind jeweils gesondert angegeben.

2.1 Proteinsynthese und -reinigung

2.1.1 Synthese und Reinigung von SHaPrP^{90–232}

2.1.1.1 Expressionskonstrukt

Zur Expression des für die SHaPrP^{90–232}-Synthese notwendigen Gens wurde eine Linie des Bakteriums *Escherichia coli* (*E. coli*), Stamm BL21(DE3) (Novagen, Madison, USA), verwendet, die im Vorfeld dieser Arbeit mit einem pET-15b-Vektor (Novagen) transformiert wurde, in den die DNA-Sequenz der Aminosäuren 90–232 vom Prionprotein des Syrischen Hamsters (*Mesocricetus auratus*) kloniert wurde. Der pET-15b-Vektor besitzt u. a. ein Ampicillinresistenz-vermittelndes Gen und einen T7-Promotor, der von einem *lac*-Operator reguliert wird. Dadurch kann die Expression der Gene, deren Transkription am T7-Promotor beginnt, mit Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG) induziert werden. Zwischen dem Promotor und dem klonierten DNA-Abschnitt für das Prionprotein waren die Nukleotide für sechs Histidinreste und eine Thrombinschnittstelle lokalisiert, so dass die Synthese des Proteins mit einem sog. His-*tag* (*tag*, engl. für „Anhängsel“) erfolgte, der nach Reinigung des Proteins durch Thrombin abgespalten wurde. Durch diese Vektorkonstruktion bedingt war das SHaPrP^{90–232} am N-Terminus um das Tetrapeptid Gly–Ser–His–Met verlängert (vgl. Abschnitt 1.1.3). Der Stamm BL21(DE3) ist

defizient für die proteasecodierenden Gene *lon* und *ompT* und eignet sich daher gut für die Überexpression¹ von Proteinen.

2.1.1.2 Expression

Die Expression erfolgte mittels drei aufeinander folgender Kulturen. 100 µl einer bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Glycerin-Bakterien-Suspension wurden in 10 ml LB-Medium mit Ampicillin (1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl, $100\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Ampicillin, pH 7,0) bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 7–8 Stunden bei 155 rpm inkubiert² (Vorkultur) und anschließend vollständig in 1 l LB-Medium mit Ampicillin überführt, um bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 155 rpm für weitere 16 Stunden zu inkubieren. Diese Zwischenkultur wurde im Anschluss für 10 min bei Raumtemperatur (RT) und $2\,350\cdot\text{g}$ ($4\,700\text{ rpm}$ im SLA-3000-Rotor) zentrifugiert.³ Das Sediment der Zwischenkultur wurde in rund 5 ml LB-Medium mit Ampicillin resuspendiert, in 1 l neues LB-Medium mit Ampicillin überführt und für 30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 155 rpm inkubiert (Hauptkultur). Durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM wurde die Überexpression des SHaPrP⁹⁰⁻²³² induziert. Die verstärkte Proteinsynthese erfolgte während weiterer 5 Stunden Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 155 rpm. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $2\,350\cdot\text{g}$ wurde der Überstand verworfen und das Sediment bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.1.1.3 Isolierung und Reinigung

Die Isolierung des SHaPrP⁹⁰⁻²³² aus den *E. coli*-Zellen erfolgte nach einem in der Arbeitsgruppe bereits etablierten Protokoll, das unter Zugrundelegung des von Jackson *et al.* (1999a) verwendeten Protokolls erarbeitet wurde.

Dazu wurden die sedimentierten Zellen der Hauptkultur zum Aufschluss mit 50 ml Lysispuffer (100 mM Tris, 200 mM NaCl, 10 mM Na-EDTA, 0,2 % Triton X-100, 2,75 MU Lysozym, pH 7,2) versetzt und bei RT erst 30 min und nach Zugabe von 500 U Benzonase und von Magnesiumchlorid in einer Endkonzentration von rund 19 mM für weitere 5 min gerührt. Das aus einer Zentrifugation bei RT und

¹Wie allgemein üblich, soll hier der Begriff „Überexpression“ die durch beispielsweise IPTG induzierte verstärkte Expression eines Gens und die dadurch verstärkte Synthese des entsprechenden Proteins beschreiben.

²Für diesen wie für alle folgenden Inkubationsschritte wurde ein „Innova 4000“-Schüttler (New Brunswick Scientific, Edison, USA) verwendet.

³Alle Zentrifugationen erfolgten – sofern nicht anders erwähnt – in einer „Sorvall RC 5C Plus“-Zentrifuge (Kendro, Newtown, USA). Der Berechnung der relativen Zentrifugalbeschleunigung wurde hierbei der arithmetische Mittelwert des Abstands der Probe von der Rotorachse zugrunde gelegt. Die Einstellung an der Zentrifuge erfolgte stets in rpm.

10 240 · g (10 000 rpm im GSA-Rotor) gewonnene Sediment wurde in 50 ml Waschpuffer (50 mM Tris, pH 7,4) resuspendiert. Diese Suspension wurde erneut äquivalent zentrifugiert und das Sediment (die gewaschenen lysierten Zellen) bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert oder unmittelbar im Anschluss zur Isolierung des SHaPrP⁹⁰⁻²³² weiter bearbeitet.

Zum Lösen und zur Reduktion des in *inclusion bodies* vorliegenden SHaPrP⁹⁰⁻²³² wurden die lysierten Zellen in 20 ml Reduktionspuffer (6 M GuHCl, 50 mM Tris, 50 mM DTT, pH 7,4) resuspendiert und für 30 min gerührt. Nach einer Zentrifugation für 30 min bei 25 280 · g (18 000 rpm im SS-34-Rotor) wurde der Überstand durch einen 0,45- μm -Filter (Schleicher & Schuell, Dassel) mit Hilfe einer Vakuumfiltrationseinrichtung filtriert.

5 ml Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose (Ni-NTA-Agarose; Qiagen, Hilden) wurden mit 15 ml Guanidinpuffer (50 mM Tris, 6 M GuHCl, pH 7,4) gewaschen und für 5 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 310 · g (2 000 rpm im SS-34-Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Der nach der Lyse der Zellen und dem Lösen des SHaPrP⁹⁰⁻²³² erhaltene filtrierte Überstand wurde zu der Ni-NTA-Agarose gegeben und für 30 min bei RT und 155 rpm geschüttelt, um eine möglichst gute Bindung des SHaPrP⁹⁰⁻²³² an die Agarose zu gewährleisten. Anschließend wurde die Ni-NTA-Agarose mit dem gebundenen SHaPrP⁹⁰⁻²³² für 5 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 310 · g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Ni-NTA-Agarose zum Waschen jeweils zweimal mit 15 ml Guanidinpuffer resuspendiert und anschließend zentrifugiert. Diese und die weiteren Waschschritte erfolgten, um noch unspezifisch an die Ni-NTA-Agarose gebundenes Protein zu entfernen. Die in 15 ml Guanidinpuffer resuspendierte Agarose wurde in eine am unteren Ende von einem porösen Polymer verschlossene Säule („Econo-Pac Column“; Bio-Rad, Hercules, USA) gefüllt und mit weiteren 5 ml Guanidinpuffer sowie 5 ml Elutionspuffer 1 (50 mM Tris, 6 M GuHCl, 1 mM Imidazol, pH 7,4) gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution des PrP mit 10 ml Elutionspuffer 2 (50 mM Tris, 6 M GuHCl, 250 mM Imidazol, pH 7,4). Um eine zu hohe Konzentration des SHaPrP⁹⁰⁻²³² im Elutionspuffer und damit eine evtl. Dimerbildung zu verhindern, wurden im Auffanggefäß 25 ml Guanidinpuffer vorgelegt.

Proben aller Waschschritte sowie eine Probe der Elution mit Elutionspuffer 2 wurden mittels einer analytischen Reversed-Phase-HPLC-Säule (ET 250/4 Nucleosil 300-7 C8; Macherey-Nagel, Düren bzw. ZORBAX SB-C8 4,6 mm · 15 cm; Agilent, Waldbronn) auf einer HPLC-Anlage (HP 1050 Serie; Agilent) auf ihre Zusammensetzung hin überprüft. Als Elutionsmittel dienten dabei Wasser + 0,1 % Trifluores-

Tabelle 2.1: Elutionsgradient für die analytischen HPLC-Läufe

Zeit/min	Anteil von Eluent B in Eluent A ^a
0	5 %
2	5 %
4	30 %
16	60 %
18	95 %
22	95 %
24	5 %

^aEluent A: Wasser + 0,1 % TFA

Eluent B: Acetonitril + 0,1 % TFA

sigsäure (TFA) (Eluent A) und Acetonitril + 0,1 % TFA (Eluent B) in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen. Die Flussrate betrug $1,2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, der verwendete Elutionsgradient ist aus Tab. 2.1 ersichtlich. Die gewählte Detektionswellenlänge war 278 nm. Die Konzentration des im Guanidinpuffer gelösten SHaPrP⁹⁰⁻²³² wurde aus den entsprechenden Peakflächen im Chromatogramm ermittelt und im Anschluss durch Verdünnung mit Guanidinpuffer auf $0,25 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ eingestellt.

Durch Kupfersulfat in einer Endkonzentration von $2 \text{ } \mu\text{M}$ wurde das SHaPrP⁹⁰⁻²³² unter Rühren innerhalb von 16 Stunden bei RT oxidiert. Die Vollständigkeit der Oxidation wurde durch eine HPLC-Analyse überprüft (die Retentionszeiten von reduzierter und oxidierte Form des SHaPrP⁹⁰⁻²³² unterscheiden sich). Anschließend wurde die Proteinlösung mit Hilfe einer Druck-Ultrafiltrationszelle (Vivacell 250; Sartorius, Göttingen) auf eine Konzentration von $1\text{--}2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ eingengt. Dazu wurde eine Ultrafiltrationsmembran aus Polyethersulfon mit einem Molekulargewichtsausschluss (MWCO) von 5 000 verwendet (Sartorius). Die Filtration erfolgte durch Anlegen eines Stickstoffdrucks von 4 bar und unter Schütteln der Zelle bei 200 rpm („Certomat M⁴-Schüttler; Braun, Melsungen).

Das so konzentrierte SHaPrP⁹⁰⁻²³² wurde nun tropfenweise unter Rühren 1:10 in Trispuffer (20 mM Tris, pH 8,0) verdünnt. Durch die schlagartige Reduktion der GuHCl-Konzentration von 6 M auf 0,6 M erfolgte die Rückfaltung des Proteins in seine native Konformation. Da bei diesem Vorgang Protein präzipitierte, wurde die Lösung für 1–2 Stunden stehen gelassen und anschließend filtriert. Die SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Lösung wurde nun in einer Druck-Ultrafiltrationszelle auf ein Volumen von etwa 50 ml eingengt und anschließend in einem Dialyseschlauch (MWCO 3 500;

Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, USA) gegen 1,5 l Trispuffer dialysiert, um das restliche GuHCl zu entfernen. Der Dialysepuffer wurde hierbei zweimal nach je 1 Stunde gewechselt. Nach dem zweiten Wechsel wurde der SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Lösung ein Aliquot (100 µl) entnommen und anschließend 10 U Thrombin (Amersham Biosciences, Piscataway, USA) pro mg SHaPrP⁹⁰⁻²³² zugesetzt. Während der folgenden 16 Stunden Dialyse bei RT wurde der His-tag durch das Thrombin abgespalten.

