

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der rekombinanten Prionproteine

3.1.1 Reinigungseffizienz und Identität der Konstrukte

Die rekombinanten Prionproteinkonstrukte SHaPrP⁹⁰⁻²³², ¹³C-¹⁵N-SHaPrP⁹⁰⁻²³² und huPrP⁹¹⁻²³¹ konnten nach einem bereits etablierten und erweiterten Protokoll (Sokolowski, 2001) in ausreichender Menge mit hoher Reinheit hergestellt werden. Die Reinheit der jeweiligen Produkte wurde durch HPLC-Analysen und ggf. SDS-PAGEs überprüft (Abb. 3.1).

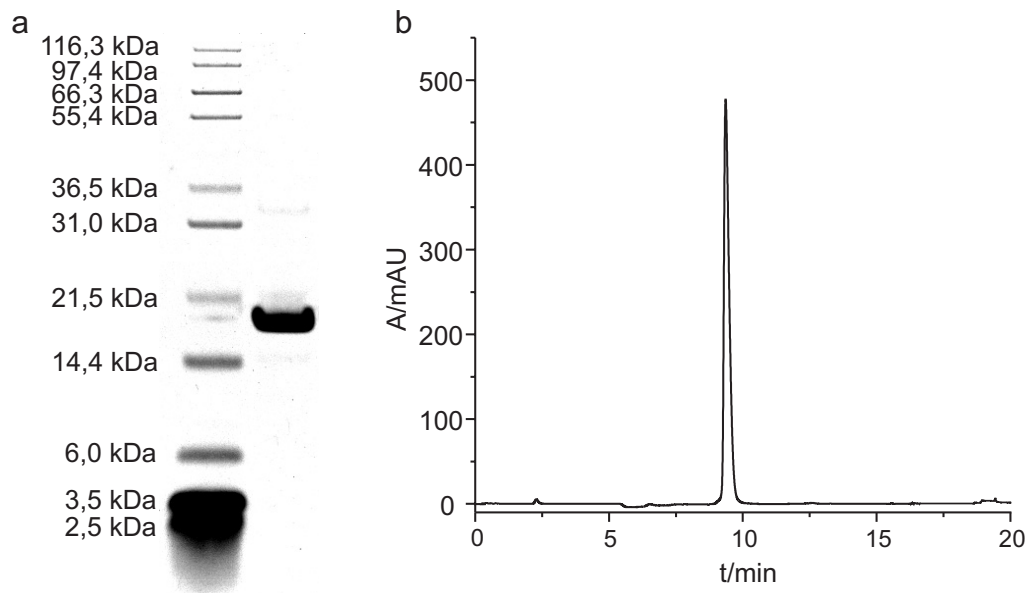


Abbildung 3.1: Gel und HPLC-Chromatogramm einer SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Präparation nach erfolgter Reinigung. (a) Auf dem Gel einer SDS-PAGE konnte das SHaPrP⁹⁰⁻²³² als einzelne Bande bei ca. 17 kDa detektiert werden (rechte Spur). Die Massen der Bestandteile des Molekulargewichtsstandards (linke Spur) sind links neben den entsprechenden Banden angegeben. (b) Bei einer HPLC-Analyse eluierte das SHaPrP⁹⁰⁻²³² als einzelner, symmetrischer Peak.

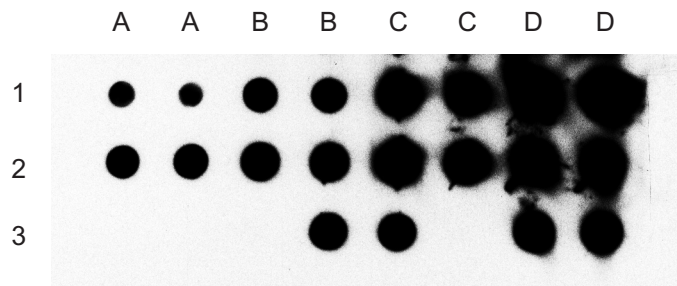


Abbildung 3.2: Dot-Blot von rekombinantem SHaPrP⁹⁰⁻²³² und PrP²⁷⁻³⁰-enthaltendem Hamsterhirn. Die Detektion erfolgte mittels des monoklonalen Antikörpers 3F4. 1. Reihe: SHaPrP⁹⁰⁻²³² in PBS + 0,1% Zwittergent. 2. Reihe: SHaPrP⁹⁰⁻²³² in Lämmli-Probenpuffer. 3. Reihe: Mit PK verdautes Hamsterhirnhomogenat in Lämmli-Probenpuffer. In den Reihen 1 und 2 wurden je 10 µl einer SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Lösung folgender Konzentration aufgetragen: 0,019 µg · ml⁻¹ (A), 0,19 µg · ml⁻¹ (B), 1,9 µg · ml⁻¹ (C), 19 µg · ml⁻¹ (D). Vom Hamsterhirnhomogenat wurden je 10 µl einer 10⁻⁵ Hirnäquivalente enthaltenden Suspension (B und C) sowie einer 10⁻⁴ Hirnäquivalente enthaltenden Suspension (D) aufgetragen.

Die Identität der gereinigten Proteine wurde mittels massenspektrometrischer Analysen verifiziert. Die berechneten (und im Rahmen der Messgenauigkeit bestätigten) Massen waren 16 740,6 Da für das SHaPrP⁹⁰⁻²³², 16 501,3 Da für das huPrP⁹¹⁻²³¹ und 17 662,8 Da für das vollständig markierte ¹³C-¹⁵N-SHaPrP⁹⁰⁻²³².

Die quantitative Ausbildung der im nativen Prionprotein vorhandenen Disulfidbrücke während des entsprechenden Oxidationsschritts bei der Aufreinigungsprozedur wurde mittels HPLC-Analysen kontrolliert (vgl. Sokolowski, 2001).

Die so hergestellten Prionproteine zeigten in den entsprechenden FTIR-Spektren, die im folgenden Abschnitt 3.1.2 vergleichend dargestellt sind, jeweils eine von α -helikalen Bereichen dominierte Sekundärstruktur (siehe auch Sokolowski, 2001).

Das SHaPrP⁹⁰⁻²³² konnte in einer Dot-Blot-Analyse noch in niedriger Konzentration zuverlässig vom monoklonalen Antikörper 3F4 erkannt werden (Abb. 3.2). Dieser Antikörper bindet an die Reste 109–112 des PrP^C und PrP^{Sc} bzw. PrP²⁷⁻³⁰ des Hamsters (Kacsak *et al.*, 1987; Rogers *et al.*, 1991).

Die Denaturierung des SHaPrP⁹⁰⁻²³² in Lämmli-Probenpuffer führte zu einer verbesserten Exposition des vom Antikörper erkannten Epitops. Das zeigte sich an den stärkeren Signalen der denaturierten Proben, verglichen mit den nichtdenaturierten Proben identischer Konzentration, im Dot-Blot (vgl. Reihen 1 und 2 in Abb. 3.2). Aber auch unter nichtdenaturierenden Bedingungen erfolgte eine sehr sensitive Detektion des SHaPrP⁹⁰⁻²³² durch den Antikörper 3F4.

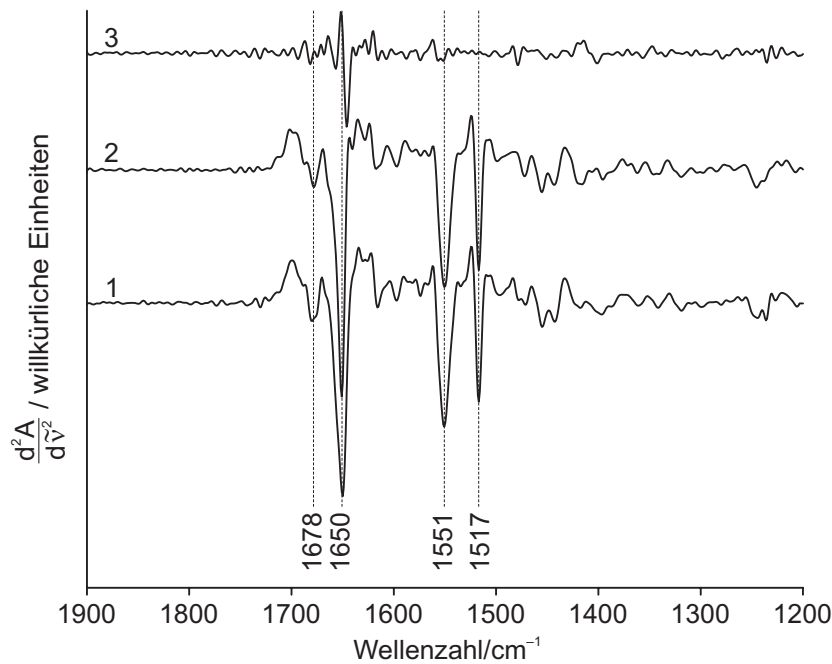


Abbildung 3.3: Zweite Ableitungen der FTIR-Spektren des SHaPrP⁹⁰⁻²³² bei neutralem und niedrigem pH-Wert. Kurve 1: SHaPrP⁹⁰⁻²³² bei pH 7,0. Kurve 2: SHaPrP⁹⁰⁻²³² bei pH 4,2. Kurve 3: Differenz beider Spektren (pH 7,0 – pH 4,2). Beide Spektren wurden im Bereich der Tyrosinbande vektornormiert. Bandenzuordnung: 1678 cm⁻¹: *turns*; 1650 und 1551 cm⁻¹: α -Helix; 1517 cm⁻¹: Tyrosin.

3.1.2 FTIR-Spektren

Wie bereits erwähnt, sind α -Helices die bestimmenden Strukturelemente der geordneten Bereiche des nativ gefalteten Prionproteins (siehe Abschnitt 1.1.1). Auch die in der vorliegenden Arbeit verwendeten rekombinanten Prionproteine wiesen in ihrem nativen Zustand eine überwiegend α -helikale Sekundärstruktur auf, wie die entsprechenden FTIR-Spektren des SHaPrP⁹⁰⁻²³² (Abb. 3.3) und des huPrP⁹¹⁻²³¹ (Abb. 3.4) belegen. So konnten im IR-Spektrum des SHaPrP⁹⁰⁻²³² die Banden bei 1650 cm⁻¹ (Amid-I-Bereich) und bei 1551 cm⁻¹ (Amid-II-Bereich) den Absorptionen der α -Helices zugeordnet werden, während die Bande bei 1678 cm⁻¹ durch *turns* hervorgerufen wurde (Abb. 3.3, vgl. Tab. 1.2). Absorptionen des kurzen β -Faltblatts konnten im IR-Spektrum nicht detektiert werden. Die scharfe Bande bei 1517 cm⁻¹ ist auf eine Tyrosin-Ringschwingung zurückzuführen und wurde als interner Standard verwendet, um die Spektren zum besseren Vergleich zu normieren. Bei 1616, 1597 und 1574 cm⁻¹ konnten noch kleinere Banden beobachtet werden, die durch Absorptionen von Aminosäureseitenketten (Tyrosin, Glutamin sowie Aspartat bzw. Glutamat) verursacht wurden (vgl. Tab. 1.3).

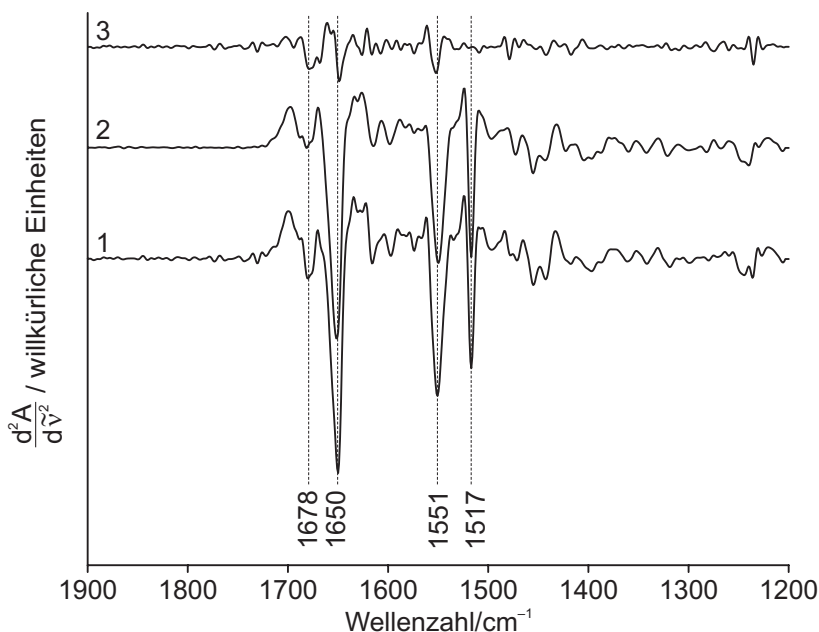


Abbildung 3.4: Zweite Ableitungen der FTIR-Spektren des SHaPrP⁹⁰⁻²³² und des huPrP⁹¹⁻²³¹. Kurve 1: SHaPrP⁹⁰⁻²³² bei pH 7,0. Kurve 2: huPrP⁹¹⁻²³¹ bei pH 7,0. Kurve 3: Differenz beider Spektren (SHaPrP⁹⁰⁻²³² – huPrP⁹¹⁻²³¹). Beide Spektren wurden im Bereich der Tyrosinbande vektornormiert. Bandenzuordnung: 1 678 cm⁻¹: *turns*; 1 650 und 1 551 cm⁻¹: α -Helix; 1 517 cm⁻¹: Tyrosin.

Der pH-Wert hatte im untersuchten Bereich praktisch keinen Einfluss auf die Sekundärstruktur des SHaPrP⁹⁰⁻²³², wie die entsprechenden SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Spektren bei pH 7,0 und pH 4,2 sowie das Differenzspektrum dieser beiden Spektren belegten (Abb. 3.3). Im Differenzspektrum (Kurve 3 in Abb. 3.3) konnte lediglich eine kleine Differenzbande aufgrund der leicht unterschiedlichen Halbwertsbreiten der α -Helix-Banden des SHaPrP⁹⁰⁻²³² bei pH 7,0 und bei pH 4,2 beobachtet werden. Eine alleinige Erniedrigung des pH-Werts führte also zu keiner wesentlichen Änderung der Sekundärstruktur des SHaPrP⁹⁰⁻²³².