Die Vollständigkeit der His-tag-Abspaltung wurde durch eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) überprüft. Hierzu wurden jeweils 5, 10 und 20 µl der SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Lösung mit und ohne His-tag mit 10 µl 4x-Probenpuffer (Invitrogen, Carlsbad, USA) versetzt und auf 40 µl mit dest. Wasser aufgefüllt. Nach 10-minütiger Inkubation bei 70 °C wurden 20 µl jeden Ansatzes auf ein 10%iges Polyacrylamidgel (NuPAGE 10 % Bis-Tris-Gel; Invitrogen) aufgetragen. Als Standard diente der „Mark12 Unstained Standard“ (Invitrogen), von dem ebenfalls 20 µl aufgetragen wurden. Die 35-minütige Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 200 V unter Verwendung von MES-Puffer (50 mM Tris, 50 mM MES, 3,5 mM SDS, 1 mM EDTA, pH 7,3) als Laufpuffer durchgeführt. Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel für 10 min in Fixierlösung (50 % Methanol, 10 % Essigsäure) fixiert. Anschließend erfolgte für 30 min eine Färbung in einer Coomassie-Blau-Lösung (40 % Methanol, 10 % Essigsäure, 0,1 % Coomassie Brilliant Blue R-250), wobei die Färbelösung einmal nach 5 min ausgewechselt wurde. Die Entfärbung wurde so lange durchgeführt, bis keine unerwünschte Hintergrundfärbung mehr zu sehen war, wobei die Entfärbelösung (10 % Methanol, 7,5 % Essigsäure) je nach Bedarf, mindestens jedoch zweimal gewechselt wurde. Alle Lösungen wurden dem Gel in einer solchen Menge zugesetzt, dass es gut bedeckt war. Fixierung, Färbung und Entfärbung wurden bei 100 rpm und RT auf einem Ika-Vibrax-Vxr-Schüttler (Ika-Labortechnik, Staufen) durchgeführt. Das Gel wurde nach der Entfärbung zur Dokumentation gescannt.

Die SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Lösung wurde nach Bestätigung der vollständigen His-tag-Abspaltung mit 5 µl Protease-Inhibitor („Complete, mini, EDTA-frei“; Roche, Mannheim) versetzt und mit einer Druck-Ultrafiltrationszelle auf 10 ml eingengt. Anschließend erfolgte eine 18-stündige Dialyse gegen 1 l Phosphatpuffer (20 mM NaH₂PO₄, pH 7,0), wobei der Dialysepuffer anfangs zweimal nach je 1 Stunde gewechselt wurde. Die Reinheit des SHaPrP⁹⁰⁻²³² wurde mittels einer HPLC-Analyse überprüft und erreichte im Allgemeinen 80–90 %. Die Proben wurden bis zur Durchführung der zweiten Reinigungsstufe bei –20 °C in Phosphatpuffer gelagert.

2.1.1.4 Zweite Reinigungsstufe

Um eine Reinheit des SHaPrP⁹⁰⁻²³² von über 95 % zu erlangen, wurde das vorgeereinigte Protein auf eine semipräparative Reversed-Phase-HPLC-Säule (EP 250/16 Nucleosil 300-7 C8; Macherey-Nagel) aufgetragen. Dies geschah unter Verwendung eines Lösungsmittelzugangs, da die Probenschleife nur sehr geringe Volumina fassen kann. Um eine Präzipitation des Proteins in der Pumpe oder in den Zuleitungen der HPLC-Anlage zu verhindern, wurde das gesamte System erst gründlich mit Guanidinpuffer gespült, anschließend das SHaPrP⁹⁰⁻²³² in 6 M GuHCl aufgegeben und das System schließlich abermals mit Guanidinpuffer gespült. Nach Waschen des Systems mit Eluent A wurde mit der Elution unter Verwendung des in Tab. 2.2 dokumentierten Gradienten begonnen. Die Flussrate betrug beim Spülen mit GuHCl und beim Auftragen des Proteins aufgrund der höheren Viskosität der Lösungen $8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, beim Spülen mit Eluent A und bei der Elution selbst $10 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Die Detektionswellenlänge war 278 nm.

Die das SHaPrP⁹⁰⁻²³² enthaltende Fraktion wurde aufgefangen und das Acetonitril bei RT an einem Rotationsverdampfer zu großen Teilen abgezogen. Die Probe wurde eingefroren und bei $-10 \text{ }^\circ\text{C}$ und 0,2 mbar gefriergetrocknet („Super Modulyo Freeze Dryer“; Edwards High Vacuum, Crawley, Großbritannien). Auf diese Weise wurde das restliche Acetonitril vollständig und die TFA zu großen Teilen aus der Probe entfernt. Da TFA eine störende Absorption im mittleren Infrarot (bei 1672 cm^{-1}) besitzt und daher vollständig entfernt werden muss, wurde das SHaPrP⁹⁰⁻²³² in Guanidin-Phosphatpuffer (20 mM NaH_2PO_4 , 6 M GuHCl, pH 7,0) aufgenommen und gegen den gleichen Puffer dialysiert. Durch GuHCl in dieser

Tabelle 2.2: Elutionsgradient für die präparativen HPLC-Läufe der zweiten Reinigungsstufe

Zeit/min	Anteil von Eluent B in Eluent A ^a
0	5 %
2	5 %
4	30 %
28	60 %
30	95 %
34	95 %
36	5 %

^aEluent A: Wasser + 0,1 % TFA

Eluent B: Acetonitril + 0,1 % TFA

Konzentration ist eine völlige Entfaltung des SHaPrP⁹⁰⁻²³² gesichert, wodurch auch die TFA-Anteile in Puffer gelöst und so aus der Probe entfernt werden konnten, die unter nativen Bedingungen dem Außenmedium unzugänglich sind.

Nun erfolgte die Rückfaltung des SHaPrP⁹⁰⁻²³² durch schlagartige Verdünnung der GuHCl-Konzentration auf 0,6 M, indem die Proteinlösung tropfenweise 1:10 in Phosphatpuffer verdünnt wurde. Nach Präzipitation für 1–2 Stunden wurde das ausgefallene Protein abfiltriert und die Lösung gegen Phosphatpuffer (20 mM NaH₂PO₄, pH 7,0) dialysiert.

Der Teil des SHaPrP⁹⁰⁻²³², der nicht bei pH 7,0, sondern bei pH 4,2 gemessen werden sollte, wurde anschließend gegen Acetatpuffer (20 mM Na-Acetat, pH 4,2) dialysiert.

Die Volumina der SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Lösung wurden bei der zweiten Reinigungsstufe stets so gewählt, dass eine Proteinkonzentration von 10 mg · ml⁻¹ nicht überschritten wurde. Vom letzten Dialysepuffer wurde jeweils eine Probe entnommen und bei den FTIR-Messungen als Referenz verwendet.

Die Reinheit des SHaPrP⁹⁰⁻²³² wurde jeweils durch eine HPLC-Analyse unter Zugrundelegung des in Tab. 2.1 dargestellten Gradienten und ggf. durch eine SDS-PAGE überprüft. Beide Verfahren wurden wie im Abschnitt Abb. 2.1.1.3 beschrieben durchgeführt.

2.1.1.5 Dot-Blot-Analyse

Für die Dot-Blot-Analyse wurden reines SHaPrP⁹⁰⁻²³² und mit PK verdautes Hamsterhirnhomogenat als Kontrolle eingesetzt. Ein Teil des SHaPrP⁹⁰⁻²³² wurde in PBS + Zwittergent (8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,1 % Zwittergent, pH 7,2) auf 19 µg · ml⁻¹ bis 19 ng · ml⁻¹ verdünnt. Ein anderer Teil des SHaPrP⁹⁰⁻²³² wurde wie auch das verdaute Hamsterhirnhomogenat in Lämmli-Probenpuffer (120 mM Tris-HCl, 4 % SDS, 10 % 2-Mercaptoethanol, 20 % Glycerin, 0,05 % Bromphenolblau, pH 6,8) für 5 min auf 100 °C erwärmt und im gleichen Puffer entsprechend verdünnt. Die resultierenden Konzentrationen der Hamsterhirnsuspension waren 10⁻⁴ und 10⁻⁵ Hirnäquivalente. Ein Hirnäquivalent entspricht dabei der aus einem Hamsterhirn extrahierbaren Gesamtmenge an Substanzen. Jeweils 10 µl der Lösungen bzw. Suspensionen wurden auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (Millipore, Schwalbach) unter Verwendung einer Vakuum-Dot-Blot-Kammer mit 96 Löchern (Bio-Dot Mikrofiltrations-Apparat, Bio-Rad) aufgetragen. Zum Immunnachweis des Prionproteins wurde die Membran

zunächst 2 Stunden in TBST-M (3 % fettarmes Milchpulver in TBST [10 mM Tris-HCl, 133 mM NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 7,4]) bei RT und anschließend über Nacht mit dem monoklonalen Antikörper 3F4 (1:20000 in TBST-M), der aus Mäusen gewonnen wurde, inkubiert. Durch jeweils dreimaliges Waschen in TBST und TBST-M für je 5 min wurden überschüssige Antikörper entfernt. Die Membran wurde nun 90 min bei RT mit dem sekundären Antikörper (Anti-Maus-IgG aus Rindern mit gebundener Alkaliner Phosphatase; Dako, Hamburg; 1:10000 in TBST-M) inkubiert und anschließend wie zuvor gewaschen. Nach kurzem Antrocknen zwischen Filterpapier wurde die noch feuchte Membran mit 5 ml CDP-Star (1:50 im Nachweispufer; Invitrogen), dem Substrat der Alkalinen Phosphatase, versetzt. Nach 5 min wurde die Membran zwischen Filterpapier getrocknet. Nach einer weiteren Stunde wurde ein Autoradiografie-Film (XAR-2; Kodak, Rochester, USA) auf die Membran gelegt, innerhalb von 10 min belichtet und anschließend entwickelt.

2.1.2 Synthese und Reinigung von ^{13}C - ^{15}N -SHaPrP⁹⁰⁻²³²

Vollständig markiertes ^{13}C - ^{15}N -SHaPrP⁹⁰⁻²³² wurde durch Anzucht der gleichen transformierten Bakterien gewonnen, die auch für das nicht markierte SHaPrP⁹⁰⁻²³² verwendet wurden (vgl. Abschnitt 2.1.1.1). Allerdings erfolgten Genexpression und Proteinsynthese in Minimalmedium mit ^{13}C -Glucose und ^{15}N -Ammoniumchlorid als einzigen Quellen für Kohlenstoff bzw. Stickstoff.

So wurden 50 μl der *E. coli*-Suspension in 10 ml Medium A mit Ampicillin (42 mM Na_2HPO_4 , 22 mM KH_2PO_4 , 9 mM NaCl, 1 % $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, 0,2 % ^{13}C -Glucose, 1 mM MgSO_4 , 300 μM CaCl_2 , 170 μM EDTA, 30 μM FeCl_3 , 6 μM ZnCl_2 , 1 μM CuCl_2 , 1 μM H_3BO_3 , 0,4 μM CoCl_2 , 0,07 μM MnCl_2 , 1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Biotin, 1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Thiamin, 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Ampicillin) unter Schütteln als Vorkultur über Nacht bei 37 °C und 155 rpm inkubiert und anschließend vollständig in 1 l Medium A mit Ampicillin überführt (Hauptkultur).⁴ Nach weiteren 7 Stunden Inkubation unter gleichen Bedingungen erreichte die Hauptkultur eine optische Dichte von 1 (gemessen bei 600 nm). Nun wurde durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM die Überexpression induziert. Zusätzlich wurden bei der Induktion noch 0,2 g ^{13}C -Glucose zugegeben, um die Expressions- und Synthesebedingungen zu optimieren. Nach Inkubation über Nacht wurden die Zellen geerntet, lysiert und gewaschen wie im Abschnitt 2.1.1.2 beschrieben. Die Proteinisolierung und -reinigung erfolgte wie

⁴Es wurde keine Zwischenkultur angesetzt.

im Abschnitt 2.1.1.3 beschrieben und führte bei geringerer Ausbeute, verglichen mit der unter Expressionsbedingungen in Vollmedium, zu einem Produkt, das bereits ohne zweite Reinigungsstufe eine hohe Reinheit besaß und für die Experimente verwendet werden konnte.