Ebenfalls nur geringfügige Unterschiede konnten zwischen der Sekundärstruktur des SHaPrP⁹⁰⁻²³² und der des huPrP⁹¹⁻²³¹ detektiert werden, wie der entsprechende Vergleich der zweiten Ableitungen der jeweiligen FTIR-Spektren zeigt (Abb. 3.4). Auch beim huPrP⁹¹⁻²³¹ waren α -Helices das strukturbestimmende Merkmal (Banden bei 1 650 und 1 551 cm⁻¹; Kurve 2 in Abb. 3.4). Durch eine leichte Verschiebung dieser Banden um jeweils 1 cm⁻¹ gegenüber denen des SHaPrP⁹⁰⁻²³² bei gleichzeitiger leichter Intensitätserniedrigung konnten allerdings im Differenzspektrum (Kurve 3 in Abb. 3.4) kleine Differenzbanden beobachtet werden. Absorptionsbanden des kurzen β -Faltblatts konnten im Spektrum des huPrP⁹¹⁻²³¹ wie bereits

im Spektrum des SHaPrP⁹⁰⁻²³² nicht detektiert werden. Die durch *turn*-Strukturen hervorgerufene Bande des huPrP⁹¹⁻²³¹ bei 1680 cm⁻¹ erschien im Vergleich zu der analogen Bande des SHaPrP⁹⁰⁻²³² weniger stark ausgeprägt, was sich gut mit den NMR-Daten beider Proteine deckt (vgl. Abschnitt 4.1). Insgesamt waren sich die Spektren von SHaPrP⁹⁰⁻²³² und huPrP⁹¹⁻²³¹ aber sehr ähnlich und spiegelten die bereits NMR-spektroskopisch bestimmte große Ähnlichkeit der Sekundärstrukturen beider Proteine gut wider (vgl. Abschnitte 1.1.3 und 1.1.4).

Die zweiten Ableitungen von SHaPrP⁹⁰⁻²³² und huPrP⁹¹⁻²³¹ wurden wiederum im Bereich der Tyrosinbande bei 1517 cm⁻¹ vektornormiert, da diese Bande in beiden Spektren die gleiche spektrale Lage und Halbwertsbreite aufwies. Da das SHaPrP⁹⁰⁻²³² über 10 Tyrosinreste verfügt, das huPrP⁹¹⁻²³¹ jedoch über 11, resultierte aus dieser Methode der Normierung eine geringe Ungenauigkeit. Betrachtet man nämlich alle Tyrosinreste als chemisch äquivalent und nimmt für jeden Rest einen identischen Extinktionskoeffizienten an, würde man erwarten, dass die Tyrosinbande im Vergleich zu den übrigen Banden im Spektrum des huPrP⁹¹⁻²³¹ intensiver als im Spektrum des SHaPrP⁹⁰⁻²³² erscheint. Eine Normierung des Spektrums mit dieser Bande als Referenz führt nun dazu, dass alle übrigen Banden im huPrP⁹¹⁻²³¹-Spektrum eine relativ weniger starke Änderung ihrer Intensität erfahren und damit eine etwas erniedrigte Intensität gegenüber denen im SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Spektrum aufweisen. Genau solch eine Intensitätsverteilung kann man in den zweiten Ableitungen der Spektren des SHaPrP⁹⁰⁻²³² und des huPrP⁹¹⁻²³¹ auch beobachten (Abb. 3.4). Unter Berücksichtigung dieser normierungsbedingten Verschiebung der Bandenintensitäten dürften die tatsächlichen strukturellen Unterschiede zwischen beiden Proteinen noch geringer als die in 3.4 gezeigten ausfallen.

Für die NMR-spektroskopischen Versuche, deren erste Ergebnisse in Abschnitt 4.7 dargestellt werden, war die Herstellung von vollständig mit dem Kohlenstoffisotop ¹³C und dem Stickstoffisotop ¹⁵N markiertem SHaPrP⁹⁰⁻²³², das als ¹³C-¹⁵N-SHaPrP⁹⁰⁻²³² bezeichnet werden soll, erforderlich. Durch den Isotopenaustausch verschoben sich nach Gl. 1.11 die Eigenfrequenzen der Schwingungen, an denen diese Atome beteiligt sind, und damit auch die beobachteten Absorptionsbanden im FTIR-Spektrum des ¹³C-¹⁵N-SHaPrP⁹⁰⁻²³² (Abb. 3.5), verglichen mit denen des nicht markierten SHaPrP⁹⁰⁻²³².

Da ein Isotopenaustausch keinen Einfluss auf die Sekundärstruktur eines Proteins hat, konnten die ¹³C-¹⁵N-Amid-I-Bande bei 1610 cm⁻¹ und die ¹³C-¹⁵N-Amid-II-Bande bei 1524 cm⁻¹ den Absorptionen der α -Helices zugeordnet werden

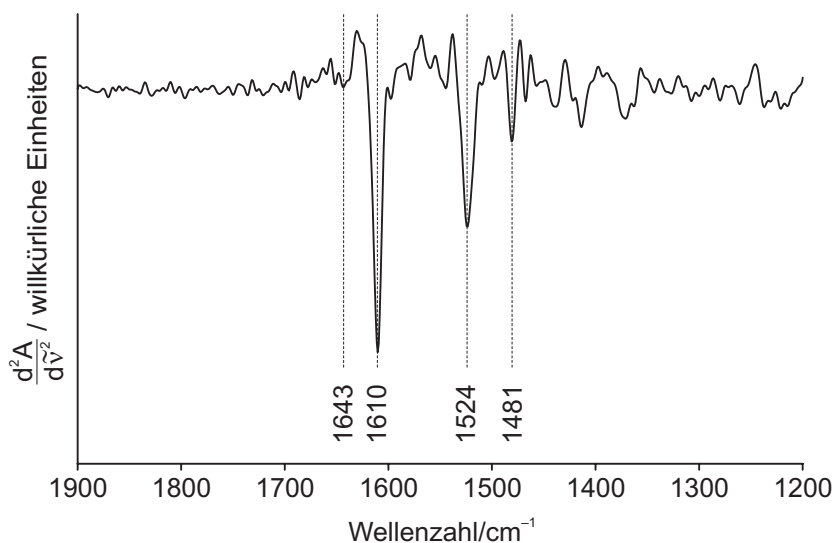


Abbildung 3.5: Zweite Ableitung des FTIR-Spektrums vom vollständig markierten ^{13}C - ^{15}N -SHaPrP⁹⁰⁻²³². Aufgrund des Isotopenaustauschs sind die Banden bei gleicher Sekundärstruktur gegenüber denen im Spektrum des nicht markierten SHaPrP⁹⁰⁻²³² deutlich zu niedrigeren Wellenzahlen verschoben. Bandenzuordnung: 1 610 und 1 524 cm⁻¹: α -Helix; 1 418 cm⁻¹: Tyrosin.

(Abb. 3.5). Aus dem spektralen Muster könnte man schließen, dass die Bande bei 1643 cm⁻¹ den durch *turns* verursachten Absorptionen zuzuschreiben ist. Allerdings liegt genau in diesem Bereich die sehr intensive Absorptionsbande der O-H-Deformationsschwingungen des Wassers, so dass wegen der möglicherweise nicht perfekten Kompensation der Wasserabsorption keine einwandfreie Bandenzuordnung vorgenommen werden kann. Die Bande bei 1481 cm⁻¹ konnte jedoch mit der Tyrosin-Ringschwingung korreliert werden.

3.2 Das kritische Oligomer des SHaPrP⁹⁰⁻²³²

3.2.1 Rahmenbedingungen

Die Prionproteine verschiedener Spezies zeigten bei niedrigem pH-Wert unter dem Einfluss chaotroper Agenzien eine Veränderung ihrer vorwiegend α -helikalen Sekundärstruktur zu einer überwiegend β -Faltblatt-reichen Struktur, die mit einer Aggregation bzw. Oligomerisierung der jeweiligen Proteine einherging (Zhang *et al.*, 1997; Swietnicki *et al.*, 1997, 2000; Hornemann und Glockshuber, 1998; Jackson *et al.*, 1999a). Sowohl die Ausbildung der β -Faltblatt-Struktur als auch die Oligomerisierung wurden allerdings nur innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereichs des chaotropen Agens, der je nach eingestelltem pH-Wert variierte, beobachtet. Bei

höheren Konzentrationen des chaotropen Agens wurde das Prionprotein vollständig entfaltet. Das β -Faltblatt-reiche Oligomer stellte somit eine intermediäre Form während der Entfaltung des Prionproteins dar. Bei neutralem pH-Wert konnte weder die $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltung noch die Bildung eines Intermediats beobachtet werden. Stattdessen fand hier lediglich wiederum bei höheren Konzentrationen der chaotropen Agenzien eine Entfaltung der gesamten Sekundärstruktur statt.

Auch das SHaPrP⁹⁰⁻²³² zeigte ein solches pH-Wert-abhängiges Verhalten gegenüber Guanidiniumhydrochlorid (GuHCl) als chaotropem Agens (Sokolowski, 2001). Für das SHaPrP⁹⁰⁻²³² haben sich dabei Reaktionsbedingungen mit GuHCl in einer Konzentration von 1 M bei einem pH-Wert von 4,2 als günstig für die $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltung und die Bildung dieses Intermediats erwiesen (Sokolowski, 2001).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Bildung dieses Intermediats eingehend untersucht und sollten die Struktur und die Eigenschaften des Intermediats charakterisiert werden. Wie in Abschnitt 3.2.3 gezeigt wird, handelte es sich bei diesem Intermediat um ein transient stabiles Oligomer. Da es nicht nur ein intermediäres Produkt auf dem Entfaltungsweg des Prionproteins war, sondern zugleich eine kritische Zwischenstufe im Aggregationsprozess zu Protofibrillen darstellte, soll es in den folgenden Abschnitten nach Modler *et al.* (2003) als kritisches Oligomer bezeichnet werden.

3.2.2 Stopped-Flow-FTIR-Spektroskopie

Durch Mischen des SHaPrP⁹⁰⁻²³² mit GuHCl zu einer GuHCl-Endkonzentration von 1 M bei pH 4,2 in der Stopped-Flow-Apparatur wurden die $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltung und die Oligomerisierungsreaktion des Proteins induziert. Die $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltungsreaktion wurde zeitaufgelöst beobachtet und differenzspektroskopisch analysiert. Für die bessere Visualisierung wurden jeweils 5 sequenzielle Differenzspektren gemittelt (Abb. 3.6).

Anhand der Differenzspektren konnte die $\alpha \rightarrow \beta$ -Umwandlung der Sekundärstruktur des SHaPrP⁹⁰⁻²³² sehr gut nachvollzogen werden. Die negativen Differenzbanden bei 1 653 cm^{-1} (Amid-I-Bereich) und bei 1 551 cm^{-1} (Amid-II-Bereich) repräsentierten den Verlust an α -helikaler Struktur, während die positiven Differenzbanden bei 1 691 und 1 621 cm^{-1} (Amid-I-Bereich) sowie 1 529 cm^{-1} (Amid-II-Bereich) das Entstehen von β -Faltblatt-Struktur widerspiegeln. Die für β -Faltblatt sehr niederfrequente Differenzbande bei 1 621 cm^{-1} deutete auf sehr starke Wasserstoffbrücken zwischen den am Faltblatt beteiligten Peptidgruppen hin, wie sie typischerweise

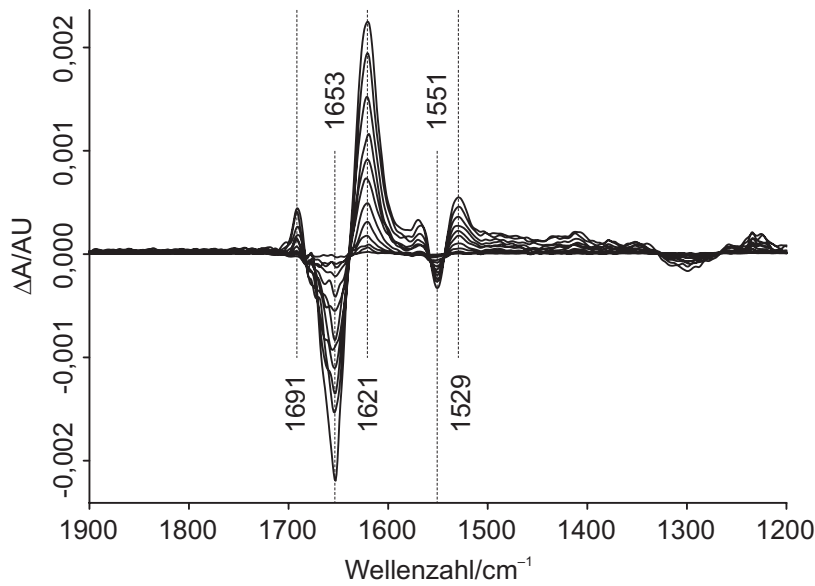


Abbildung 3.6: Gemittelte Differenzspektren der durch 1 M GuHCl bei pH 4,2 induzierten $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltungsreaktion des SHaPrP⁹⁰⁻²³². Positive Differenzbanden entsprechen dem Entstehen einer Absorptionsbande im Reaktionsverlauf, negative dem Verschwinden. Bandenzuordnung: 1691, 1621 und 1529 cm^{-1} : β -Faltblatt; 1653 und 1551 cm^{-1} : α -Helix.

bei der Ausbildung von intermolekularen β -Faltblatt-Strukturen beobachtet werden (vgl. Tab. 1.2 und die dort angegebene Literatur). Die hochfrequente Komponente der β -Faltblatt-Differenzbanden bei 1691 cm^{-1} zeigte eine antiparallele Ausrichtung des gebildeten β -Faltblatts an (vgl. Abschnitt 4.4.4.1).

Um die Kinetik dieser $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltungsreaktion genauer zu untersuchen, wurden die jeweiligen Intensitäten der β -Faltblatt-Differenzbande bei 1621 cm^{-1} und die der α -Helix-Differenzbande bei 1653 cm^{-1} aus den individuellen Differenzspektren ausgelesen und gegen die Reaktionszeit aufgetragen (Abb. 3.7).

Bei der Suche nach einer geeigneten Funktion, mit der diese zeitabhängige Intensitätskurve angepasst werden kann, fiel die Wahl auf die Funktion einer irreversiblen bimolekularen Reaktion, die allgemein durch

$$A(t) - A(0) = a \cdot \left(1 - \frac{1}{1 + \frac{t}{\tau}} \right) \quad (3.1)$$

wiedergegeben wird (Mauser, 1974). Formt man diese Funktion durch Erweiterung mit dem Parameter $a = A(59) - A(0)$ um, erhält man die Funktion

$$A(59) - A(t) = -a \cdot \left(1 - \frac{1}{1 + \frac{t}{\tau}} \right) + a, \quad (3.2)$$

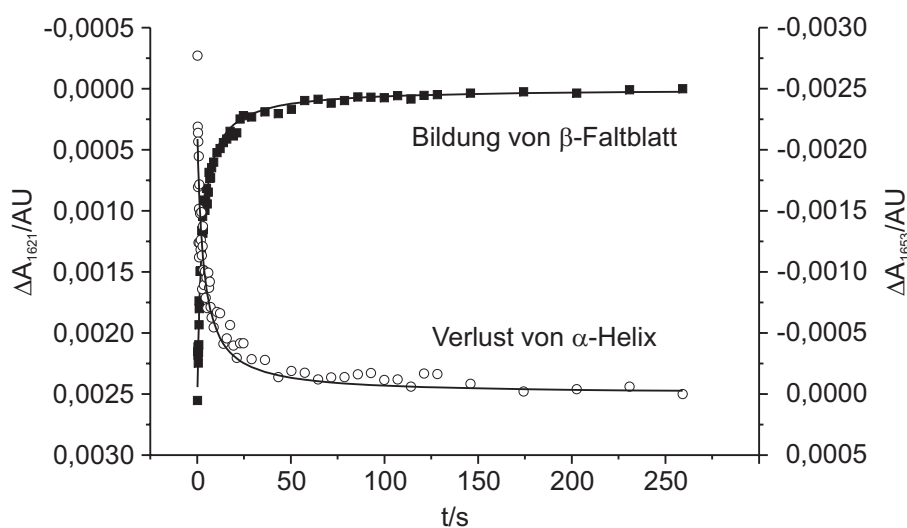


Abbildung 3.7: Zeitabhängige Intensitäten der Differenzbanden bei 1621 cm^{-1} (■, Bildung von β -Faltblatt) und bei 1653 cm^{-1} (○, Verlust von α -Helix) der Reaktion von SHaPrP⁹⁰⁻²³² in 1 M GuHCl bei pH 4,2. Die durchgezogenen Linien geben die Kurvenanpassungen nach Gl. 3.2 wieder.

mit der in Abb. 3.7 gezeigte Intensitätsverlauf der Differenzbande bei 1621 cm^{-1} unter Verwendung von $a = 0,0026$ und $\tau = 2,5 \pm 0,1\text{ s}$ sehr gut angepasst werden konnte. Analog konnte der Intensitätsverlauf der Differenzbande bei 1653 cm^{-1} mit $a = -0,0022$ und $\tau = 3,2 \pm 0,5\text{ s}$ angepasst werden.

Sowohl die Bildung des β -Faltblatts als auch der Verlust von α -Helix ließen sich also mit einer Reaktion zweiter Ordnung beschreiben, wenngleich die aus den Kurvenanpassungen ermittelten Zeitkonstanten geringfügig divergierten.

Wie aus Abb. 3.7 und auch aus den Fehlern der Bestimmung der Halbwertszeit τ ersichtlich ist, konnten die Intensitätswerte der β -Faltblatt-Differenzbande bei 1621 cm^{-1} mit größerer Genauigkeit bestimmt werden als die der α -Helix-Differenzbande bei 1653 cm^{-1} . Dieser Unterschied war durch die nicht perfekt mögliche Kompensation der GuHCl- und Wasserabsorption im Bereich der α -Helix-Bande bedingt.

Um zu evaluieren, ob der Verlust von α -helikaler Struktur und die Bildung von β -Faltblatt-Struktur tatsächlich zeitlich asynchron verliefen oder ob der Unterschied zwischen den Halbwertszeiten τ beider Reaktionen nur auf die unterschiedliche Präzision der Absorptionsbestimmung in beiden spektralen Bereichen zurückzuführen war, wurden die zeitaufgelösten Spektren einer zweidimensionalen (2-D-) Korrelationsanalyse unterzogen.

Sowohl aus einer synchronen 2-D-Korrelationsanalyse (nicht gezeigt) als auch aus einer 2-D-Korrelationsanalyse, die auf Basis eines quadrierten Korrelationskoeffi-

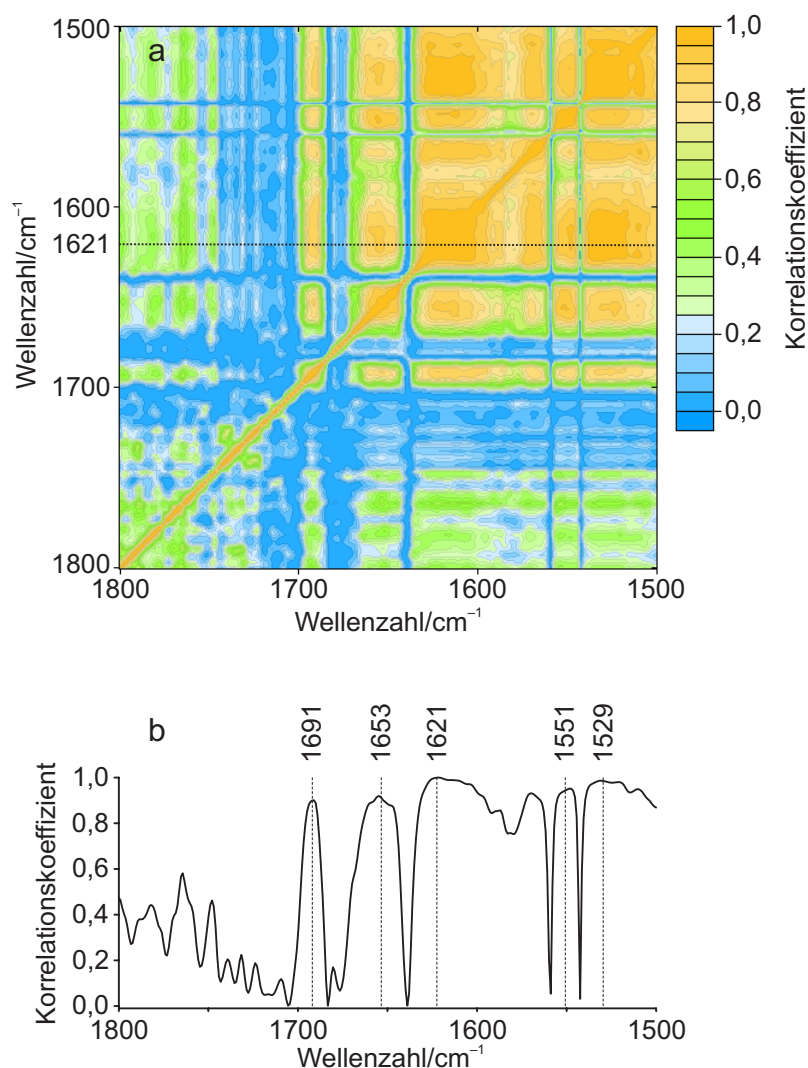


Abbildung 3.8: 2-D-Korrelationsanalyse der Reaktion von SHaPrP⁹⁰⁻²³² in 1 M GuHCl bei pH 4,2. (a) 2-D-Korrelationsplot auf Basis des quadrierten Korrelationskoeffizienten. Ein Korrelationskoeffizient von 1 gibt eine absolute Korrelation zwischen zwei spektralen Merkmalen wieder, während ein Koeffizient von 0 indiziert, dass keine Korrelation zwischen zwei spektralen Merkmalen vorliegt. (b) Schnitt durch den 2-D-Korrelationsplot im Bereich der Amid-I- β -Faltblatt-Bande bei 1621 cm⁻¹ (siehe gepunktete Linie in Grafik a).

zienten erstellt wurde (Abb. 3.8), konnte eine hohe Korrelation zwischen den Änderungen der α -Helix und des β -Faltblatts ermittelt werden.¹

In Abb. 3.8a sind spektrale Bereiche mit hoher Korrelation gelb wiedergegeben, während Bereiche mit geringer oder ohne Korrelation blau gefärbt sind. Um die

¹Sowohl eine synchrone 2-D-Korrelationsanalyse als auch die hier dargestellte 2-D-Korrelationsanalyse auf Basis eines Korrelationskoeffizienten geben die zeitliche Korrelation der Änderung zweier spektraler Merkmale und damit die Synchronität ihrer Änderungen wieder. Durch das Quadrieren des Korrelationskoeffizienten wird die Unterscheidung zwischen positiver und negativer Korrelation aufgehoben; diese Informationsreduktion optimiert die Visualisierung.

Korrelation der Amid-I- β -Faltblatt-Bande mit den übrigen Bereichen gesondert darzustellen, ist zusätzlich ein Schnitt durch den 2-D-Korrelationsplot bei 1621 cm^{-1} dargestellt (Abb. 3.8b). Aus diesem Profil lässt sich erkennen, dass die Intensitätserhöhung der β -Faltblatt-Bande u. a. eine sehr hohe Korrelation mit den spektralen Änderungen bei 1691 und 1529 cm^{-1} (ebenfalls Bildung von β -Faltblatt-Struktur) sowie bei 1653 und 1551 cm^{-1} (Verlust von α -Helix-Struktur) aufwies. Im Amid-I-Bereich von 1620 bis 1600 cm^{-1} wurde ebenfalls eine hohe Korrelation zur β -Faltblatt-Bande beobachtet, die sich aus der Breite der β -Faltblatt-Bande und den darunter liegenden Absorptionen erklären lässt (vgl. dazu die Differenzspektren in Abb. 3.6). Die scharfen Einschnitte im Korrelationsprofil mit einem Koeffizienten nahe null geben die isosbestischen Punkte in den Differenzspektren wieder (vgl. Abb. 3.6) – da sich an diesen Stellen anders als an der Bande bei 1621 cm^{-1} keine Änderung der spektralen Intensität ergab, konnte naturgemäß keine Korrelation berechnet werden.

Eine sehr sensitive Methode, um die spektralen Bereiche zu identifizieren, deren Intensitätsänderungen nicht synchron, sondern sequenziell oder aber mit verschiedenen Geschwindigkeiten ablaufen, ist die Analyse anhand der asynchronen 2-D-Korrelationsintensität $\Psi(\tilde{\nu}_1, \tilde{\nu}_2)$. Mittels solch einer Analyse können auch Signale von sehr kleinen Änderungen, deren Absorptionen im Bereich intensiver Banden erscheinen und von diesen überlagert sind, erkannt werden.

Bei der asynchronen 2-D-Korrelationsanalyse der Reaktion von SHaPrP⁹⁰⁻²³² in 1 M GuHCl bei pH 4,2 wurden zwei Kreuzsignale² bei $1653/1672\text{ cm}^{-1}$ und bei $1621/1672\text{ cm}^{-1}$ beobachtet (Abb. 3.9). Aus dem Vorzeichen dieser Kreuzsignale kann unter Berücksichtigung der Vorzeichen der entsprechenden Signale im synchronen 2-D-Korrelationsplot $\Phi(\tilde{\nu}_1, \tilde{\nu}_2)$ der relative zeitliche Verlauf der jeweiligen Änderungen ermittelt werden. Mit $\Psi(1653, 1672) < 0$ und $\Phi(1653, 1672) > 0$ einerseits sowie $\Psi(1621, 1672) > 0$ und $\Phi(1621, 1672) < 0$ andererseits ergeben sich für die resultierenden Kreuzsignale jeweils negative Vorzeichen. Das heißt, dass die Änderungen bei 1672 cm^{-1} vor denen bei 1653 bzw. 1621 cm^{-1} abliefen. Da bei 1672 cm^{-1} keine Sekundärstrukturmerkmale des SHaPrP⁹⁰⁻²³² absorbierten (vgl. Abb. 3.3), konnte diese Absorption dem GuHCl zugeordnet werden, dessen Absorptionsmaximum bei 1675 cm^{-1} liegt. Eine Evaluierung der Differenzspektren und der zweiten Ableitungen der Absorptionsspektren des SHaPrP⁹⁰⁻²³² in 1 M GuHCl bei pH 4,2

²Konventionsgemäß wird die auf der x-Achse aufgetragene Wellenzahl als $\tilde{\nu}_1$ und die auf der y-Achse aufgetragene Wellenzahl als $\tilde{\nu}_2$ bezeichnet. Die Angabe von Kreuzsignalen erfolgt stets als $\tilde{\nu}_1/\tilde{\nu}_2$.

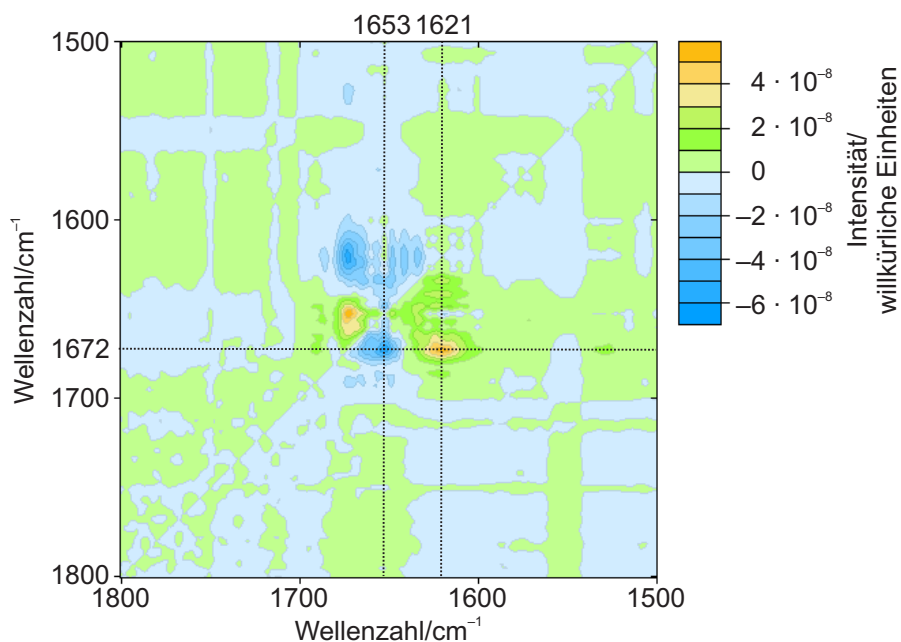


Abbildung 3.9: Asynchroner 2-D-Korrelationsplot der Reaktion von SHaPrP⁹⁰⁻²³² in 1 M GuHCl bei pH 4,2. Die beobachteten Kreuzsignale bei 1653/1672 cm⁻¹ und bei 1621/1672 cm⁻¹ konnten auf Kompensationsartefakte im Bereich der GuHCl-Absorption in den ersten Spektren der zeitaufgelösten Messung zurückgeführt werden.

zeigte dann auch klar, dass die beobachteten Kreuzsignale im asynchronen 2-D-Korrelationsplot auf Kompensationsartefakte im Bereich der GuHCl-Absorption in den ersten Spektren der zeitaufgelösten Messung zurückzuführen waren.