2.1.3 Synthese und Reinigung von huPrP⁹¹⁻²³¹

Die Synthese und Reinigung des huPrP⁹¹⁻²³¹ erfolgte analog zu der des SHaPrP⁹⁰⁻²³² (vgl. Abschnitt 2.1.1). In den pET-15b-Vektor wurden für die Überexpression des huPrP⁹¹⁻²³¹ die den Aminosäuren 91–231 des menschlichen Prionproteins (vgl. Abschnitt 1.1.4) entsprechenden Nukleotide kloniert. Wie das SHaPrP⁹⁰⁻²³² war auch das gereinigte huPrP⁹¹⁻²³¹ N-terminal um die Aminosäuren Gly–Ser–His–Met verlängert.

2.2 Darstellung von reinem SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Oligomer

Um die Eigenschaften des kritischen Oligomers des SHaPrP⁹⁰⁻²³² genauer untersuchen zu können, wurde das Oligomer rein dargestellt. Dazu wurden $0,4 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ SHaPrP⁹⁰⁻²³² in 20 mM Na-Acetat (pH 4,2) mit dem gleichen Volumen 2 M GuHCl in 20 mM Na-Acetat (pH 4,2) in einem Becherglas gemischt. Der Umfaltungs- und Aggregationsprozess wurde folglich bei einer Proteinkonzentration von $0,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ in 1 M GuHCl bei pH 4,2 durchgeführt. Nach 16-stündiger Inkubationszeit wurde der Prozess durch Dialyse gegen 20 mM Na-Acetat (pH 4,2) gestoppt. Der Dialysepuffer wurde dabei zweimal gewechselt. Der Reaktionsansatz wurde anschließend in einer Zentrifugal-Ultrafiltrationseinheit (Vivaspin 20 mit Polyethersulfon-Membran [MWCO 5000]; Sartorius) auf rund $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ konzentriert. Durch anschließende Größenausschluss-Chromatographie über eine Superose-12-Säule (Amersham Biosciences) wurde das Oligomer von noch nicht umgesetztem Monomer getrennt (Abb. 2.1a).

Die Superose-12-Säule wurde dazu an einer HPLC-Anlage (HP 1050 Serie, Agilent) eingesetzt und der maximal zulässige Druck der Anlage dem Säulenmaterial entsprechend auf 28 bar begrenzt. Als mobile Phase wurde 1 M GuHCl in 20 mM Na-Acetat (pH 4,2) bei einer Flussrate von $0,8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ verwendet. Die Fraktionen der Oligomere und der Monomere wurden separat gesammelt. Um eine

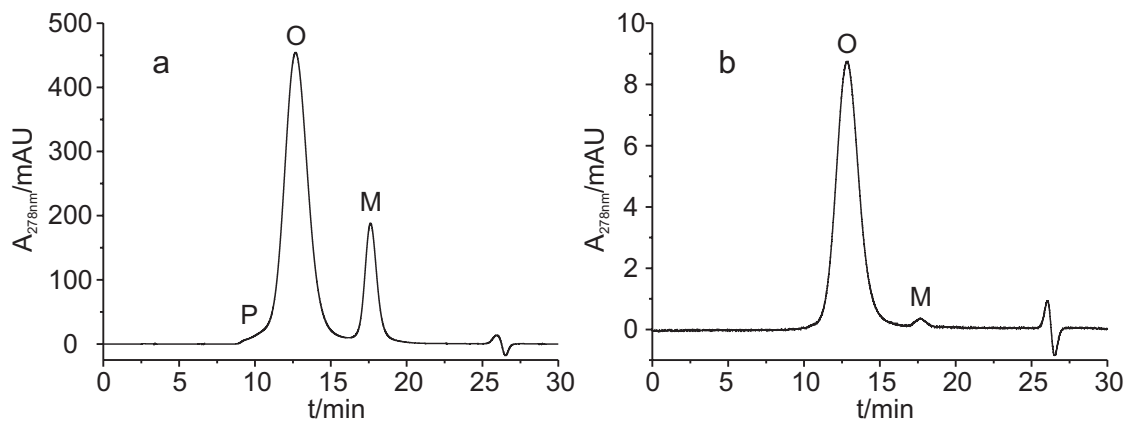


Abbildung 2.1: Chromatogramme der Größenausschluss-Chromatographie. (a) Präparativer Lauf des Oligomer-Monomer-Gemischs nach 16-stündiger Inkubation des SHaPrP⁹⁰⁻²³² in 1 M GuHCl bei pH 4,2. Das Oligomer (O) stellte rund 80 % des gesamten Reaktionsansatzes dar, während auf das noch nicht umgesetzte Monomer rund 20 % entfielen. Größere Aggregate (P) waren praktisch noch nicht entstanden und konnten lediglich als kleine Schulter des Oligomerpeaks beobachtet werden. (b) Analytischer Lauf der Oligomerfraktion aus Chromatogramm a, die über Nacht gegen 20 mM Na-Acetat (pH 4,2) dialysiert wurde.

weitere Aggregation der so abgetrennten Oligomere durch erneuten Kontakt mit 1 M GuHCl zu verhindern, wurden die Oligomere unmittelbar im Anschluss an die Größenausschluss-Chromatographie erneut gegen 20 mM Na-Acetat (pH 4,2) dialysiert. Der Dialysepuffer wurde wiederum zweimal gewechselt. Die Oligomere wurden nun erneut in einer Zentrifugal-Ultrafiltrationseinheit (Vivaspin 20 bzw. Vivaspin 500 mit Polyethersulfon-Membran [MWCO 5 000]; Sartorius) konzentriert und zur Qualitätskontrolle mittels Größenausschluss-Chromatographie analysiert (Abb. 2.1b). Es konnte lediglich ein sehr kleiner Monomerpeak beobachtet werden ($\leq 2\%$ der Fläche des Oligomer-Peaks), der auf eine Desintegration der Oligomere während der Dialyse bei RT schließen ließ. Wurden die Oligomere anschließend jedoch bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, konnte mittels Größenausschluss-Chromatographie auch nach Monaten keine weitere Desintegration oder sonstige Veränderung detektiert werden.

2.3 FTIR-Spektroskopie

2.3.1 Zeitaufgelöste FTIR-Spektroskopie

2.3.1.1 Die Stopped-Flow-Apparatur

Für die zeitaufgelösten FTIR-spektroskopischen Messungen wurde eine mit einem FTIR-Spektrometer (IFS 28/B, Bruker Optik, Ettlingen) verbundene Stopped-Flow-Apparatur verwendet (Masuch und Moss, 2003). Der Einsatz einer solchen Apparatur bietet sich immer dann an, wenn schnelle Reaktionen, die durch das Mischen zweier Substanzen induziert werden, zeitaufgelöst untersucht werden sollen.

Die Funktionsweise der FTIR-Stopped-Flow-Apparatur soll im Folgenden kurz anhand des in Abb. 2.2 dargestellten Schemas erläutert werden: Die mit Wasser gefüllten Spritzen A und B wurden von einer Pumpe angetrieben, so dass das gesamte System durch einen konstanten Wasserfluss gespült wurde (Ventilstellung 1 in Abb. 2.2b). In dieser Ventilstellung konnten die Probenschleifen über Hamilton-Spritzen mit den Reagenzien A und B befüllt werden. Anschließend wurden die Probenschleifen in den weiterhin applizierten konstanten Wasserfluss geschaltet (Ventilstellung 2 in Abb. 2.2b). Dadurch drückte das Wasser die Reagenzien aus den Probenschleifen durch den Diffusionsmikromischer und die Messzelle zum Abfall hin. Der Mikromischer sorgte dabei für eine effiziente Mischung beider Reagenzien zu einer homogenen Probe; die durch diese Mischung induzierte und zu untersuchende Reaktion wurde gestartet. Wenn die Messzelle maximal mit Probe befüllt war (vgl. „Ermittlung der Stoppzeit“), wurde der Wasserfluss durch das Schalten des Stopp/Fluss-Ventils unterbrochen (engl.: *stopped flow*, Ventilstellung 3 in Abb. 2.2b) und ein Triggersignal an das Spektrometer gesendet, das die Messung daraufhin startete.

Um einen Rückdruck von der Messzelle ins System zu vermeiden, war die Messzelle während der Messung nicht nur auf der Abflusseite, sondern auch auf der Zuleitungsseite druckfrei gegen den Abfall geschaltet. Die Spritzen waren während der Messung mit dem Reservoir verbunden und konnten auf diese Weise wieder befüllt werden. Die Probenschleifen blieben während der gesamten Messung in ihrer aktuellen Position (Ventilstellung 3 in Abb. 2.2b), da ein erneutes Schalten ihrer Ventile, die sich dicht an der Messzelle befinden, unerwünschte Erschütterungen hervorgerufen hätte.