Anhand der 2-D-Korrelationsanalyse konnte gezeigt werden, dass der Verlust von α -helikaler Struktur und die Bildung von β -Faltblatt-Struktur zeitgleich erfolgten. Die aus den Kurvenanpassungen der Intensitäten der korrespondierenden Differenzbanden ermittelten unterschiedlichen Werte von τ (s.o.) können folglich auf die unterschiedliche Genauigkeit der jeweiligen Absorptionsbestimmung zurückgeführt werden.

Um zu evaluieren, ob bereits in der Totzeit des Experiments signifikante Änderungen der Sekundärstruktur auftraten, wurde gemäß dem in Abb. 2.4 dargestellten Schema ein Differenzspektrum zwischen dem ersten Spektrum des Kinetik-Experiments und einem Spektrum des SHaPrP⁹⁰⁻²³² vor Initialisierung der $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltungsreaktion gebildet ($A(tot) = A(0) - A(initial)$), das dann die Totzeitergebnisse wiedergab (Kurve 1 in Abb. 3.10).

Im Vergleich mit den Änderungen, die während des Beobachtungszeitraums der Reaktion in 1 M GuHCl bei pH 4,2 auftraten ($A(kin) = A(59) - A(0)$, Kurve 2 in Abb. 3.10) wird klar ersichtlich, dass sich während der experimentellen Totzeit

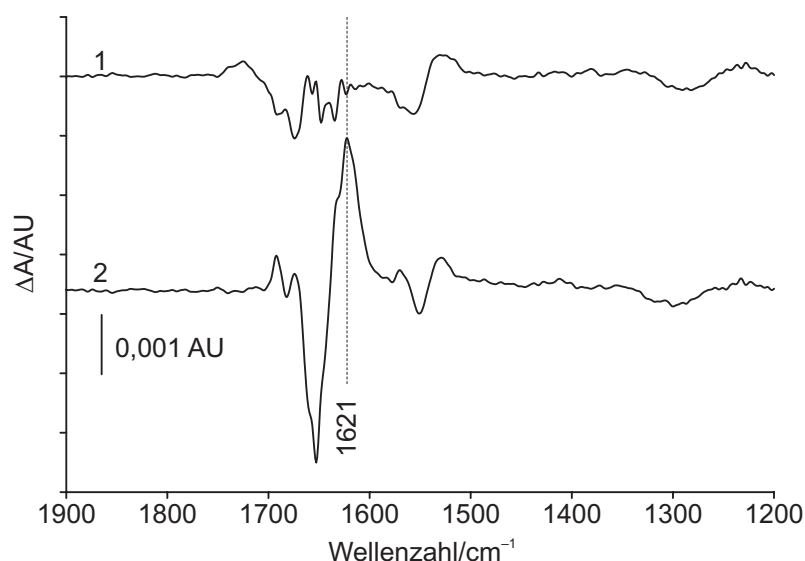


Abbildung 3.10: Beurteilung der Totzeitereignisse. Kurve 1 gibt die strukturellen Veränderungen des SHaPrP⁹⁰⁻²³² in 1 M GuHCl bei pH 4,2, die während der experimentellen Totzeit stattfanden, wieder. Kurve 2 zeigt zum Vergleich die gesamten spektralen Veränderungen während der beobachtbaren Reaktion von SHaPrP⁹⁰⁻²³² in 1 M GuHCl bei pH 4,2. Während der Totzeit entstand keine β -Faltblatt-Struktur, wie das Fehlen einer Differenzbande bei 1621 cm^{-1} zeigt.

von 250 ms noch keinerlei β -Faltblatt-Struktur gebildet hatte. Denn während im gesamten beobachteten Verlauf der $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltungsreaktion eine dramatische Zunahme an β -Faltblatt auftrat, konnte im Totzeit-Differenzspektrum keine Bande bei 1621 cm^{-1} beobachtet werden.

Da sich, wie bereits erwähnt, die Kompensation von GuHCl- und Wasserabsorption nicht perfekt durchführen ließ, konnte aus dem Totzeit-Differenzspektrum keine verlässliche Information hinsichtlich des Verlusts von α -Helix-Struktur innerhalb der Totzeit gewonnen werden. Die anhand der 2-D-Korrelationsanalyse ermittelte Synchronität des Verlusts von α -helikaler Struktur mit der Bildung von β -Faltblatt-Struktur liefert allerdings unter Berücksichtigung, dass sich keine β -Faltblatt-Struktur während der Totzeit bildete, keinen Anhaltspunkt für eine beginnende Auflösung von α -helikaler Struktur innerhalb der Totzeit des Experiments.

3.2.3 Lichtstreuung und Elektronenmikroskopie

Um Aussagen nicht nur über die Änderung der Sekundärstruktur, sondern auch über die morphologischen Eigenschaften und das Aggregationsverhalten des Prionproteins nach Inkubation in 1 M GuHCl bei pH 4,2 treffen zu können, wurden Messungen

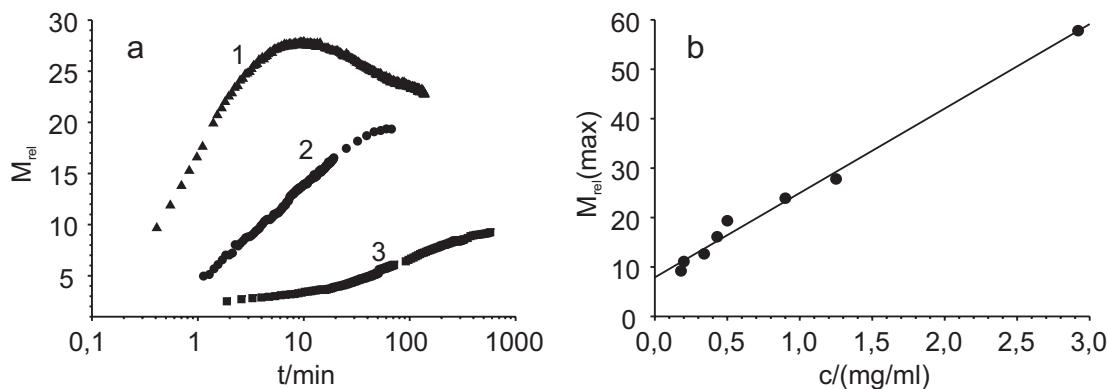


Abbildung 3.11: Aggregationsprozess des SHaPrP⁹⁰⁻²³² in 1 M GuHCl bei pH 4,2, untersucht mittels dynamischer Lichtstreuung. (a) Mit steigender Proteinkonzentration verlief der Aggregationsprozess immer schneller, und es wurden transient immer größere Oligomere gebildet. Die SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Konzentrationen waren $1,25 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Kurve 1), $0,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Kurve 2) und $0,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Kurve 3). (b) Transiente Maxima der Größen von den anfänglich gebildeten Oligomeren bei verschiedenen SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Konzentrationen. Abbildung aus Sokolowski *et al.* (2003).

mittels statischer und dynamischer Lichtstreuung (SLS und DLS) sowie Elektronenmikroskopie (EM) durchgeführt.

Über einen Beobachtungszeitraum von einigen Stunden konnte man nach Mischen von niedrig konzentriertem SHaPrP⁹⁰⁻²³² mit GuHCl in einer Endkonzentration von 1 M bei pH 4,2 eine Aggregation des Proteins beobachten, die zeitgleich mit der $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltung der Sekundärstruktur ablief.³

Der Aggregationsprozess war dabei stark abhängig von der Konzentration des SHaPrP⁹⁰⁻²³². Je höher die Proteinkonzentration, desto schneller verlief die Aggregation, und desto größer waren die anfangs (in den ersten Minuten) gebildeten Aggregate (Abb. 3.11). Anschließend kam es aber wieder zu einem leichten Zerfall zu kleineren Oligomeren. War die Proteinkonzentration ausreichend niedrig ($0,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), konnte man dieses sog. *overshoot*-Phänomen nicht beobachten – das SHaPrP⁹⁰⁻²³² aggregierte dann zu Oligomeren mit einer maximalen relativen Masse von rund 10 Monomereinheiten, die nicht zerfielen (Kurve 3 in Abb. 3.11a). Durch Extrapolation der transienten Maxima des Aggregationsprozesses auf eine Proteinkonzentration von $0 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ wurde eine minimale Größe der Oligomere von 8 Monomereinheiten bestimmt (Abb. 3.11b).

Über einen Beobachtungszeitraum von gut 120 Tagen ließ sich der Aggregationsprozess des SHaPrP⁹⁰⁻²³² mittels Lichtstreuung in zwei Phasen unterteilen

³Um die $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltung auch bei diesen für die FTIR-Spektroskopie zu niedrigen Konzentrationen beobachten zu können, wurde sie mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) verfolgt (Sokolowski *et al.*, 2003).

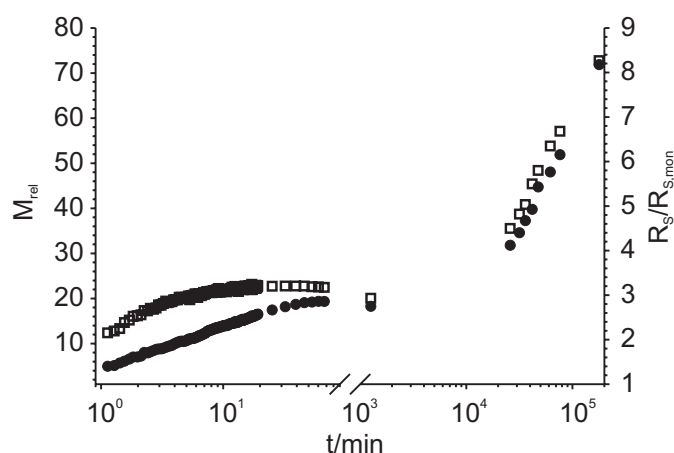


Abbildung 3.12: Aggregationsprozess des SHaPrP⁹⁰⁻²³² in 1 M GuHCl bei pH 4,2 bei einer Proteinkonzentration von $0,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, untersucht mittels statischer (●) und dynamischer (□) Lichtstreuung. Abbildung aus Sokolowski *et al.* (2003).

(Abb. 3.12). Der ersten Phase entsprach die Bildung des Oligomers. Nach seiner Bildung war das Oligomer während einer distinkten Zeitspanne, die ebenfalls von der Konzentration des Proteins abhing, stabil. Wie bereits erwähnt, soll das Oligomer wegen seiner Bedeutung für den folgenden Aggregationsprozess als kritisches Oligomer bezeichnet werden. Das kritische Oligomer aggregierte dann in der zweiten Phase des Prozesses zu größeren polymeren Strukturen. Durch elektronenmikroskopische Untersuchung jeweils eines Aliquots des aggregierenden SHaPrP⁹⁰⁻²³² bei einer Konzentration von $0,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ nach 25 und nach 55 Tagen konnten die Aggregate morphologisch charakterisiert werden.

So wurden nach 25 Tagen mittels EM hauptsächlich kleinere Oligomere mit einem Durchmesser von 10 bis 15 nm beobachtet (Abb. 3.13a). Diese Oligomere waren teilweise kompakt geformt, teilweise wiesen sie aber auch ringförmige Strukturen auf. Ferner enthielt der Reaktionsansatz zu diesem Zeitpunkt noch größere oligomere Aggregate, deren Größe dem Vielfachen der kritischen Oligomere entsprach, sowie kleinere Protofibrillen. Nach 55 Tagen stellten die Protofibrillen die größte Population dar, während kleinere Oligomere nur noch vereinzelt in der Lösung zu sehen waren (Abb. 3.13b).

3.2.4 Rasterkraftmikroskopie

Um die aus EM und DLS erhaltenen Daten zu untermauern und zu verifizieren, wurde eine Oligomerprobe mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM, für engl.: *atomic force microscopy*) untersucht. Über eine Fläche von $5 \cdot 5 \text{ } \mu\text{m}$ konnte dabei eine sehr gleich-

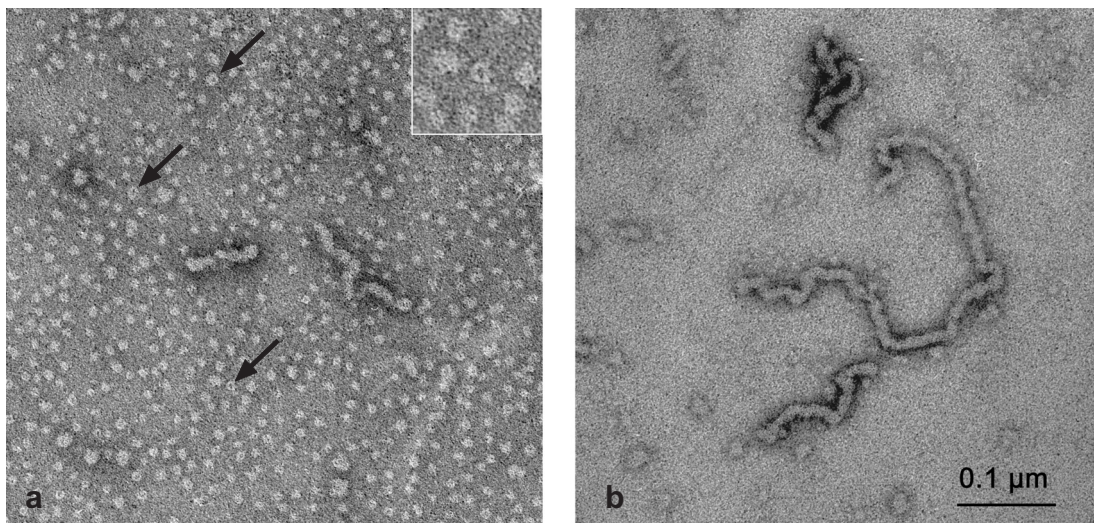


Abbildung 3.13: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von SHaPrP⁹⁰⁻²³² in 1 M GuHCl bei pH 4,2. (a) 25 Tage nach Reaktionsstart konnten vorwiegend kleinere Oligomere beobachtet werden, die teilweise ringförmige Strukturen aufwiesen (siehe Pfeile). In der rechten oberen Ecke ist eine Ausschnittsvergrößerung des untersten markierten Oligomers dargestellt. (b) 55 Tage nach Reaktionsstart konnten hauptsächlich Protofibrillen beobachtet werden. Abbildung aus Sokolowski *et al.* (2003).

mäßige Verteilung von Oligomeren weitgehend homogener Größe beobachtet werden (nicht gezeigt). Anhand eines höher aufgelösten Ausschnitts wurde ein durchschnittlicher Durchmesser der Oligomere von 15 nm bestimmt (Abb. 3.14a). Dieser Wert deckt sich gut mit den Ergebnissen der EM-Experimente.

Nur sehr vereinzelt wurden auch größere Partikel beobachtet, die vermutlich mehrere aneinander gelagerte Oligomere darstellten. Die aus einem Höhenprofil ermittelte Höhe der Oligomere variierte von 0,8 bis 1,8 nm (Abb. 3.14b). Da die mittels AFM bestimmte Höhe eines Moleküls präparationsbedingt i. d. R. etwas niedriger als seine reale Höhe ausfällt, können diese Werte als minimale Höhe angesehen werden. Unter Berücksichtigung eines möglichen Fehlers von 100 %⁴ würde sich damit eine reale Höhe der Oligomere von mindestens 0,8 bis maximal 3,6 nm ergeben. Die Höhe der Oligomere betrug demnach maximal rund ein Viertel ihrer durchschnittlichen lateralen Ausdehnung. Das würde bedeuten, dass die Oligomere keine ideale kugelförmige Gestalt besaßen, sondern eine etwas flachere, scheibenartige Form.

Die Auflösung der AFM-Experimente reichte indes nicht aus, um die in den EM-Aufnahmen beobachtete ringförmige Struktur der Oligomere bestätigen zu können.

⁴Erfahrungsbedingte Abschätzung; persönliche Mitteilung von T. Gutschmann.

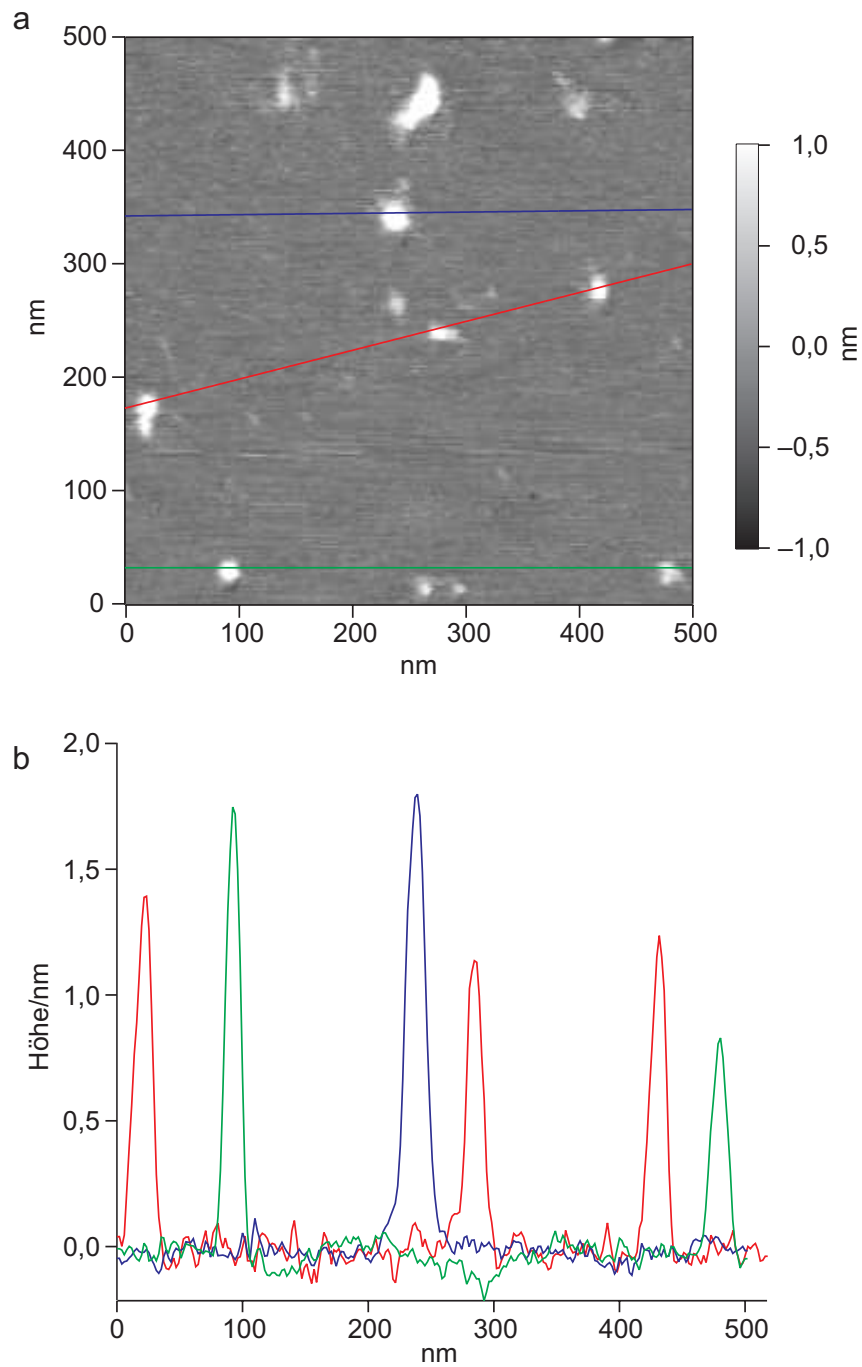


Abbildung 3.14: Rasterkraftmikroskopische Untersuchung von reinem SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Oligomer. (a) Die AFM-Aufnahme der Oligomere zeigt Partikel mit einer durchschnittlichen lateralen Ausdehnung von rund 15 nm. Eine der gemessenen Höhe entsprechende Graustufenskala ist rechts neben der AFM-Aufnahme abgebildet. (b) Höhenprofile der im AFM-Bild (Grafik a) dargestellten Linien. Die daraus bestimmten Höhen der Oligomere variierten zwischen ca. 0,8 und 1,8 nm.

3.2.5 Langzeit-FTIR-Spektroskopie

Bei der Betrachtung eines über Tage und Wochen laufenden Aggregationsprozesses stellte sich natürlich die Frage, ob sich auch die Sekundärstruktur des SHaPrP⁹⁰⁻²³² nach der anfänglichen, dramatischen $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltung im weiteren Verlauf der Aggregation änderte.

An dieser Stelle muss betont werden, dass die SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Konzentrationen, die für DLS- und FTIR-Messungen eingesetzt werden mussten, sehr unterschiedlich waren. Während – wie in Abb. 3.11 dargestellt – DLS-Experimente schon verlässlich mit SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Konzentrationen von $0,2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ durchgeführt werden konnten, waren für FTIR-Experimente stets Proteinkonzentrationen von $\geq 3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ notwendig. Dadurch liefen die entsprechenden Umfaltungs- und Aggregationsprozesse des SHaPrP⁹⁰⁻²³² bei den FTIR-Experimenten um ein Vielfaches schneller ab als bei den DLS-Messungen. Bei $3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ konnten beispielsweise keine kinetischen DLS-Daten der Oligomerbildung mehr aufgenommen werden, da die experimentelle Totzeit aufgrund manueller Mischung von SHaPrP⁹⁰⁻²³² und GuHCl größer war als die vom SHaPrP⁹⁰⁻²³² für die Aggregation benötigte Zeit. Grob geschätzt bewirkte eine Verdopplung der SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Konzentration eine zehnfache Beschleunigung der Oligomerbildung (vgl. Abb. 3.11a). Überträgt man diese Abhängigkeit auf den gesamten Aggregationsprozess, würden 55 Tagen Inkubationszeit bei $0,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ (vgl. Abb. 3.12 und Abb. 3.13b) nur rund 80 Minuten Inkubationszeit bei $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ entsprechen. Daraus folgt, dass die in einem Zeitraum von 10 bis 18 Tagen durchgeführten FTIR-Messungen die strukturellen Veränderungen des SHaPrP⁹⁰⁻²³² ebenso gut erfassen konnten wie das weitaus länger andauernde DLS-Experiment (Abb. 3.12).

Über diesen Zeitraum von bis zu 18 Tagen konnten jedoch mittels FTIR-Spektroskopie keine signifikanten Änderungen der Sekundärstruktur mehr detektiert werden, wie der Vergleich mit den gesamten Änderungen, die während der zeitaufgelösten FTIR-Experimente in der Stopped-Flow-Apparatur beobachtet werden konnten, zeigt (Abb. 3.15). Vielmehr wurden im Verlauf der Langzeitexperimente hauptsächlich Änderungen der GuHCl-Absorptionsbande und der Acetat-Banden registriert, die lediglich auf leichte pH-Schwankungen und/oder Schichtdicken-Instabilitäten schließen ließen. Auch nach Kompensation dieser Differenzen konnten praktisch keine sekundärstrukturspezifischen Differenzbanden detektiert werden (Abb. 3.15).

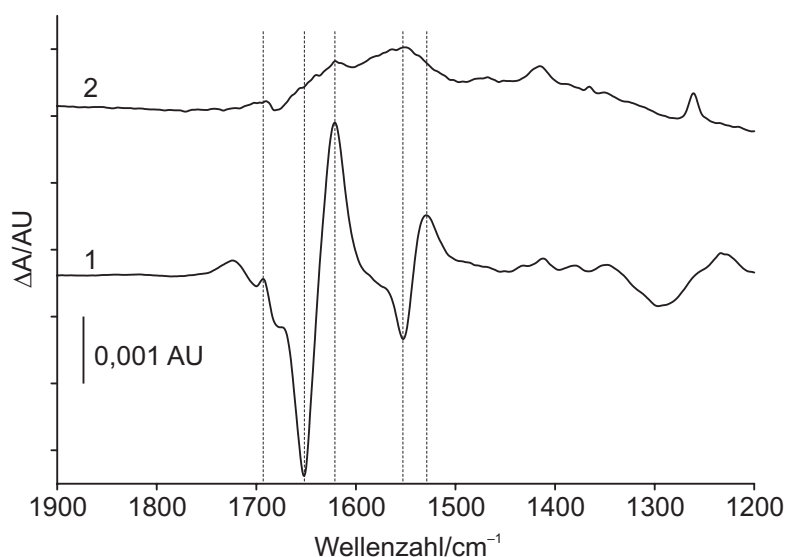


Abbildung 3.15: Differenzspektren eines zeitaufgelösten FTIR-Experiments in der Stopped-Flow-Apparatur und einer FTIR-Langzeituntersuchung von SHaPrP⁹⁰⁻²³² in 1 M GuHCl bei pH 4,2. Kurve 1 zeigt die spektralen Differenzen zwischen dem nativen SHaPrP⁹⁰⁻²³² und dem kritischen Oligomer nach Ende eines zeitaufgelösten Experiments in der Stopped-Flow-Apparatur ($A(\text{gesamt}) = A(59) - A(\text{initial})$), Kurve 2 die spektralen Differenzen, die während einer 12-tägigen Inkubation von SHaPrP⁹⁰⁻²³² in 1 M GuHCl bei pH 4,2 beobachtet werden konnten ($A(12d) - A(0d)$). Das Beobachtungsfenster des Langzeitversuchs begann wegen der manuellen Mischung von SHaPrP⁹⁰⁻²³² und GuHCl und der Verwendung einer zerlegbaren Küvette 30 Minuten nach Initiation der Reaktion, d. h. nach Abschluss der dramatischen strukturellen Veränderungen des SHaPrP⁹⁰⁻²³² in der ersten Phase der Reaktion (vgl. Abb. 3.6).

Offensichtlich fanden die relevanten Änderungen an der SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Sekundärstruktur bereits in der ersten Phase der Bildung des kritischen Oligomers statt. Da die Protofibrillognese ohne sekundärstrukturelle Änderungen des SHaPrP⁹⁰⁻²³² ablief, sind die kritischen Oligomere vermutlich als die kleinsten Bestandteile der Protofibrillen anzusehen. Dafür spricht auch die Abnahme der Oligomerkonzentration im Verlauf der Protofibrillognese (vgl. Abb. 3.13a und Abb. 3.13b).

Die erhaltenen kinetischen Daten deuten also auf eine irreversible bimolekulare Reaktion bei der Bildung der kritischen Oligomere hin, die mit einer sequenziellen Addition von Monomeren zu Dimeren, Dimeren zu Tetrameren und schließlich Tetrameren zu Oktameren erklärt werden könnte.⁵ Die kritischen Oligomere bildeten dann durch weitere – möglicherweise ebenfalls bimolekulare – Schritte größere Oligomere und schließlich Protofibrillen. Dabei kam es zu keiner weiteren Änderung der Sekundärstruktur der Oligomere bzw. der größeren Aggregate. Die Oligomere

⁵Wie erläutert, waren die entstandenen Oligomere bei Proteinkonzentrationen $\gg 0 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ deutlich größer als Oktamere, so dass in diesem Fall die Sequenz an bimolekularen Schritten fortgeführt werden muss.

stellten folglich aufgrund ihrer transienten Stabilität und ihrer antizipierten Funktion als kleinste Protofibrillen-Einheit eine kritische Spezies auf dem Aggregationsweg des SHaPrP⁹⁰⁻²³² dar.

3.2.6 Einfluss der Temperatur auf die Generierung des Oligomers

In der Literatur wurde beschrieben, dass eine Oligomerisierungsreaktion von rekombinantem Prionprotein mit einhergehender $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltung sowohl bei 25 °C als auch bei 37 °C stattfindet (Baskakov *et al.*, 2001, 2002). Laut dieser Literatur gelang es allerdings bislang nur bei 37 °C unter Schütteln, reife Fibrillen zu bilden. Unter der Annahme, dass bei beiden Temperaturen kritische Oligomere als Zwischenstufen gebildet werden, stellt sich die Frage, ob die jeweiligen Oligomere strukturell identisch sind oder Unterschiede aufweisen.