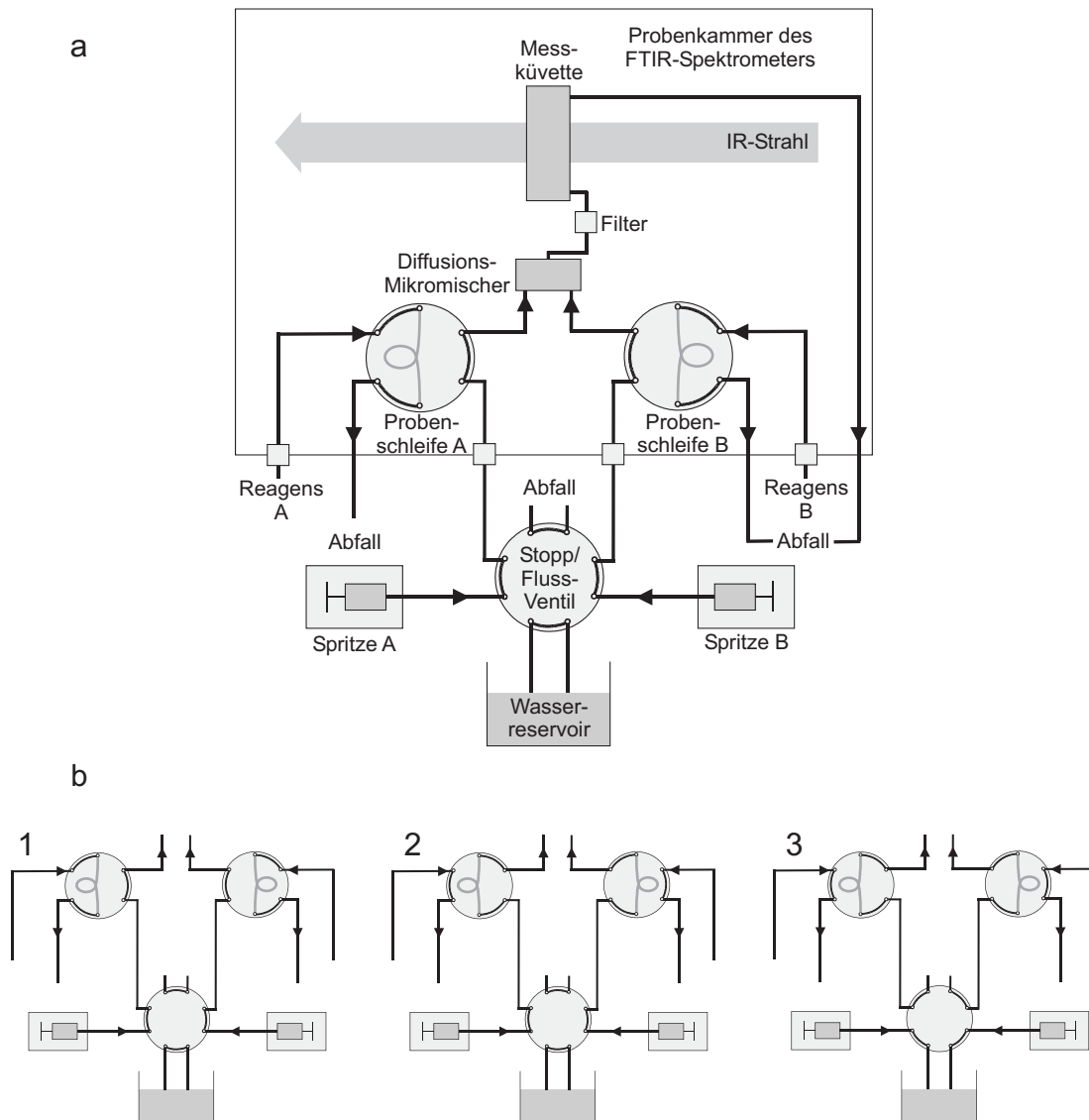


Abbildung 2.2: (a) Schematische Darstellung der Stopped-Flow-Apparatur. (b) Ventilstellungen für den kontinuierlichen Wasserfluss (1), für den Transport der Probe in die Messzelle (2) und während der Messung (3). Nach Masuch und Moss (2003).

Nach Beendigung der Messung wurden die Probenschleifen wieder in den Befüllungszustand geschaltet. Das Stoppventil wurde ebenfalls geschaltet, so dass die Messzelle nun mit Wasser gereinigt werden konnte (abermals Ventilstellung 1 in Abb. 2.2b). Die Probenschleifen waren so angeordnet, dass sie von einer Seite befüllt und durch einen umgekehrten Fluss zur gleichen Seite entleert wurden. Das verhinderte unerwünschte Verdünnungseffekte und ermöglichte einen sparsamen Einsatz der Probe.

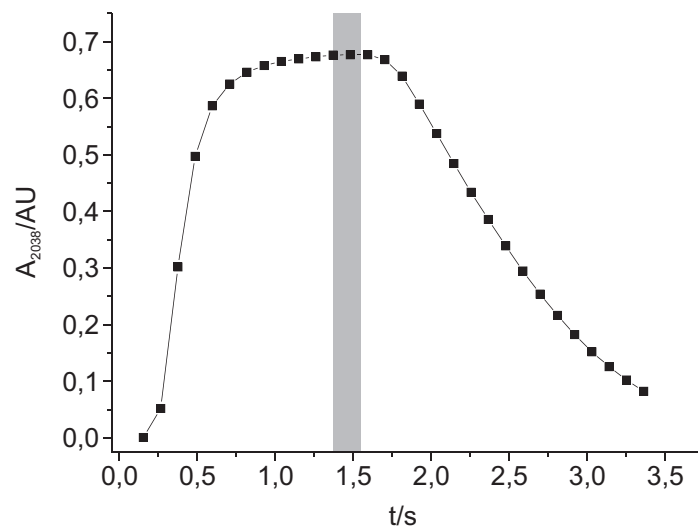


Abbildung 2.3: Verweilzeitkurve von Kaliumhexacyanoferrat(II) in der Küvette der Stopped-Flow-Apparatur bei einer Flussrate von $1,0 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Der graue Kasten markiert den Zeitbereich, der für die Stopzeit gewählt werden musste, um Messungen bei optimaler Befüllung der Küvette durchführen zu können. Er liegt bei ca. $\frac{4}{5}$ der Zeit, über die sich das Plateau erstreckt.

Ermittlung der Stopzeit Damit die Küvette während der Messung optimal mit der Probe gefüllt war, musste die Stopzeit des Systems bestimmt werden. Als Stopzeit versteht man dabei die Zeit, nach der das Stopp/Fluss-Ventil auf „stopp“ geschaltet wird. Wird das Stopp/Fluss-Ventil zu früh geschaltet, ist die Küvette noch nicht vollständig mit der Probe befüllt, wird es zu spät geschaltet, ist die Probe (zumindest teilweise) wieder aus der Küvette gedrückt. Da allerdings ein deutlich größeres Probenvolumen eingesetzt wurde, als für die einfache Befüllung der Küvette notwendig war, hatte die entsprechende Verweilzeitkurve einen plateauähnlichen Verlauf (Abb. 2.3), so dass ein gewisser Spielraum hinsichtlich der Stopzeit bestand.

Um die optimale Stopzeit zu bestimmen, wurde nach Befüllung beider Proben-schleifen mit 100 mM Kaliumhexacyanoferrat(II) eine Messung mit den Parametern gestartet, die auch für die folgenden Proteinmessungen verwendet wurden. In mehreren aufeinander folgenden Messungen wurden die Stopzeit dabei variiert und die Intensität der Absorptionsbande des Kaliumhexacyanoferrats(II) bei 2038 cm^{-1} jeweils ausgelesen. Durch Korrelation von Bandenintensität und Stopzeit wurde die Stopzeit schließlich so gewählt, dass die Messungen zu einem Zeitpunkt im hinteren Bereich des angenäherten Plateaus der Verweilzeitkurve durchgeführt wurden (grauer Kasten in Abb. 2.3).

Nach jeder Änderung am Stopped-Flow-System wurde die Stoppzeit neu bestimmt. Bei einer Flussrate von $3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ betrug sie je nach Konfiguration des Systems $510 \pm 10 \text{ ms}$.

Totzeit Die Messzelle der Stopped-Flow-Apparatur (AquaSpec, Micro-Biolytics, Freiburg) war anders als herkömmliche Zellen nicht zerlegbar. Durch ihre feste Verklebung bot sie den großen Vorteil hoher Schichtdickenstabilität. Da das Stopped-Flow-System bei Drücken von 20–30 bar arbeitet, kam es dennoch zu einer Expansion der Zelle, die jedoch innerhalb von 70 ms nach Wegfall des Drucks wieder relaxierte. Zusammen mit einer mittleren Zeit von 50 ms, die die gemischte Probe für den Weg vom Mischer bis in die IR-Zelle benötigte, ergab sich hieraus eine Totzeit von 120 ms. Mit dem Senden des Triggersignals unmittelbar beim Schalten des Stopp/Fluss-Ventils wurde die Zeit auf 0 gesetzt (die Probe war dann bereits 50 ms alt). Damit die Relaxation der Messzelle zu Messbeginn vollständig abgeschlossen ist, wurde die Messung nicht unmittelbar, sondern erst nach einer Wartezeit von 100 ms gestartet. Dies würde eine rechnerische Totzeit des Experiments von 150 ms ergeben. Tatsächlich konnte das Spektrometer den ersten *scan*⁵ jedoch nicht exakt nach der Wartezeit von 100 ms beginnen, da sich hierfür der bewegliche Interferometerspiegel (vgl. Abschnitt 1.2.2) in seiner Ausgangsposition befinden musste. Experimentell wurde der mittlere Aufnahmezeitpunkt des ersten Spektrums, sofern dieses im doppelseitigen Akquisitionsmodus bei einer Modulationsfrequenz des Laserinterferogramms von 200 kHz aus der Addition je eines *scans* beim Spiegelvor- und Spiegelrücklauf berechnet wurde, mit 200 ms bestimmt. Somit ergab sich eine minimale Gesamttotzeit des Systems von rund 250 ms.

2.3.1.2 Allgemeine Messparameter

Das verwendete „IFS 28/B“-Spektrometer war mit einer Rapid-Scan-Option ausgestattet, die eine maximale Modulationsfrequenz des Laserinterferogramms („Spiegel-

⁵Ein *scan* umfasst die Bewegung des Interferometerspiegels aus seiner Startposition bis zur maximalen Auslenkung (Spiegelvorlauf) und von dort zurück zur Startposition (Spiegelrücklauf). Je nach Akquisitionsmodus und aufzunehmendem Datenbereich variieren die maximale Auslenkung und damit auch die tatsächlich zurückgelegte Strecke des Spiegels. Die Zahl der *scans*, die vor der Fouriertransformation addiert werden, um ein Interferogramm mit hohem Signal/Rauschen-Verhältnis zu generieren, ist frei wählbar.

geschwindigkeit“, vgl. Abschnitt 1.2.2) von 200 kHz zuließ.⁶ Die verwendeten Messzellen hatten eine Schichtdicke von jeweils rund 8 μm . Die Einstellung der Parameter sowie die Aufnahme und Auswertung der Messdaten erfolgten mit der Software Opus (Bruker Optik).

Das Signal wurde mittels eines MCT-Detektors detektiert. Es wurde ein Cut-off-Filter verwendet, der undurchlässig für IR-Licht oberhalb von 2000 cm^{-1} war.⁷ Die Interferogramme wurden einseitig oder doppelseitig sowohl beim Spiegelvorlauf als auch beim Spiegelrücklauf aufgenommen. Hierbei lag die Modulationsfrequenz des Laserinterferogramms bei 160, 180 oder 200 kHz. Die obere Faltungsgrenze wurde mit 7899 cm^{-1} vorgewählt. Die Apodisierung wurde mit der Blackmann-Harris-3-Term-Funktion und einem *zero filling factor* von 4 ausgeführt, für die Phasenkorrektur wurden die Modi „Power Spectrum“ oder „Mertz“ gewählt. Bei einer physikalischen Auflösung von 4 cm^{-1} und einem *zero filling factor* von 4 hatten die resultierenden Absorptionsspektren eine Datenpunktauflösung von rund 1 cm^{-1} . Es wurde jeweils der Wellenzahlenbereich von 1900 bis 1200 cm^{-1} gespeichert.

2.3.1.3 Durchführung der Proteinmessungen

Messungen bei pH 7,0 wurden in 20 mM NaH_2PO_4 und Messungen bei pH 4,2 in 20 mM Na-Acetat durchgeführt.

Für die Untersuchung des Einflusses der verschiedenen getesteten Substanzen – Guanidiniumchlorid (GuHCl), Natriumchlorid (NaCl), Dithiothreitol (DTT) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) – auf die Sekundärstruktur des SHaPrP⁹⁰⁻²³² wurde eine Probenschleife mit SHaPrP⁹⁰⁻²³² und die andere mit dem entsprechenden Agens gefüllt. Dadurch ergab sich eine Verdünnung der Protein- und der Agenskonzentration von 1:2 in der gemessenen Mischlösung gegenüber den entsprechenden Ausgangslösungen. Beide Ausgangslösungen hatten denselben pH-Wert.

Die SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Agens-Mischungen wurden zeitaufgelöst mittels Rapid-Scan-Messungen untersucht. Die Messungen wurden mit jeweils neu injizierten Substanzen 3- bis 5-mal durchgeführt. Anschließend wurde das untersuchte Agens allein vermessen, um eine Kontrolle für die möglichen proteinunabhängigen spektralen

⁶Um die mechanische Belastung des durch Federn fixierten Interferometers gering zu halten, werden vom Hersteller allerdings nur Modulationsfrequenzen des Laserinterferogramms von bis zu 160 kHz empfohlen.