Um diese Frage auf Basis der Sekundärstruktur beantworten zu können, wurde die $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltungsreaktion des SHaPrP⁹⁰⁻²³² in zeitaufgelösten FTIR-Experimenten durch 1 M GuHCl bei pH 4,2 und einer Temperatur von 25 °C bzw. 37 °C in der Stopped-Flow-Apparatur initiiert und beobachtet.

Die resultierenden letzten Spektren der jeweiligen zeitaufgelösten FTIR-Experimente wiesen dabei keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 3.16). Wie bereits aus den dargestellten Differenzspektren bekannt, zeigte das gebildete Oligomer bei 25 °C Absorptionsbanden, die intermolekular ausgerichtetem, antiparallelem β -Faltblatt zugeordnet werden konnten (1691 und 1620 cm^{-1}). Die breite Bande im Amid-II-Bereich um 1544 cm^{-1} spiegelte ungeordnete Strukturen wider, während die Schulter bei 1536 cm^{-1} ebenfalls durch β -Faltblatt verursacht wurde. Die scharfe Bande bei 1517 cm^{-1} konnte der Tyrosin-Ringschwingung zugeordnet werden. Das Spektrum des bei 37 °C gebildeten Oligomers wies die gleichen spektralen Eigenschaften auf wie das Spektrum des bei 25 °C generierten Oligomers – die entstandenen β -Faltblatt-reichen Oligomere hatten folglich identische Sekundärstrukturen.⁶

Die korrekte Kompensation der durch Puffer und GuHCl verursachten Absorptionen erwies sich insbesondere bei 37 °C als deutlich schwieriger als bei 25 °C. Da die hohe Absorption des GuHCl bei 1673 cm^{-1} generell zu einem sehr großen Rauschen im Amid-I-Bereich führte, wurde der (in Abb. 3.16 grau hinterlegte) Abschnitt des

⁶Mögliche Unterschiede hinsichtlich Größe und dreidimensionaler Struktur der Oligomere konnten aus diesen Experimenten allerdings nicht abgeleitet werden.

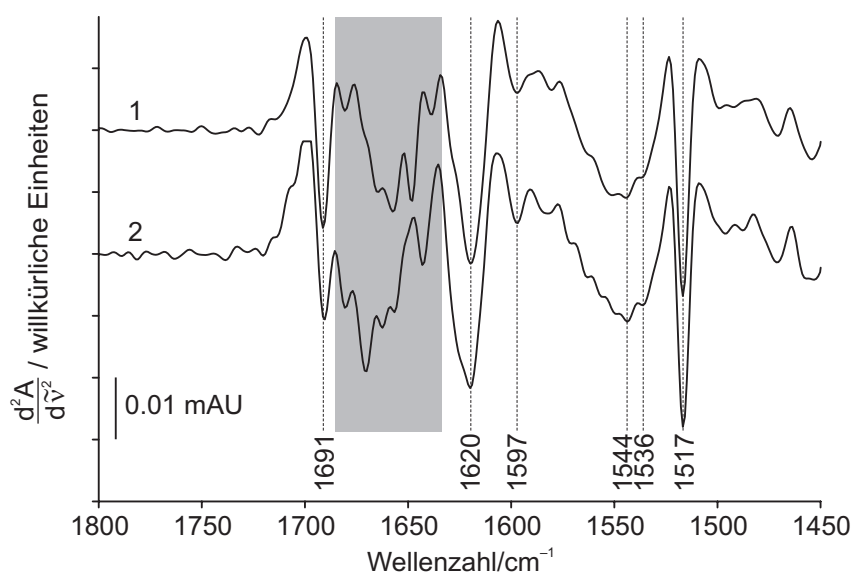


Abbildung 3.16: Zweite Ableitungen der FTIR-Spektren vom SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Oligomer, generiert bei 25 °C (Kurve 1) und bei 37 °C (Kurve 2). Bandenzuordnung: 1691, 1620 und 1536 cm⁻¹: β -Faltblatt; 1544 cm⁻¹: ungeordnete Strukturen; 1517 cm⁻¹: Tyrosin. Über den grau hinterlegten Abschnitt des Amid-I-Bereichs können wegen des hohen Rauschens insbesondere beim 37-°C-Experiment keine exakten vergleichenden Aussagen getroffen werden.

Amid-I-Bereichs für das Experiment bei 37 °C nicht für die Auswertung der Sekundärstruktur herangezogen.

Aus den verbliebenen spektralen Bereichen konnte die Äquivalenz der Sekundärstrukturen der unter beiden Bedingungen gebildeten Oligomere jedoch einwandfrei bestimmt werden.

3.2.7 Darstellung von reinem Oligomer

Grundvoraussetzung für Versuche zur Charakterisierung der Eigenschaften des kritischen Oligomers war die reproduzierbare Darstellung einer ausreichenden Menge eines reinen und über einen längeren Zeitraum stabilen SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Oligomers. Ein entsprechendes Protokoll konnte im Rahmen dieser Arbeit etabliert werden (vgl. Abschnitt 2.2). Gereinigtes und konzentriertes Oligomer konnte über mehrere Monate stabil bei -20 °C gelagert werden. Erforderlich für die Stabilität war indes stets ein niedriger pH-Wert von 4,2. Mit steigendem pH-Wert nahmen die unspezifische Aggregation bzw. Präzipitation und die Anlagerung des Oligomers an Oberflächen deutlich zu. So sanken die Wiederfindungsraten von Oligomeren aus einer Lösung bei pH 7,0 innerhalb weniger Minuten gegen null, weil vermutlich eine

Anlagerung an die zur Konzentration bzw. Dialyse verwendeten Membranen oder an die Reaktionsgefäßwänden stattfand.

Um die Gesamtstabilität des Oligomers und die Stärke der Wechselwirkungen zwischen seinen monomeren Untereinheiten besser abschätzen zu können, wurden das oligomere und das monomere ^{13}C - ^{15}N -SHaPrP⁹⁰⁻²³² vergleichend mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie untersucht (Abb. 3.17).

Das intensivste Signal im Massenspektrum des Oligomers war das des einfach geladenen Monomers bei $\frac{m}{z} = 17\,652$ (Abb. 3.17a). Dieser Wert stimmte im Rahmen der Messgenauigkeit⁷ mit dem berechneten Wert von $\frac{m}{z}(\text{M} + \text{H}^+) = 17\,664$ überein. Ferner konnten deutlich schwächere Signale von jeweils einfach geladenem Dimer ($\frac{m}{z} = 35\,356$), Trimer (53 072), Tetramer (70 766), Pentamer (88 323), Hexamer (105 995), Heptamer (123 706), Oktamer (141 357), Nonamer (159 023), Dekamer (176 712) und Undekamer (194 251) beobachtet werden (Abb. 3.17a). Die einzelnen Signale wurden dabei mit steigender Masse immer schwächer; das Signal des Undekamers hob sich nur noch leicht vom Rauschen ab. Der größte Anteil des Oligomers zerfiel also bei der lasergestützten Ionisation zum Monomer, ein signifikanter Anteil blieb jedoch noch intakt bzw. zerfiel lediglich zu kleineren Oligomeren.

Um sichergehen zu können, dass die beobachteten Signale nicht auf eine spontane Oligomerisierung des Proteins bei der Ionisierung zurückzuführen waren, wurde das monomere ^{13}C - ^{15}N -SHaPrP⁹⁰⁻²³² unter gleichen Bedingungen massenspektrometrisch analysiert. Das intensivste Signal war wiederum das des einfach geladenen Monomers bei $\frac{m}{z} = 17\,659$ (Abb. 3.17b). Ferner konnten im Bereich von kleineren $\frac{m}{z}$ -Werten auch noch die Signale des doppelt und dreifach geladenen Monomers ($\frac{m}{z} = 8\,820$ bzw. $5\,872$) beobachtet werden. Im höheren $\frac{m}{z}$ -Bereich konnten die teils sehr schwachen Signale von einfach geladenem Dimer ($\frac{m}{z} = 35\,309$), Trimer (52 985) und Tetramer (70 606) detektiert werden (Abb. 3.17b).

Aus dem Vergleich der Massenspektren von Oligomer und Monomer wird ersichtlich, dass durch die Ionisation keine größeren Oligomere als das Tetramer gebildet wurden, wohl aber größere Oligomere zu kleineren Oligomeren oder zum Monomer zerfielen. Die Wechselwirkungen zwischen den monomeren Untereinheiten des kritischen Oligomers waren folglich nicht hinreichend stark, um einen Zerfall des Oligomers bei der Ionisierung zu verhindern, aber dennoch stark genug, um auch eine

⁷Es wurde bei den hier dargestellten Massenspektren kein interner, sondern nur ein externer Standard verwendet. Ferner wurde die Kalibrierung beim Oligomer im Messbereich höherer Massen vorgenommen als beim Monomer, so dass die Skalen beider Massenspektren nicht in allen Bereichen gleich genau kalibriert sind.

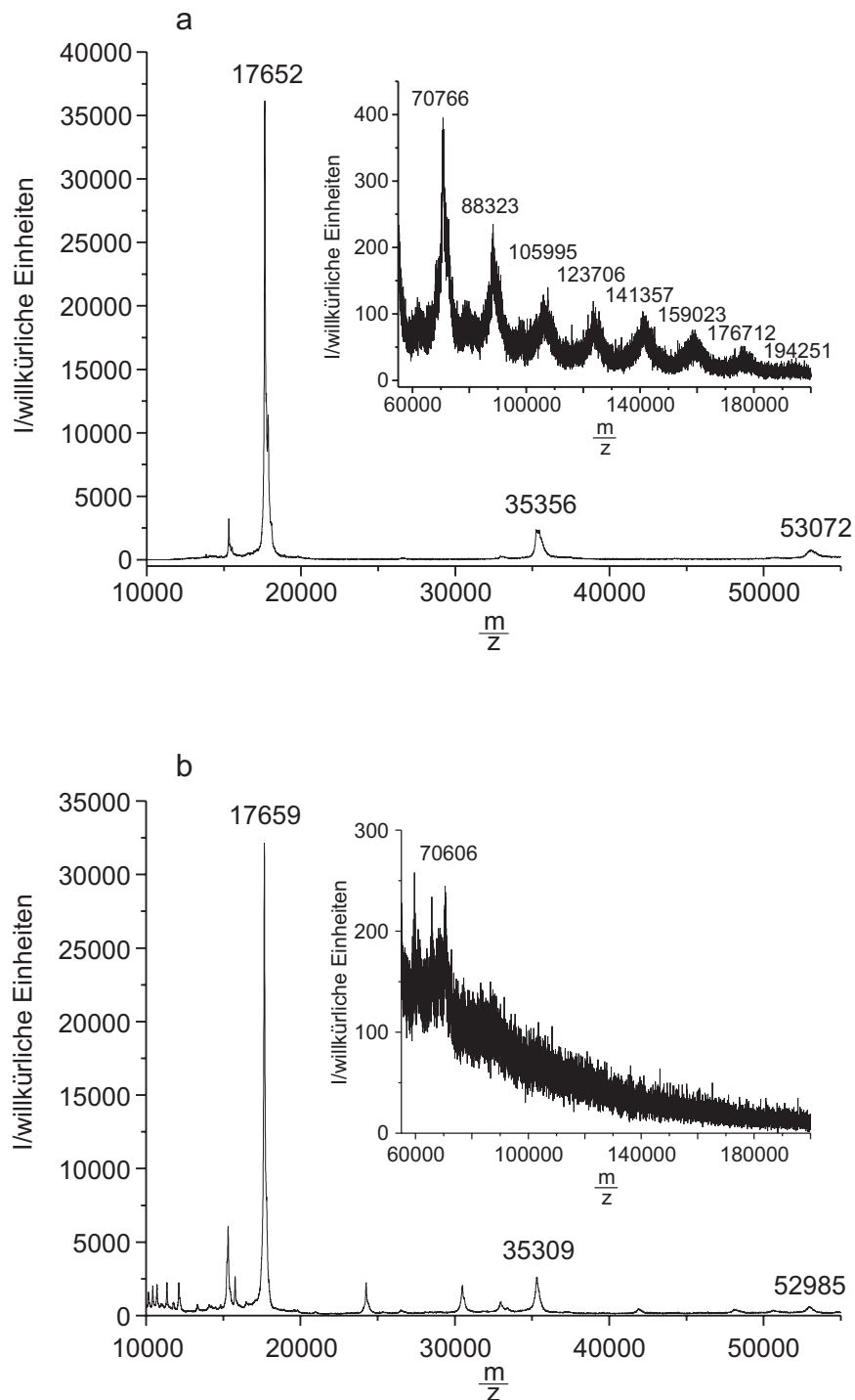


Abbildung 3.17: MALDI-TOF-Massenspektren des oligomeren ^{13}C - ^{15}N -SHaPrP⁹⁰⁻²³² (a) und des monomeren ^{13}C - ^{15}N -SHaPrP⁹⁰⁻²³² (b). Der Bereich von $\frac{m}{z} \geq 55\,000$ ist jeweils in den eingesetzten Grafiken wiedergegeben.

Detektion kritischer Oligomere mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie möglich zu machen.

Aussagen über die relativen Anteile der jeweiligen Produkte in der Ausgangssubstanz sind nur eingeschränkt möglich, da die MALDI-TOF-Massenspektrometrie keine quantifizierende Methode ist. Die Höhe der Signale hängt immer von der Ionisierungs- und Desorptionsfähigkeit der jeweils analysierten Substanz ab. So wäre es durchaus denkbar, dass ein Großteil der Oligomere beim Auftreffen des Laser-Impulses intakt bliebe, aber infolge mangelnder Desorptionsfähigkeit nicht zum Detektor gelangte. Allerdings deutet die Signalintensität des einfach geladenen Monomers im Spektrum des Oligomers, die vergleichbar hoch ist wie die des einfach geladenen Monomers im Spektrum des Monomers gleicher Konzentration, darauf hin, dass bei der Ionisation tatsächlich der Großteil der Oligomere zerfallen ist.

3.3 Weitere Umfaltungs- und Aggregationsbedingungen

Wie im Abschnitt 3.2 erläutert, stellte die Inkubation des SHaPrP⁹⁰⁻²³² in 1 M GuHCl bei pH 4,2 das etablierte System dar, um die $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltung und Oligomerisierung des Proteins durchzuführen. Bei der Bewertung des Reaktionsmechanismus, der dieser Umfaltungs- und Oligomerisierungsreaktion zugrunde lag, stellte sich die Frage, ob die destabilisierende Wirkung eines chaotropen Agens notwendig für die Reaktion ist oder ob auch andere Faktoren vergleichbare Änderungen der Proteinstruktur bewirken könnten. Um dies abzuklären, wurde – wie in den folgenden Abschnitten dargelegt – der Einfluss der Ionenstärke, von reduzierenden und oxidierenden Substanzen sowie der Temperatur auf das Faltungs- und Aggregationsverhalten des SHaPrP⁹⁰⁻²³² untersucht.

3.3.1 Einfluss der Ionenstärke

Durch Variation der NaCl-Konzentration im Bereich von 50 mM bis 2 M konnte in zeitaufgelösten FTIR-Experimenten ab einer NaCl-Konzentration von ≥ 200 mM bei pH 4,2 eine $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltung der Sekundärstruktur des SHaPrP⁹⁰⁻²³² beobachtet werden (Abb. 3.18), die auf den ersten Blick große Ähnlichkeit mit der Reaktion nach Inkubation des Proteins in 1 M GuHCl bei pH 4,2 hatte (vgl. Abb. 3.6).

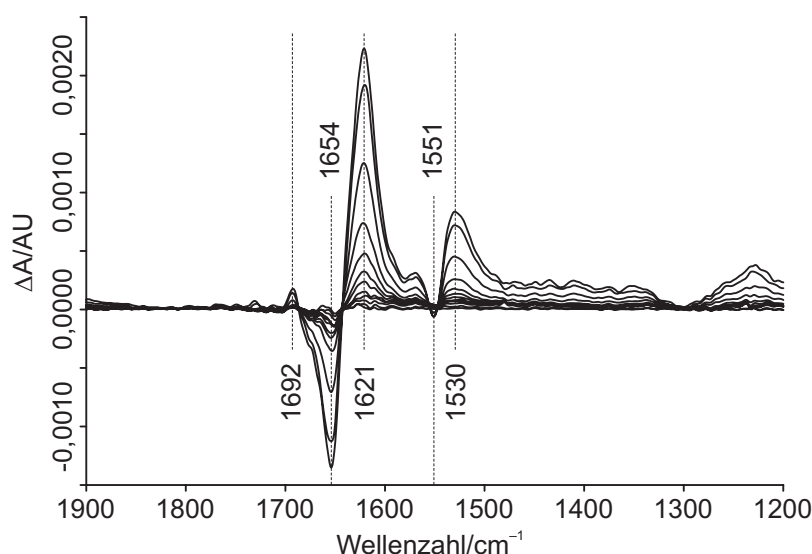


Abbildung 3.18: Gemittelte Differenzspektren der durch 1 M NaCl bei pH 4,2 induzierten $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltungsreaktion des SHaPrP⁹⁰⁻²³². Positive Differenzbanden entsprechen dem Entstehen einer Absorptionsbande im Reaktionsverlauf, negative deren Verschwinden. Bandenzuordnung: 1 692, 1 621 und 1 530 cm^{-1} : β -Faltblatt; 1 654 und 1 551 cm^{-1} : α -Helix.

Wie auch bei der GuHCl-induzierten Umfaltung konnten für die Entstehung von β -Faltblatt charakteristische Differenzbanden bei 1 692, 1 621 und 1 530 cm^{-1} beobachtet werden sowie durch die Abnahme von α -helikalen Strukturen verursachte Differenzbanden bei 1 654 und 1 551 cm^{-1} . Die Verschiebungen der Differenzbanden gegenüber denen der GuHCl-induzierten Reaktion betragen jeweils maximal 1 cm^{-1} (vgl. Abb. 3.6). Auch die Intensitäten der Differenzbanden lagen bei vergleichbaren Konzentrationen von GuHCl und NaCl in der gleichen Größenordnung. Auffallend war bei den durch 1 M NaCl induzierten Differenzspektren lediglich die relativ erniedrigte Intensität der α -Helix-Differenzbande bei 1 654 cm^{-1} . Dieses Phänomen konnte erst bei NaCl-Konzentrationen von ≥ 1 M beobachtet werden, während bei Konzentrationen von 200 bis 800 mM NaCl die α -Helix- und die β -Faltblatt-Differenzbande (1 654 bzw. 1 621 cm^{-1}) identische Intensitäten aufwiesen. Diese Beobachtung spricht dafür, dass der Verlust von α -Helix bei NaCl-Konzentrationen von ≥ 1 M etwas früher initiiert wurde als die Bildung des β -Faltblatts und teilweise bereits in der Totzeit des Experiments stattfand. Da die Kompensation der Wasserabsorption im betreffenden Abschnitt des Amid-I-Bereichs nicht perfekt durchführbar war (vgl. Abschnitt 3.2.2), konnten diese Totzeitereignisse allerdings nicht evaluiert werden.

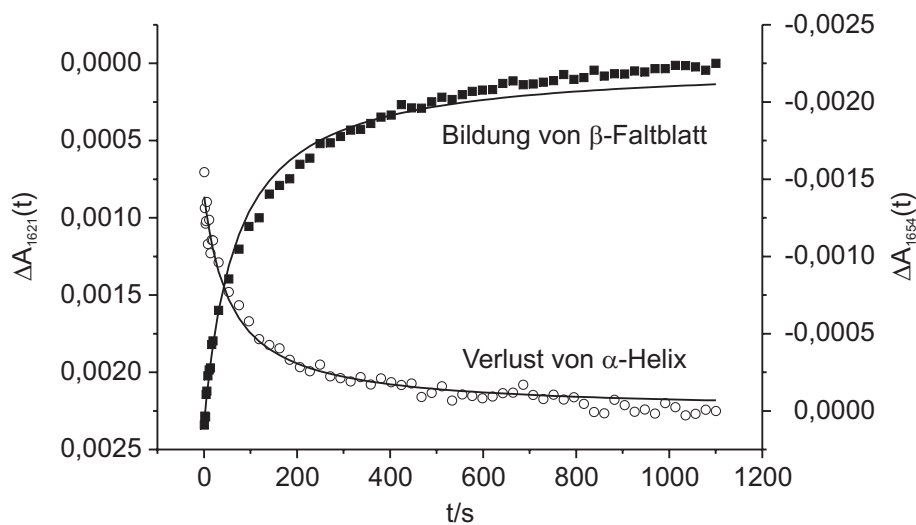


Abbildung 3.19: Zeitabhängige Intensitäten der Differenzbanden bei 1621 cm^{-1} (■, Bildung von β -Faltblatt) und bei 1654 cm^{-1} (○, Verlust von α -Helix) der Reaktion von SHaPrP⁹⁰⁻²³² in 1 M NaCl bei pH 4,2. Die durchgezogenen Linien geben die jeweiligen Kurvenanpassungen nach Gl. 3.2 wieder.

Bei der Untersuchung der Kinetik der durch 1 M NaCl induzierten $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltungsreaktion wurden signifikante Unterschiede zu der durch 1 M GuHCl induzierten Reaktion beobachtet (Abb. 3.19). Am offensichtlichsten war der asymmetrische Verlauf der beiden Kinetikkurven, der auf einen zeitlichen Unterschied zwischen der Auflösung der α -helikalen Strukturen und dem Entstehen der β -Faltblatt-Strukturen hindeutete. Dieser Asynchronismus spiegelte sich auch in den Parametern wieder, die für die Kurvenanpassungen nach Gl. 3.2 gewählt werden mussten. So konnte der zeitliche Verlauf der Intensität der α -Helix-Differenzbande bei 1654 cm^{-1} gut mit $a = -0,0014$ und $\tau = 55,8 \pm 4,0\text{ s}$ angepasst werden. Die beste Anpassung des Intensitätsverlaufs der β -Faltblatt-Differenzbande bei 1621 cm^{-1} gelang mit $a = 0,0024$ und $\tau = 67,3 \pm 3,2\text{ s}$. Die Halbwertszeiten τ beider Teilreaktionen der $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltung unterschieden sich also um mehr als 10 s. Wie darüber hinaus aus Abb. 3.19 zu erkennen ist, gab es deutliche Abweichungen der angepassten Kurve von den Datenpunkten des Intensitätsverlaufs der β -Faltblatt-Differenzbande, während der Intensitätsverlauf der α -Helix-Differenzbande sehr gut angepasst werden konnte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass nur der Verlust von α -helikalen Strukturen, nicht aber die Entstehung von β -Faltblatt mit einem irreversiblen bimolekularen Prozess verknüpft war. Ein solcher Befund ließe sich gut durch unspezifische Aggregation von teilweise entfalteten SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Molekülen mit nachfolgender β -Faltblatt-Bildung erklären.

Ein weiterer Unterschied zur GuHCl-induzierten Reaktion war die deutlich verlängerte Gesamtreaktionszeit, die der $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltung zugrunde lag. Während die GuHCl-induzierte Reaktion in weniger als 250 s abgeschlossen war, wurden für den Abschluss der NaCl-induzierten Reaktion über 1 000 s benötigt.

Um die NaCl-induzierte $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltungsreaktion des SHaPrP⁹⁰⁻²³² noch genauer zu charakterisieren, wurde wie bei der GuHCl-induzierten Reaktion eine 2-D-Korrelationsanalyse durchgeführt (vgl. Abschnitt 3.2.2). Der auf dem quadrierten Korrelationskoeffizienten basierende 2-D-Korrelationsplot der durch 1 M NaCl bei pH 4,2 induzierten Reaktion (Abb. 3.20a) wies dabei eine große Ähnlichkeit mit dem entsprechenden 2-D-Korrelationsplot der GuHCl-induzierten Reaktion auf (vgl. Abb. 3.8a).

Durch die insgesamt etwas breiteren Absorptionsbanden ergaben sich allerdings noch größere Bereiche hoher Korrelation als bei der Reaktion in 1 M GuHCl. Das Profil des 2-D-Korrelationsplots (Abb. 3.20b) zeigte eine hohe Korrelation zwischen den Änderungen der Amid-I- β -Faltblatt-Bande bei $1\,621\text{ cm}^{-1}$ und den Änderungen der Banden bei $1\,691$ und $1\,530\text{ cm}^{-1}$ (Bildung von β -Faltblatt) sowie bei $1\,654$ und $1\,551\text{ cm}^{-1}$ (Verlust von α -Helix). Wiederum fanden die isosbestischen Punkte der korrespondierenden Differenzspektren (vgl. Abb. 3.18) ihre Entsprechung in Korrelationskoeffizienten nahe null. Mittels dieser Korrelationsmethode konnten keine signifikanten Unterschiede zur GuHCl-induzierten Reaktion ermittelt werden.

Der asynchrone 2-D-Korrelationsplot der Reaktion von SHaPrP⁹⁰⁻²³² in 1 M NaCl bei pH 4,2 wies ein deutliches Kreuzsignal bei $1\,652/1\,621\text{ cm}^{-1}$ auf (Abb. 3.21), das im entsprechenden asynchronen 2-D-Korrelationsplot der GuHCl-induzierten Reaktion keine Entsprechung fand (vgl. Abb. 3.9). Mit $\Psi(1652, 1621) > 0$ und $\Phi(1652, 1621) > 0$ ergab sich ein positives Vorzeichen für das resultierende Kreuzsignal. Das heißt, dass die überwiegenden spektralen Veränderungen bei $1\,652\text{ cm}^{-1}$ (also der Verlust von α -Helix) früher stattfanden als die spektralen Veränderungen bei $1\,621\text{ cm}^{-1}$ (also die Bildung von β -Faltblatt).

Anhand der einfachen qualitativen Beurteilung der jeweiligen Differenzspektren bzw. der 2-D-Korrelationsanalyse auf Basis des quadrierten Korrelationskoeffizienten kann folglich nicht eindeutig zwischen der durch NaCl und der durch GuHCl induzierten $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltungsreaktion des SHaPrP⁹⁰⁻²³² unterschieden werden. Aber sowohl die Kurvenanpassungen der zeitabhängigen Intensitäten der entsprechenden Differenzbanden als auch die asynchronen 2-D-Korrelationsanalysen zeigen deutlich, dass die Bildung der jeweiligen β -Faltblatt-reichen Isoformen des SHaPrP⁹⁰⁻²³²

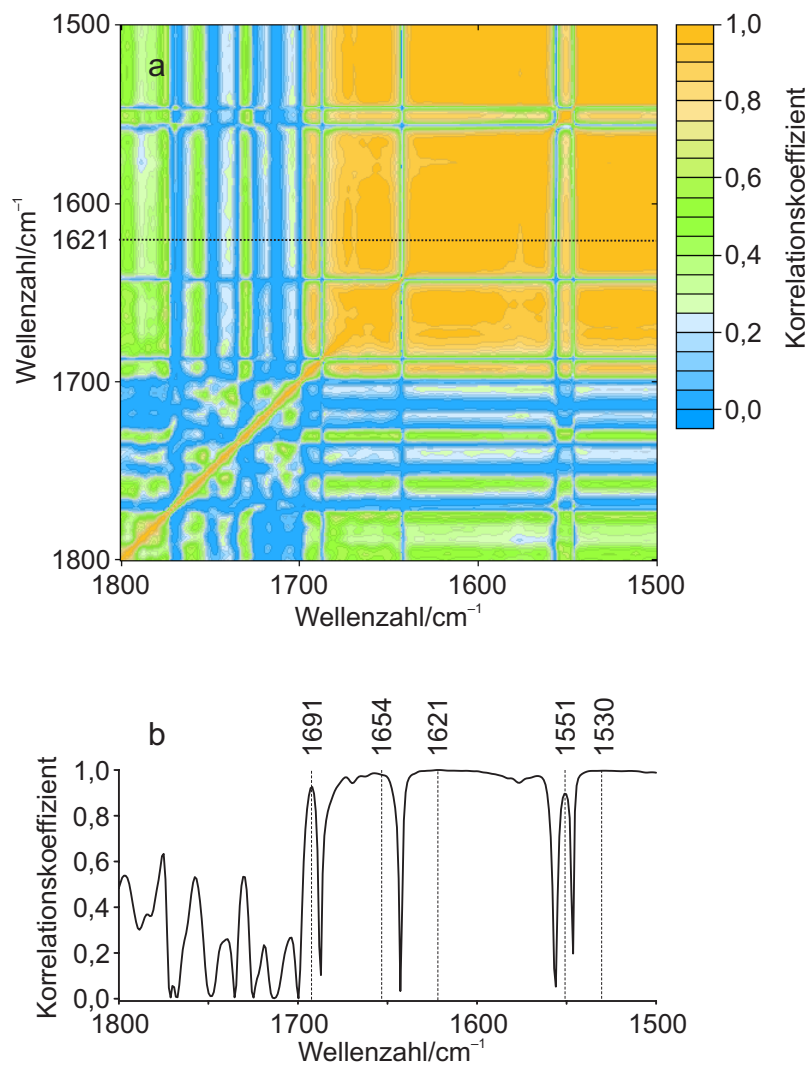


Abbildung 3.20: 2-D-Korrelationsanalyse der Reaktion von SHaPrP⁹⁰⁻²³² in 1 M NaCl bei pH 4,2. (a) 2-D-Korrelationsplot auf Basis des quadrierten Korrelationskoeffizienten. Ein Korrelationskoeffizient von 1 gibt eine absolute Korrelation zwischen zwei spektralen Merkmalen wieder, während ein Koeffizient von 0 indiziert, dass keine Korrelation zwischen zwei spektralen Merkmalen vorliegt. (b) Schnitt durch den 2-D-Korrelationsplot im Bereich der Amid-I- β -Faltblatt-Bande bei 1621 cm^{-1} (siehe gepunktete Linie in Grafik a).

auf unterschiedlichen Faltungswegen mit distinkter Kinetik erfolgten. Daher ist es sehr unwahrscheinlich, dass kritische Oligomere des SHaPrP⁹⁰⁻²³² durch Inkubation in 1 M NaCl erzeugt werden können. Die endgültige Differenzierung zwischen der Bildung kritischer Oligomere und der unspezifischen Aggregation des SHaPrP⁹⁰⁻²³² könnte allerdings nur durch detaillierte Analysen mittels DLS und EM erfolgen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit leider nicht mehr durchgeführt werden konnten.