⁷Ein solcher Filter ermöglicht eine höhere IR-Intensität im Amid-I- und Amid-II-Bereich, da mit einer größeren Blende als ohne Filter gearbeitet werden kann. Der Detektor wird durch den erhöhten Lichtdurchsatz nicht gesättigt, da nur noch ein kleinerer Wellenlängenbereich des IR-Lichts auf ihn trifft.

Tabelle 2.3: Kinetik-Messprotokolle für die zeitaufgelösten Messungen von SHaPrP⁹⁰⁻²³² in 1 M GuHCl und 1 M NaCl

Messung in 1 M GuHCl		Messung in 1 M NaCl	
Anzahl der Spektren	Anzahl der <i>scans</i> pro Spektrum	Anzahl der Spektren	Anzahl der <i>scans</i> pro Spektrum
10	2	5	16
10	4	5	32
10	8	50	256
10	32		
15	128		
5	512		
Gesamtmesszeit 259 s		Gesamtmesszeit 1 100 s	

Veränderungen zur späteren Kompensation zu erhalten. Auch hier erfolgten jeweils 3–5 Messungen. Vor Befüllen der Probenschleifen und Starten einer zeitaufgelösten Messung wurde jeweils ein Hintergrundspektrum mit 256 *scans* durch die mit Wasser gefüllte Messzelle aufgenommen.

Je nach gewähltem Agens und dessen Konzentration wurde unter Verwendung individueller Kinetik-Messprotokolle unterschiedlich lange und mit differenzierter Zeitauflösung gemessen, um den jeweiligen Vorgang optimal beobachten zu können. Dabei musste beachtet werden, dass einerseits die Zeitauflösung zu Beginn der Reaktion ausreichend hoch war, um schnelle Vorgänge zu erfassen, und andererseits die Gesamtmesszeit ausreichend groß war, um auch langsamere Vorgänge abschließend beobachten zu können.

Während eines zeitaufgelösten Rapid-Scan-Experiments werden die aufgenommenen Interferogramme im Akquisitionsprozess des Spektrometers zwischengespeichert und erst nach Abschluss des Messzyklus datentechnisch weiterverarbeitet. Bei dem für die hier dargestellten Experimente gewählten Akquisitionsmodus war die Kapazität des Akquisitionsprozessor ausreichend für die Zwischenspeicherung von 60 Interferogrammen. Folglich konnte nur die Anzahl der *scans* pro Spektrum variiert werden, um auf die Zeitauflösung und Gesamtmesszeit eines Experiments Einfluss zu nehmen.

Die Kinetik-Messprotokolle, die für die in den Abschnitten 3.2.2 und 3.3.1 dargestellten Experimente entworfen wurden, sind in Tab. 2.3 wiedergegeben.

des SHaPrP⁹⁰⁻²³² + Agens subtrahiert. Anschließend wurde ein Spektrum des entsprechenden Puffers verwendet, um die verbliebenen Puffer-Absorptionen zu kompensieren. Die hohe Schichtdickenstabilität der verwendeten Messzelle ermöglichte es dabei, Absorptionen des Puffers i. d. R. ohne zusätzliche Korrekturfaktoren von denen des Proteins zu subtrahieren.

Aus den so gewonnenen „reinen“ SHaPrP⁹⁰⁻²³²-3-D-Mittelwertdateien wurden die 60 Einzelspektren extrahiert. Bei Bedarf erfolgte eine Wasserdampfkorrektur. Es wurden nun Differenzspektren nach der Formel $\Delta A = A(59) - A(t)$ berechnet und im Bereich von 1 900 bis 1 750 cm⁻¹ *offset*-korrigiert. Der laufenden Nummer $t = 0, 1, 2, \dots, 59$ eines jeden Spektrums entsprach dabei ein je nach zugrunde gelegtem Kinetik-Messprotokoll distinkter theoretischer Aufnahmezeitpunkt. Dieser theoretische Aufnahmezeitpunkt wurde als Mittelwert aus den tatsächlichen Aufnahmezeitpunkten der zur Mittelwertbildung verwendeten Spektren berechnet. Von einzelnen Spektren wurden vor der Differenzbildung zur genaueren Evaluierung der spektralen Eigenschaften die zweiten Ableitungen nach dem Algorithmus von Savitzky und Golay (1964) mit 9 Glättungspunkten berechnet. Die für die Erstellung der Kinetikkurven notwendigen Datenpunkte wurden aus den Datenpunkttabellen der Spektren ausgelesen.

Die Spektrenberechnungen wurden mit der Software Opus (Bruker Optik) durchgeführt (größtenteils mit Makros, die für die spezielle Problemstellung geschrieben wurden), die weiteren Berechnungen erfolgten mit Excel (Microsoft, Redmond, USA) und die Erstellung der Grafiken sowie die Kurvenanpassungen mit Origin (Microcal Software, Northhampton, USA).

Für die 2-D-Korrelationsanalysen wurden die zeitaufgelösten SHaPrP⁹⁰⁻²³²-3-D-Mittelwertdateien im Bereich von 1 900 bis 1 750 cm⁻¹ *offset*-korrigiert. Die Berechnung der synchronen und asynchronen 2-D-Korrelationsintensitäten $\Phi(\tilde{\nu}_1, \tilde{\nu}_2)$ bzw. $\Psi(\tilde{\nu}_1, \tilde{\nu}_2)$ erfolgte mittels einer in Opus implementierten Routine nach Noda (1993). Die Berechnung der 2-D-Korrelationsintensitäten auf Basis des quadrierten Korrelationskoeffizienten erfolgte mittels einer in Opus implementierten Routine nach Barton II *et al.* (1992). Für die 2-D-Korrelationsanalysen wurde jeweils der Bereich von 1 800 bis 1 500 cm⁻¹ verwendet.¹⁰

¹⁰Eine 2-D-Korrelationsanalyse nach Noda (1993) kann prinzipiell bei allen spektral beobachtbaren Reaktionen, die durch einen äußeren Einfluss induziert werden, durchgeführt werden. Die Veränderung der spektralen Intensität $\tilde{y}(\tilde{\nu}, t)$ mit der Zeit, der Temperatur oder einer anderen externen Variable t wird dabei durch eine Korrelationsintensität $X(\tilde{\nu}_1, \tilde{\nu}_2)$ ausgedrückt, die sich als komplexe Zahl $X(\tilde{\nu}_1, \tilde{\nu}_2) = \Phi(\tilde{\nu}_1, \tilde{\nu}_2) + i\Psi(\tilde{\nu}_1, \tilde{\nu}_2)$ beschreiben lässt. $\Phi(\tilde{\nu}_1, \tilde{\nu}_2)$ ist dabei die reelle Komponente und spiegelt die synchrone 2-D-Korrelationsintensität wieder, die die Ähnlich-

2.3.1.5 Langzeitmessungen

Für die Beobachtung der möglichen strukturellen Änderungen, die mit der Protofibrillogenese des SHaPrP⁹⁰⁻²³² einhergingen, konnte aufgrund der notwendigen längeren Messzeit von mehreren Tagen nicht die hochpräzise Stopped-Flow-Apparatur verwendet werden, da deren Messzelle nicht komplett versiegelt ist, sondern am Zu- und Ausflusspunkt Kontakt mit dem Schlauchsystem der Apparatur hat. Es hatte sich gezeigt, dass die Stabilität der Messbedingungen aufgrund dieser Konstruktion und der begrenzten Signalstabilität eines jeden FTIR-Spektrometers über einen längeren Messzeitraum (≥ 20 Minuten) nicht uneingeschränkt gewährleistet ist.

Deshalb wurde auf eine zerlegbare und temperierte Spezialküvette mit fester, einpolierter Schichtdicke zurückgegriffen, die in einen Halter aus Messing eingesetzt wurde (Fabian und Schultz, 2000). Die Küvette wurde an einem IFS 66 (Bruker Optik) in Verbindung mit einem Shuttle verwendet, der es ermöglichte, die Küvette aus dem IR-Strahlengang herauszufahren, um vor jeder Messung ein neues Hintergrundspektrum aufzunehmen. Auf diese Weise konnte sichergestellt werden, dass das Wasserdampfniveau im Probenraum bei Referenz- und Probenmessung stets weitgehend gleich war, so dass häufig auf eine spätere Wasserdampfkorrektur verzichtet werden konnte. Der Messinghalter wurde mit Hilfe eines Wasserbads (Haake F8) temperiert. Die Temperierung garantierte stets gleiche Messbedingungen auch über mehrere Tage, wodurch die sonst während langer Messzeiten unvermeidbaren Temperaturschwankungen im Spektrometer ausgeschlossen werden konnten.¹¹

Zwischen den einzelnen Messzeitpunkten lagen jeweils 24 Stunden. Pro Messzeitpunkt wurden 10 Spektren à 32 *scans* aufgenommen und anschließend gemittelt.

keit der Änderung zweier spektraler Merkmale während der Reaktion repräsentiert. $\Psi(\tilde{\nu}_1, \tilde{\nu}_2)$ ist die imaginäre Komponente und spiegelt die asynchrone 2-D-Korrelationsintensität wider, die die Unähnlichkeit der Änderung zweier spektraler Merkmale während der Reaktion repräsentiert. $\Phi(\tilde{\nu}_1, \tilde{\nu}_2)$ und $\Psi(\tilde{\nu}_1, \tilde{\nu}_2)$ lassen sich aus der Fourier-Transformation der Änderung von $\tilde{y}(\tilde{\nu}_1, t)$ mit der Zeit, der Temperatur oder einer anderen externen Variable t bzw. aus der konjugierten Fourier-Transformation der Änderung von $\tilde{y}(\tilde{\nu}_2, t)$ mit der Zeit, der Temperatur oder einer anderen externen Variable t berechnen.

Eine 2-D-Korrelationsanalyse nach Barton II *et al.* (1992) kann ebenfalls bei allen spektral beobachtbaren Reaktionen, die durch einen äußeren Einfluss induziert werden, durchgeführt werden. Hier erfolgt die numerische Berechnung eines Korrelationskoeffizienten, der die Korrelation zwischen den Änderungen zweier spektraler Merkmale im Laufe der Reaktion wiedergibt. Eine positive Änderung ist gleichbedeutend mit einer gleichgerichteten spektralen Änderung der Merkmale (Zunahme/Zunahme bzw. Abnahme/Abnahme). Durch Quadrieren kann das negative Vorzeichen eliminiert werden, so dass man nur noch eine Aussage zur absoluten Korrelation zweier spektraler Merkmale erhält.

¹¹Selbst Abweichungen von wenigen Zehntelgrad führen zu einer signifikanten Änderung der IR-Absorption von Wasser und GuHCl.

Zwischen den jeweiligen Mittelwerten wurden nach Abschluss des Experiments Differenzspektren gebildet.

Die Signale wurden mittels eines DTGS-Detektors erfasst. Die Interferogramme wurden doppelseitig sowohl beim Spiegelvorlauf als auch beim Spiegelnrücklauf aufgenommen. Hierbei lag die Modulationsfrequenz des Laserinterferogramms bei 10 kHz. Die obere Faltungsgrenze wurde mit 7899 cm^{-1} vorgewählt. Die Apodisierung wurde mit der Blackmann-Harris-3-Term-Funktion und einem *zero filling factor* von 4 ausgeführt, für die Phasenkorrektur wurde der Modus „*Power Spectrum*“ gewählt. Bei einer physikalischen Auflösung von 4 cm^{-1} und einem *zero filling factor* von 4 hatten die resultierenden Absorptionsspektren eine Datenpunktauflösung von rund 1 cm^{-1} . Es wurde jeweils der Wellenzahlenbereich von 4000 bis 1000 cm^{-1} gespeichert.

2.3.2 Statische FTIR-Spektroskopie

FTIR-Spektren aus statischen Experimenten wurden ebenfalls in der Stopped-Flow-Apparatur aufgenommen. Dazu wurde eine Probenschleife mit der entsprechenden Proteinlösung oder dem Puffer befüllt, während die jeweils andere Probenschleife nicht befüllt und auch nicht in den Wasserfluss geschaltet wurde. Dadurch ergab sich jeweils eine Verdünnung der Protein- und der Pufferkonzentration von 1:2 in der gemessenen Lösung gegenüber den entsprechenden Ausgangslösungen.

Ventile und Pumpe der Stopped-Flow-Apparatur wurden wie bei der Durchführung der zeitaufgelösten FTIR-Messungen geschaltet. Die Aufnahme eines Spektrums mit 256 scans wurde jedoch manuell gestartet. Ein äquivalentes Hintergrundspektrum wurde dabei unmittelbar vor Befüllen der Probenschleifen durch die mit Wasser gefüllte Messzelle aufgenommen. Die sonstigen Akquisitionsparameter wurden wie bei den zeitaufgelösten FTIR-Messungen gewählt. Aus 3–5 Spektren von jeweils neu in die Apparatur injizierter Protein- oder Pufferlösung wurde ein Mittelwertspektrum gebildet und ggf. zur Kompensation der Spektren aus den zeitaufgelösten Messungen verwendet oder unter Bildung der zweiten Ableitung auf seine Eigenschaften hin untersucht.

Sollten zwei Proteinspektren unterschiedlicher Konzentration miteinander verglichen werden, wurden sie in Bezug auf die Absorptionsbande der Tyrosin-Ringschwingung im Bereich von 1523 bis 1511 cm^{-1} vektornormiert.

2.3.3 FTIR-Spektroskopie bei variabler Temperatur

FTIR-Spektren bei variabler Temperatur wurden mit der in Abschnitt 2.3.1.5 beschriebenen zerlegbaren Küvette an einem IFS 66 (Bruker Optik) aufgenommen. Die zerlegbare Küvette wurde nach dem Befüllen mit der jeweiligen Probe und dem Zusammensetzen mit Öl abgedichtet, um eine Verdunstung der Probe bei erhöhten Temperaturen zu verhindern. Die Steuerung des zur Temperierung verwendeten Wasserbads (Haake F8) erfolgte dabei über ein Makro in Opus. Nach jeder Änderung der Temperatur wurde 5 min gewartet, bis mit der Messung begonnen wurde, um eine Äquilibration der Probe zu gewährleisten. Die Temperatur des Messinghalters (Ist-Temperatur) wurde mit einem externen Thermometer kontrolliert (901, Testo, Lenzkirch) und mit der dem Wasserbad vorgegebenen Temperatur (Soll-Temperatur) in Relation gesetzt. Die so gewonnene Kalibrierungskurve konnte in mehreren Wiederholungsversuchen gut reproduziert werden, so dass die Ist-Temperatur fortan aus der Soll-Temperatur berechnet wurde. Die Messungen wurden im Temperaturbereich von 20 bis 77 °C durchgeführt.

Die Signale wurden mittels eines MCT-Detektors erfasst. Die Interferogramme wurden doppelseitig sowohl beim Spiegelvorlauf als auch beim Spiegelnrücklauf aufgenommen. Hierbei lag die Modulationsfrequenz des Laserinterferogramms bei 200 kHz. Die obere Faltungsgrenze wurde mit 7899 cm^{-1} vorgewählt. Die Apodisierung wurde mit der Blackmann-Harris-3-Term-Funktion und einem *zero filling factor* von 4 ausgeführt, für die Phasenkorrektur wurde der Modus „*Power Spectrum*“ gewählt. Bei einer physikalischen Auflösung von 4 cm^{-1} und einem *zero filling factor* von 4 hatten die resultierenden Absorptionsspektren eine Datenpunktauflösung von rund 1 cm^{-1} . Es wurde jeweils der Wellenzahlenbereich von 4000 bis 800 cm^{-1} gespeichert.

Für die Untersuchung der Denaturierung/Aggregation des SHaPrP⁹⁰⁻²³² war das Protein entweder in NaH_2PO_4 oder in NaD_2PO_4 bei einer Konzentration von $4\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ bzw. $8\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ gelöst. Um die Pufferabsorptionen kompensieren zu können, wurden analoge temperaturabhängige FTIR-Messungen mit reinem Puffer durchgeführt und die entsprechenden Spektren von denen des SHaPrP⁹⁰⁻²³² bei gleicher Temperatur subtrahiert.

Zur Auswertung der Messdaten wurde die Intensität der β -Faltblatt-Bande im Amid-I/I'-Bereich ausgelesen und normiert, indem die Intensität gegen die Temperatur aufgetragen wurde und die linearen Bereiche dieser Kurve bei Temperaturen vor bzw. nach erfolgter Denaturierung/Aggregation jeweils mittels einer Ausgleichs-

geraden linear angepasst wurden. Die normierte Intensität $\theta(T)$ wurde berechnet nach

$$\theta(T) = \frac{I - I_1}{I_2 - I_1} \quad (2.1)$$

mit der experimentellen Intensität I , dem Wert I_1 der linearen Kurvenanpassung im Bereich niedriger Temperatur und dem Wert I_2 der linearen Kurvenanpassung im Bereich hoher Temperatur.

Diese Normierung bewirkte, dass $\theta(T) = 0$ dem nativen SHaPrP⁹⁰⁻²³² und $\theta(T) = 1$ dem vollständig denaturierten/aggregierten SHaPrP⁹⁰⁻²³² entsprach. Die normierte Intensität θ wurde gegen die Temperatur aufgetragen und mittels einer sigmoidalen Funktion nach Hill gemäß der Form

$$\theta = \theta_{max} \frac{T^n}{k^n + T^n} \quad (2.2)$$

angepasst. Als Denaturierungs-/Aggregations-Temperatur wurde $T(\theta = 0,5)$ aus den angepassten Kurven bestimmt.

2.4 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die Messungen mittels matrixunterstützter Laser-Desorptions-/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-Massenspektrometrie) wurden an einem „Autoflex“-Massenspektrometer (Bruker Daltonik, Bremen) durchgeführt.

Die untersuchten Proteinproben wurden vor der Präparation auf eine Konzentration von rund $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ verdünnt. $1 \mu\text{l}$ der Proteinprobe wurde mit $1 \mu\text{l}$ Matrix versetzt und gemischt. $1 \mu\text{l}$ dieser Mischung wurde auf einen Probenträger aus Stahl aufgetragen, durch Antrocknen kristallisiert und vermessen. Als Matrix wurde entweder α -Cyano-4-hydroxymizinsäure in einer Konzentration von $12 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ in einer 2:1-Mischung von Acetonitril und 0,3%iger TFA oder Sinapinsäure in einer Konzentration von $12 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ im gleichen Lösungsmittel verwendet. Vor jeder Messung wurde das Gerät mit einem externen Standard kalibriert („Protein-Kalibrierungsstandard I“ für den Massenbereich bis 20 kDa und „Protein-Kalibrierungsstandard II“ für den Massenbereich oberhalb von 20 kDa, beide von Bruker Daltonik), der in der gleichen Matrix wie das zu messende Protein kristallisiert wurde.

Je nach Anwendung wurden auf den zu detektierenden Massenbereich hin optimierte Messmethoden verwendet. Dabei wurde stets im Linearmodus bei einer

Beschleunigungsspannung von 2,2 kV gemessen. Signale der Matrix wurden beim Messen von monomerem Protein bis zu einer Masse von 2 kDa und beim Messen von oligomerem Protein bis zu einer Masse von 10 kDa ausgeblendet. Der detektierte Massenbereich betrug beim monomeren Protein 2–200 kDa und beim oligomeren Protein 10–200 kDa. Dabei wurde mit einer Aufnahmezeit von 0,1 GS · s⁻¹ (Monomer) bzw. 1,0 GS · s⁻¹ (Oligomer) gearbeitet.

2.5 Lichtstreuung

Statische und dynamische Lichtstreuung wurden gleichzeitig am selben Instrument unter einem Streuwinkel von 90° gemessen. Das verwendete Instrument wurde im Labor von Dr. Klaus Gast aus einzelnen Komponenten selbst zusammengebaut. Es war mit einem diodengepumpten Continuous-Wave-Laser des Typs „Millennia IIs“ (Spectra-Physics, Mountain View, USA) und einer Kaskaden-Photodiode mit hoher Quantenausbeute ausgestattet.

Die apparenten molaren Massen wurden anhand der relativen Streuintensitäten abgeschätzt. Dazu wurde Toluol als Referenz verwendet und ein Brechungsindex-Inkrement von $(\partial n/\partial c) = 0,19 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1}$ zugrunde gelegt. Die translationalen Diffusionskoeffizienten D wurden entweder unter Verwendung der Software CONTIN (Provencher, 1982) oder durch Anwendung der Kumulantenmethode nach Koppel (1972) berechnet. Die Diffusionskoeffizienten wurden dann mittels der Stokes-Einstein-Gleichung $R_s = k_B T / (6\pi\eta_0 D)$ mit der Boltzmann-Konstante k_B , der absoluten Temperatur T und der Viskosität der Lösung η_0 in die entsprechenden Stokesradien konvertiert.

Kinetische Lichtstreuungsexperimente wurden je nach SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Konzentration in unterschiedlicher Weise gestartet. Bei hoher Konzentration wurden die zu mischenden Lösungen (also die GuHCl- und die SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Lösung) vor dem Mischen separat durch Filter mit einer Porengröße von 100 µm filtriert und anschließend in Fluoreszenzküvetten mit einem Volumen von 100 µl gefüllt und schnell gemischt. Bei niedriger Proteinkonzentration wurden die entsprechenden Lösungen zuerst gemischt und anschließend filtriert (die Porengröße des verwendeten Filters betrug wiederum 100 µm). Die so gemischten und filtrierten Reaktionsansätze wurden dann in Durchflussküvetten mit einem Volumen von 30 µl gefüllt.

2.6 Elektronenmikroskopie

Vor der Präparation für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde der entsprechende Reaktionsansatz mit 1 M GuHCl in 20 mM Na-Acetat (pH 4,2) auf eine SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Konzentration von 30 µg · ml⁻¹ verdünnt. Die Proben wurden anschließend mit 1 % Uranylformiat unter Anwendung der Kohlenstoff-Doppelfilm-Technik negativ gefärbt. Kupfergitter mit 400 Maschen, die mit einem kohlenstoffbeschichteten Triafol-Mikrogitter bedeckt waren, dienten dabei als Substrat für die gefärbten Proben. Die Bilder wurden an einem „EM910“-Elektronenmikroskop (Leo, Oberkochen) bei einer Spannung von 80 kV und einer Vergrößerung von 63 000 aufgenommen.

2.7 Rasterkraftmikroskopie

Untersuchungen mittels Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy*, AFM) wurden an einem „MFP-3D“-Rasterkraftmikroskop (Asylum Research, Santa Barbara, USA) im AC-Modus durchgeführt. Als *cantilever* wurde ein „BS-Tap300Al“ (Windsor Scientific, Slough, Großbritannien) verwendet.

Das SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Oligomer wurde mit Na-Acetatpuffer (pH 4,2) auf 500 ng · ml⁻¹ verdünnt. 20 µl dieser verdünnten Lösung wurden auf ein Glimmersubstrat aufgetragen und innerhalb von 5 min vollständig eingetrocknet.

2.8 FRET-Spektroskopie

Die Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer-Spektroskopie (FRET-Spektroskopie) ist eine Methode, die sich sehr gut zur Untersuchung der Anlagerung von Substanzen an Liposomen bzw. ihres Einbaus in diese eignet.

Für die FRET-spektroskopischen Messungen wurden Phosphatidylethanolamine verwendet, die an ihren Kopfgruppen mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren. Als Fluoreszenz-Donor diente N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamin (NBD-PE) und als Fluoreszenz-Akzeptor N-(Rhodamin-B-sulfonyl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamin (Rh-PE) (beide von Molecular Probes, Eugene, USA). Die markierten Lipide wurden in einer Konzentration von 2 mM in Chloroform gelöst und in einem molaren Verhältnis von (PS/PC):(NBD-PE):(Rh-PE) = 100:1:1 mit den zu

untersuchenden Lipiden (Phosphatidylserin [PS, aus Schweinehirn] bzw. Phosphatidylcholin [PC, aus Hühnereiern]; beide von Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) gemischt. Nach Verdunstung des Chloroforms wurde die Lipidmischung in 20 mM NaH_2PO_4 (pH 7,0) oder 20 mM Na-Acetat (pH 4,2) aufgenommen, 1 min mit Ultraschall behandelt (Sonifier; Branson, Heusenstamm) und je 30 min bei 4 °C und bei 50 °C inkubiert.

Die Messungen wurden in Quarzküvetten mit 900 μl der 10 μM Liposomenlösung an einem „Spex Fluorolog F1 T11“-Spektrometer (Horiba Jobin Yvon, Edison, USA) durchgeführt. Die Anregung von NBD-PE erfolgte bei seiner Anregungswellenlänge von 463 nm. Durch strahlungslosen Energietransfer konnte NBD-PE in räumlicher Nähe befindliches Rh-PE anregen. Schließlich konnten die Emissionen des NBD-PE bei 536 nm und die des Rh-PE bei 593 nm detektiert werden. Durch eine Interaktion zwischen dem zugegebenen Protein und dem Lipid vergrößert sich der Abstand zwischen Donor und Akzeptor, wodurch der Energietransfer vom Donor auf den Akzeptor ineffizienter wird. Dadurch steigt das Donorsignal an, während das Akzeptorsignal sinkt. Eine Erhöhung des Quotienten aus Donor- und Akzeptorsignal zeigt somit eine Protein-Lipid-Interaktion an.

Bei 37 °C und konstantem Rühren wurden die Emissionen von Donor und Akzeptor auf die gleiche Intensität eingestellt, um während der folgenden 50 s eine Basislinie zu bestimmen. Bei 50 s erfolgte die Zugabe der SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Monomere bzw. -Oligomere. Donor- und Akzeptorsignal wurden für weitere 210 s detektiert. Anschließend wurde der Quotient aus Donor- und Akzeptorsignal gebildet.

2.9 Rekonstituierte planare Membranen

Mit Hilfe von rekonstituierten planaren Membranen lassen sich sowohl unspezifische als auch spezifische Protein-Membran-Interaktionen bestimmen. Insbesondere für die Untersuchung porenbildender Eigenschaften von Proteinen eignet sich diese Methode hervorragend. Wie im folgenden Abschnitt ausführlich beschrieben, wird zu Beginn eines Experiments eine Membran über die Apertur eines Septums präpariert. Septum und Membran trennen dann zwei puffergefüllte Kammern voneinander. Nun wird das zu untersuchende Protein dazugegeben. Durch Anlegen einer Spannung zwischen den beiden Kammern kann – sofern das zu untersuchende Protein ionendurchlässige Poren in der Membran bildet – ein Stromfluss durch diese Poren detektiert werden. Werden keine Poren gebildet oder sind diese nicht ionen-

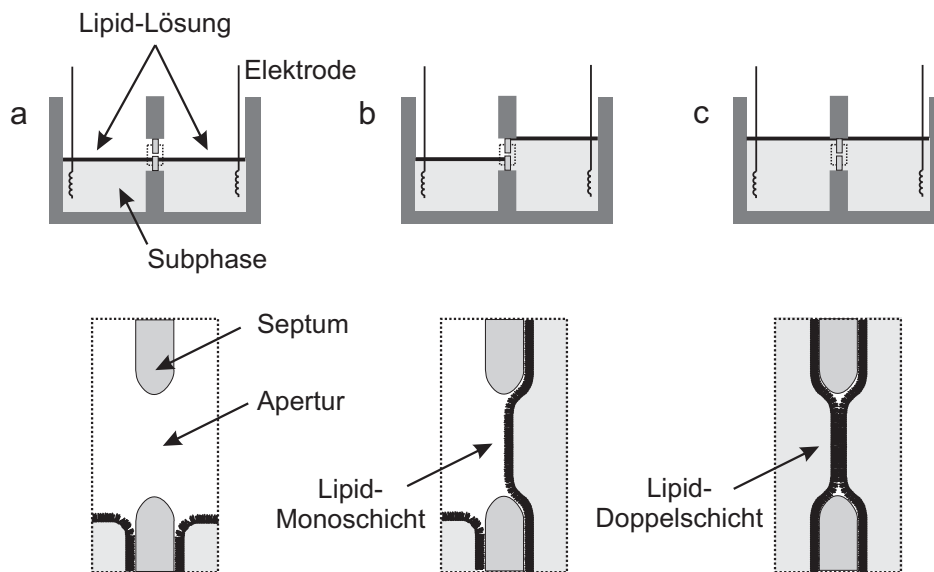


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Präparation planarer Lipid-Doppelschichten nach der Methode von Montal und Mueller (1972). Die unteren Darstellungen sind Vergrößerungen des in den oberen Darstellungen markierten Ausschnitts im Bereich des Septums. (a) Die Subphasenspiegel liegen in beiden Teilkammern der Messkammer unterhalb der Apertur des Septums. (b) Der Subphasenspiegel in der rechten Teilkammer wurde angehoben, so dass sich hier eine Lipid-Monoschicht über Septum und Apertur legen konnte. (c) Der Subphasenspiegel der linken Teilkammer wurde ebenfalls angehoben, so dass das Septum auf beiden Seiten mit einer Lipid-Monoschicht benetzt wurde. Im Bereich der Apertur hat sich eine Lipid-Doppelschicht ausgebildet. Darstellung nach Hagge (2003).

durchlässig, kann aus der Veränderung der Membrankapazität durch das zu untersuchende Protein auf spezifische oder unspezifische Protein-Membran-Interaktionen geschlossen werden.

2.9.1 Prinzip der Membranpräparation

Die planaren Membranen wurden als symmetrische Lipid-Doppelschichten nach der Methode von Montal und Mueller (1972) präpariert (Abb. 2.5). Dazu wurde in zwei Teilkammern einer Messkammer, die nur durch die Apertur in einem Septum miteinander verbunden waren, Puffer (die sog. Subphase) vorgelegt und mit einer chloroformischen Lipidlösung überschichtet (Abb. 2.5a). Es wurde dabei jeweils nur so viel Lipidlösung zugefügt, dass sich idealerweise eine Lipid-Monoschicht auf der Subphase bildete. Nun wurde der Subphasenspiegel in einer Teilkammer angehoben, wodurch sich eine Lipid-Monoschicht über das Septum und dessen Apertur bildete (Abb. 2.5b). Nach Anheben des Subphasenspiegels auch in der zweiten Teilkammer wurde eine Lipid-Monoschicht auch auf der anderen Seite des Septums über

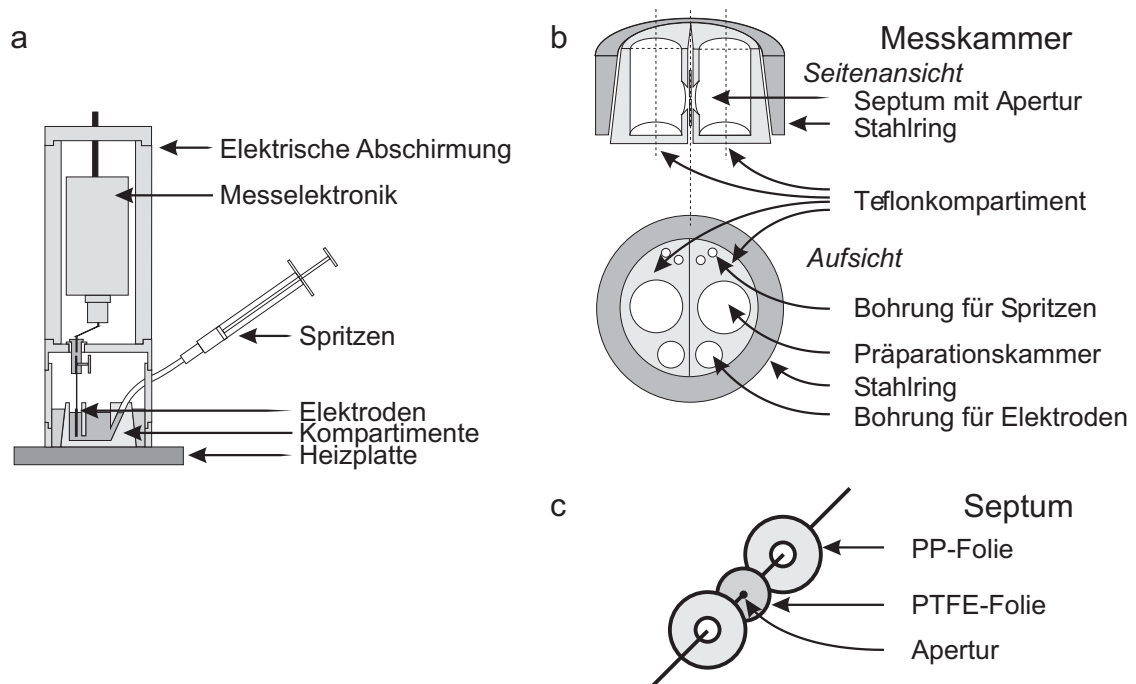


Abbildung 2.6: (a) Aufbau der Messapparatur für die Untersuchung von rekonstituierten planaren Membranen. (b) Detaildarstellung der Messkammer. (c) Detaildarstellung des Septums. Abbildung nach Hagge (2003).

Septum und Apertur gezogen. Im Bereich der Apertur bildete sich dadurch eine Lipid-Doppelschicht (Abb. 2.5c).

Mit dieser Methode ist es grundsätzlich möglich, symmetrische und asymmetrische Lipid-Doppelschichten herzustellen. In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch nur symmetrische Lipid-Doppelschichten verwendet.

Die so hergestellten Membranen waren praktisch lösungsmittelfrei – für die Untersuchung biologischer Systeme ist das eine wichtige Voraussetzung.

2.9.2 Aufbau der Messapparatur

Die verwendete Messapparatur ist mit Messkammer und Septum in Abb. 2.6 dargestellt und soll im Folgenden kurz erläutert werden.

Ein zweiteiliger geschlossener Metallzylinder, der als Faraday'scher Käfig zur elektrischen Abschirmung des Systems diente, umfasste in seinem oberen Teil den Messkopf und in seinem unteren Teil die Messkammer. Aus dem Messkopf ragten zwei Elektroden in die beiden Teilkammern der Messkammer. Dieser Aufbau stand auf einer elektronisch geregelten Heizplatte, die zur Einstellung der Temperatur in der

Messkammer mit einer Genauigkeit von ± 1 °C diene. Das gesamte System stand auf einer mit Luftfederelementen gelagerten Steinplatte, um mechanische Erschütterungen zu verhindern. Zwei Öffnungen im Metallzylinder dienten zur visuellen Kontrolle der Membranpräparation. Durch die vordere Öffnung konnte die Membranpräparation mittels einer Stereolupe (H33, Hund, Wetzlar) beobachtet werden, während die dazu notwendige Beleuchtung durch die hintere Öffnung von einer Kaltlichtquelle (FLQ-150, Hund) mittels einer Lichtleiteroptik auf die Messkammer geleitet wurde. Die Messkammer selbst bestand aus zwei spiegelsymmetrischen, halbkreisförmigen Teflonkompartimenten, die mit verschiedenen Bohrungen versehen waren. Die größte Bohrung war die eigentliche Präparationskammer. Sie war sowohl mit der Bohrung für die Elektrode als auch mit der Bohrung für die Spritze verbunden. Außerdem hatte sie neben der Öffnung an ihrer Oberseite eine weitere Öffnung auf der flachen Seite des Kompartiments. Über die Bohrung für die Spritze wurde mittels eines Teflonschlauchs eine mit Subphase gefüllte Spritze mit der Präparationskammer verbunden. Mittels dieser Spritze konnte der Subphasenspiegel in der Präparationskammer angehoben und absenkt werden. Im Bereich der Bohrungen auf der flachen Seite der Kompartimente wurde ein mit einer Apertur versehenes Septum eingepasst. Durch einen konischen Stahlring konnten zwei Kompartimente, die lediglich durch das Septum getrennt waren, anschließend zusammengedrückt werden.

Das Septum bestand aus einer 12,5 μm dicken Teflonfolie (Breitenborn, Wuppertal), die zur Verstärkung auf beiden Seiten mit einer selbstklebenden Polypropylen-Folie (Tesafilm, Beiersdorf, Hamburg) versehen wurde. In die Polypropylen-Folie wurden zuvor mittig so große Löcher gestanzt, dass nur die Teflonfolie an den Bohrungen der Kompartimente anlag. Die Apertur wurde in die Teflonfolie mittels mehrerer Funkenentladungen gebrannt. Ihre Größe wurde anschließend im Mikroskop kontrolliert.

Für die Bestimmung der Membrankapazität und des Membranstroms wurde derselbe elektronische Aufbau verwendet. Die für die Messung notwendige Spannung wurde über zwei Ag/AgCl-Elektroden angelegt. Diese Elektroden waren mit einem Vorverstärker verbunden, der seinerseits an den Controller eines Patch-Clamp-Verstärkers (L/M-PCA, List-Medical, Darmstadt) angeschlossen war. Dieser Patch-Clamp-Verstärker enthielt eine Spannungsquelle sowie die Signalerfassungs- und Steuerelektronik. Die Verstärkungsfaktoren waren variabel wählbar, bei den hier dargestellten Versuchen wurde jedoch stets mit einem Faktor von $5 \text{ mV} \cdot \text{pA}^{-1}$

gearbeitet. Mit Hilfe des in den Patch-Clamp-Verstärker integrierten 6-Pol-Bessel-Tiefpassfilters wurde das Ausgangssignal mit 10 kHz gefiltert. Die Datenspeicherung in hoher Datendichte erfolgte mittels eines DAT-Rekorders (Biologic, Claix, Frankreich). Zur Auswertung der Messdaten mit niedrigerer Datendichte wurde das Signal über ein weiteres elektronisches Filter (Ithaco Scientific Instruments, Ithaca, USA) mit einer Frequenz von 1 kHz tiefpassgefiltert und über einen Analog-Digital-Konverter (PCI-20428, Intelligent Instrumentation, Leinfelden-Echterdingen) in einen PC eingelesen. Als Steuersoftware wurde Visual Designer 4.0 (Intelligent Instrumentation) verwendet.

2.9.3 Durchführung der Membranpräparation

Für die Untersuchungen wurden Septen mit einer Apertur von ca. 180 μm verwendet. Um für eine gute Benetzbarkeit der Septen durch die Lipid-Monoschichten zu sorgen, wurde die Hydrophobizität der Septen durch Schwenken in einer Mischung aus Pentan und Hexadecan (14:1) erhöht. Ein Septum wurde anschließend so zwischen zwei Teflonkompartimente gesetzt, dass sich die Apertur mittig zwischen den Öffnungen an den flachen Seiten der Kompartimente befand. Die Teflonkompartimente wurden zuvor dünn mit Silikonfett eingestrichen. Durch Druck auf den konischen Stahlring wurden die beiden Kompartimente zusammengepresst. Diese Messkammer wurde nun in die Messapparatur eingesetzt und mit 1,75 ml Subphase pro Kompartiment befüllt. Als Subphase wurden 20 mM Na-Acetat, 80 mM NaCl (pH 4,2) und 20 mM Na-Acetat, 200 mM NaCl (pH 4,2) verwendet. Die Spritzen wurden in die entsprechenden Bohrungen der Kompartimente eingesetzt. Nach 5-minütiger Wartezeit zur Temperaturäquilibrierung auf 37 °C wurden jeweils 3 μl einer chloroformischen Lösung von L- α -Phosphatidylserin (PS; Avanti Polar Lipids) in einer Konzentration von 2,5 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ auf die Subphasen in beiden Präparationskammern pipettiert. Das Septum wurde einmal von beiden Seiten mit Subphase benetzt. Die Subphasenspiegel wurden wieder unter die Apertur abgesenkt und die Grundkapazität des Systems bestimmt. Anschließend wurde – ggf. durch wiederholte Präparationsversuche – eine Membran wie unter Abschnitt 2.9.1 beschrieben aufgezogen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Membran eine Kapazität von ≥ 95 pF hatte und diese Kapazität über mehrere Minuten stabil blieb. Ferner durfte nach Anlegen einer Spannung von ± 100 mV nur ein Stromfluss von $\leq \pm 2$ pA detektiert werden. Nun wurden vorsichtig 30 μl der zu untersuchende SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Probe auf oder in die Subphase pipettiert. Die Konzentration des eingesetzten SHaPrP⁹⁰⁻²³²

betrug sowohl für die Oligomere als auch für die Monomere $0,005\text{--}0,5\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Als Negativkontrolle wurde in äquivalenten Versuchen nur Puffer zugegeben. Sofern die Membran noch nach einigen Minuten stabil war, wurde in mehreren Schritten eine Spannung von bis zu $\pm 200\text{ mV}$ angelegt und ein etwaiger Stromfluss detektiert.

2.10 Zellkulturexperimente

Um eine potenzielle Neurotoxizität der kritischen Oligomere des SHaPrP⁹⁰⁻²³² zu untersuchen, wurden Experimente an einer Zellkultur durchgeführt. Für diese Versuche wurden N2a-Zellen sowie eine SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Monomer- und eine SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Oligomer-Lösung in einer Konzentration von jeweils $0,5\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ verwendet. Die SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Proben wurden mit 20 mM Na-Acetat (pH 4,2) gepuffert. Zu jeweils 1 ml Zellkultur in mit 10% fötalem Kälberserum ergänztem „*Dulbecco's Modified Eagle Medium*“ (DMEM + FKS, Invitrogen) wurden 10 bzw. $40\ \mu\text{l}$ der Monomerlösung, der Oligomerlösung oder des Acetatpuffers gegeben. Pro ml Zellkultur wurden also 5 bzw. $20\ \mu\text{g}$ Protein zugefügt. Dies entsprach einer SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Endkonzentration von rund 300 bzw. $1\ 200\text{ nM}$, bezogen auf das Monomer, und von rund 40 bzw. 150 nM , bezogen auf ein oktameres Oligomer.

Um sicherzustellen, dass die Oligomere auch tatsächlich mit der Zellmembran wechselwirken konnten und nicht unmittelbar nach Zugabe in das Zellkulturmedium präzipitierten¹², wurde das Zellkulturmedium in einer weiteren Versuchsreihe kurz vor Zugabe der Proteinproben abgenommen und durch einen Acetatpuffer (pH 5,0) ersetzt. Nach Zugabe von 10 bzw. $40\ \mu\text{l}$ der Monomerlösung, der Oligomerlösung oder des SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Puffers (20 mM Na-Acetat , pH 4,2) wurde der Zellkulturpuffer nach kurzer Inkubationszeit wieder gegen DMEM + FKS ausgewechselt.

Der Einfluss des SHaPrP⁹⁰⁻²³² auf die Zellen wurde anhand des „*CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay*“ (Promega, Mannheim) nach den Herstellerangaben untersucht. Dieser Test gibt Aufschluss über die Anzahl der wachstumsfähigen Zellen in einer Zellkultur.

2.11 NMR-Spektroskopie

Für die NMR-spektroskopischen Messungen wurde das vollständig mit dem Kohlenstoffisotop ¹³C und dem Stickstoffisotop ¹⁵N markierte ¹³C-¹⁵N-SHaPrP⁹⁰⁻²³²

¹²DMEM + FKS hat einen pH-Wert von etwa 7.

verwendet, dessen Synthese und Reinigung in Abschnitt 2.1.2 beschrieben ist. Ein Teil des Proteins wurde in seiner nativen monomeren Form vermessen, ein anderer Teil – wie in Abschnitt 2.2 erläutert – vor der Messung zu kritischen Oligomeren umgesetzt.

450 μl einer Lösung reiner ^{13}C - ^{15}N -SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Monomere bzw. -Oligomere mit einer Konzentration von jeweils rund $11 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ in 2 mM Na-Acetat (pH 4,2) wurden mit je 50 μl D₂O versetzt und in je ein NMR-Probenröhrchen aus Quarzglas (Wilmad-Labglass, Buena, USA) überführt. Die endgültige Proteinkonzentration betrug somit, bezogen auf das monomere SHaPrP⁹⁰⁻²³², rund 590 μM . Die Messungen erfolgten bei 22 °C in einem 600-MHz-NMR-Spektrometer, das mit einem Kryoprobekopf ausgestattet ist (DRX 600; Bruker Biospin, Rheinstetten). Die Zuordnung der einzelnen Aminosäurereste zu den beobachteten Signalen im TROSY-Spektrum (TROSY: *transverse relaxation-optimized spectroscopy*) erfolgte durch Aufnahme von aminosäurespezifischen HSQC-Spektren (HSQC: *heteronuclear single quantum coherence*) nach dem MUSIC-Kohärenztransferschema (MUSIC: *multiplicity selective in-phase coherence transfer*; Schmieder *et al.*, 1998) sowie von Tripelresonanzspektren des Typs CBCA(CO)NNH und CBCANNH (Sattler *et al.*, 1999). Die ^{15}N -HSQC-, ^{15}N -TROSY- und NOESY-Spektren (NOESY: *nuclear Overhauser and exchange spectroscopy*) vom Monomer und vom Oligomer wurden aufgenommen, um die durch die konformationelle Umwandlung des Proteins bedingten strukturellen Änderungen zu detektieren.

Die Aufnahme und die Auswertung der NMR-Spektren erfolgten mit Hilfe der Programme XWINNMR (Bruker Biospin) und SPARKY (T. D. Goddard und D. G. Kneller, SPARKY 3, University of California, San Francisco, USA).

Zwischen einzelnen Messungen wurden die Proben in den NMR-Probenröhrchen bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