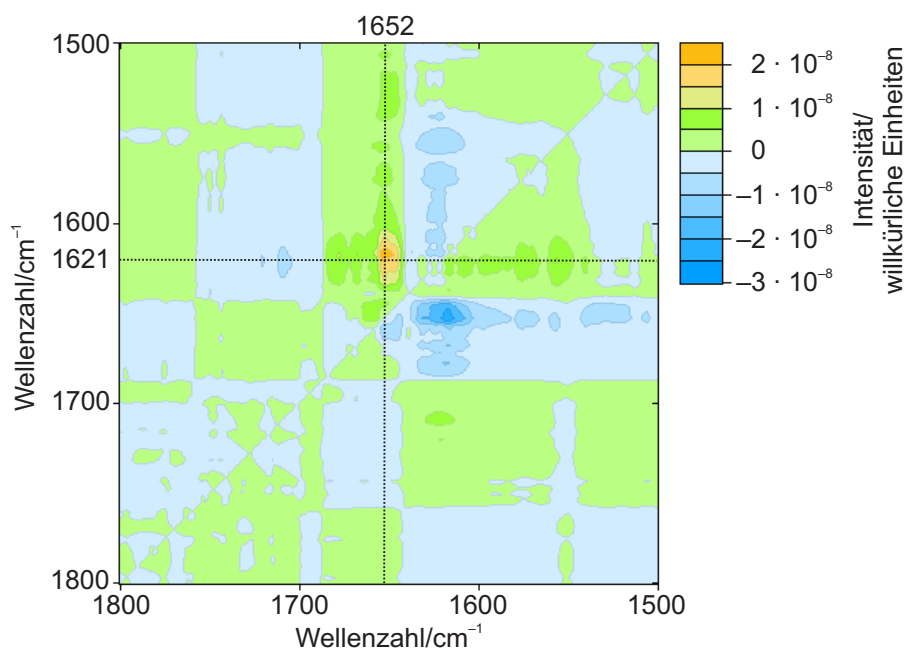


Abbildung 3.21: Asynchroner 2-D-Korrelationsplot der Reaktion von SHaPrP⁹⁰⁻²³² in 1 M NaCl bei pH 4,2. Das Kreuzsignal bei 1652/1621 cm⁻¹ zeigt, dass der überwiegende Verlust von α -helikalen Strukturen vor der Bildung von β -Faltblatt-Strukturen stattfand.

3.3.2 Einfluss von reduzierenden und oxidierenden Substanzen

Die Stabilität eines Proteins kann nicht nur durch die Störung der Wasserstoffbrückenbindungen, die das Protein mit dem umgebenden Wasser bildet, vermindert werden, sondern beispielsweise auch durch Oxidation oder Reduktion seiner Aminosäureseitenketten. Auf diese Weise können bestehende intramolekulare Wechselwirkungen aufgehoben bzw. neu etabliert werden, was sich in Änderungen der Sekundärstruktur eines Proteins äußern kann. Die signifikantesten Änderungen können dabei durch Lösen oder Neuverknüpfen einer Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinresten herbeigeführt werden. Auch die Oxidation von Methioninresten kann zur Veränderung der Proteinstabilität und -struktur führen – nicht zuletzt deswegen ist ein Organismus durch zahlreiche Enzyme gut gegen oxidativen Stress gewappnet.

Das SHaPrP⁹⁰⁻²³² verfügt über insgesamt 2 Cysteinreste, die im nativen Zustand eine Disulfidbrücke bilden. Ein direkter Einfluss auf diese Disulfidbrücke könnte also nur durch eine Reduktion ausgeübt werden, wohingegen oxidative Substanzen auf die insgesamt 10 Methioninreste des SHaPrP⁹⁰⁻²³² einwirken könnten.

3.3.2.1 Reduktion

Dithiothreitol (DTT) eignet sich gut zur Reduktion von Disulfidbrücken in entfaltenen Proteinen. Eine Konzentration von 50 mM DTT ist dabei ausreichend, um eine vollständige Reduktion der Disulfidbrücke des SHaPrP⁹⁰⁻²³² sicherzustellen, und wurde zu diesem Zweck auch bei der Isolierungsprozedur des SHaPrP⁹⁰⁻²³² verwendet (vgl. Abschnitt 2.1.1.3).

Durch Versetzen des SHaPrP⁹⁰⁻²³² mit DTT in Endkonzentrationen von 20, 50 und 100 mM bei pH 7,0 sollte untersucht werden, inwieweit die Reduktion der Disulfidbrücke beim nativ gefalteten SHaPrP⁹⁰⁻²³² möglich ist und welche Änderungen der Sekundärstruktur diese Reduktion ggf. verursacht. Da sich die oxidierte und die reduzierte Form des SHaPrP⁹⁰⁻²³² mittels HPLC unterscheiden lassen, wurden entsprechende Proteinproben unmittelbar nach Mischen mit dem DTT-haltigen Puffer zunächst einer HPLC-Analyse unterzogen. Dabei konnte keine Reduktion festgestellt werden. Nach 5 Tagen wurden die bei Raumtemperatur gelagerten Proben erneut einer HPLC-Analyse unterzogen. Im Chromatogramm konnte nun weder ein Peak des SHaPrP⁹⁰⁻²³² mit intakter Disulfidbrücke noch ein Peak des SHaPrP⁹⁰⁻²³² mit reduzierten Cysteinresten detektiert werden. Stattdessen eluierte das Protein, praktisch ohne Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial zu zeigen. Das ließ auf eine stark verminderte Hydrophobizität des SHaPrP⁹⁰⁻²³² schließen, die man durch eine kovalente Modifikation durch das DTT erklären kann.

Trotz dieser ungünstigen Voraussetzungen wurde ein zeitaufgelöstes FTIR-Experiment bei einer DTT-Konzentration von 100 mM durchgeführt. Über einen Beobachtungszeitraum von knapp 20 Minuten konnten lediglich eine schwache Verminderung des α -helikalen Anteils und eine leichte Erhöhung des β -Faltblatt-Anteils der Sekundärstruktur ohne charakteristische Kinetik beobachtet werden. Die Intensitäten der Differenzbanden waren dabei deutlich niedriger als bei den Versuchen mit GuHCl bzw. NaCl.

Offensichtlich ist die Disulfidbrücke im nativ gefalteten SHaPrP⁹⁰⁻²³² so unzugänglich, dass eine Reduktion auch durch verhältnismäßig hohe DTT-Konzentration nur sehr langsam ablaufen konnte. Gleichzeitig verursachten die hohen DTT-Konzentrationen wahrscheinlich eine kovalente Modifikation des SHaPrP⁹⁰⁻²³². Wegen der geringen Effekte innerhalb von 20 Minuten und der beobachteten Komplexität der DTT-induzierten Vorgänge bei längeren Inkubationszeiten wurde die Reduktion des SHaPrP⁹⁰⁻²³² nicht weiter untersucht.

3.3.2.2 Oxidation

Das SHaPrP⁹⁰⁻²³² wurde mit H₂O₂ in Endkonzentrationen von 20 mM bis 1 M sowohl bei pH 4,2 als auch bei pH 7,0 in der Stopped-Flow-Apparatur gemischt und der Reaktionsansatz anhand zeitaufgelöster FTIR-Experimente untersucht. Über einen Zeitraum von mehr als 20 Minuten konnten keine signifikanten Änderungen der SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Sekundärstruktur detektiert werden. Stattdessen wurde bei höheren H₂O₂-Konzentrationen ein Ausgasen von Sauerstoff beobachtet, das zu einer Änderung der Probenkonzentration im Messfokus führte. Letzteres hatte zur Folge, dass die optimale Kompensation von Pufferabsorptionen sowie die Bildung von Differenzspektren unmöglich wurden.

3.3.3 Einfluss der Temperatur

Wie die meisten Proteine aggregiert auch das rekombinante Prionprotein bei erhöhter Temperatur irreversibel (Zhang *et al.*, 1997). In der Regel geht eine solche Aggregation mit der Zerstörung der nativen Sekundärstruktur einher.

Um zu untersuchen, ob und inwiefern sich die temperaturinduzierten Aggregate des SHaPrP⁹⁰⁻²³² auf Basis ihrer Sekundärstruktur von den kritischen Oligomeren unterscheiden, wurden FTIR-Messungen bei variabler Temperatur in Lösungen durchgeführt, die mit 20 mM NaH₂PO₄ bzw. 20 mM NaD₂PO₄ bei pH/pD 7,0 gepuffert wurden.

Durch Erwärmen von 20 auf 77 °C in 20 mM NaH₂PO₄ konnte anhand der resultierenden Differenzspektren eine deutliche Änderung der Sekundärstruktur des SHaPrP⁹⁰⁻²³² beobachtet werden: Die Anteile an α -Helix nahmen ab, während die β -Faltblatt-Anteile signifikant zunahmen (Abb. 3.22).

Das entstandene β -Faltblatt war antiparallel und intermolekular ausgerichtet, wie die Banden bei 1 690 und 1 624 cm⁻¹ zeigten. Ferner entwickelten sich mit steigender Temperatur zusätzliche *turn*-Strukturen, die durch die Bande bei 1 676 cm⁻¹ repräsentiert wurden. Die abnehmenden α -Helix-Anteile wurden durch die Differenzbanden bei 1 654 und 1 551 cm⁻¹ wiedergegeben. Die breite positive Differenzbande bei 1 535–1 510 cm⁻¹ im Amid-II-Bereich wurde durch die Zunahme von β -Faltblatt verursacht, wie durch Evaluierung der zweiten Ableitungen der entsprechenden Spektren verifiziert werden konnte. Vergleicht man diese Differenzspektren mit denen, die bei der Reaktion zum kritischen Oligomer beobachtet werden konnten (vgl. Abb. 3.6), so fällt die um 3 cm⁻¹ zu höheren Frequenzen verschobene β -Falt-

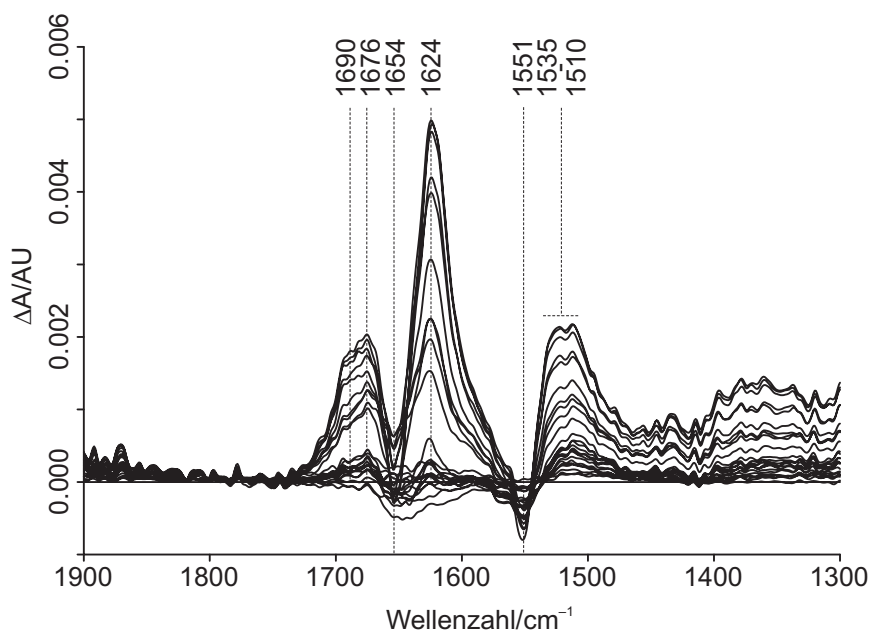


Abbildung 3.22: Differenzspektren von SHaPrP⁹⁰⁻²³² in 20 mM NaH₂PO₄ (pH 7,0) in einem Temperaturbereich von 20 bis 77 °C. Positive Differenzbanden entsprechen dem Entstehen einer Absorptionsbande im Reaktionsverlauf, negative deren Verschwinden. Bandenzuordnung: 1690 und 1624 cm⁻¹: β-Faltblatt; 1676 cm⁻¹: turns; 1654 und 1551 cm⁻¹: α-Helix; 1535–1510: breite Differenzbande der β-Faltblatt-Strukturen im Amid-II-Bereich.

blatt-Differenzbande im Amid-I-Bereich auf. Diese Verschiebung deutet darauf hin, dass die Wasserstoffbrückenbindungen der temperaturinduzierten Aggregate weniger rigide waren als die der kritischen Oligomere. Die negativen Differenzbanden im Amid-I- und Amid-II-Bereich der temperaturinduzierten Reaktion wiesen praktisch keine Verschiebung zu denen der GuHCl-induzierten Reaktion auf. Dies entsprach auch den Erwartungen, spiegelten diese Differenzbanden doch in beiden Fällen das Verschwinden der α-helikalen Struktur, ausgehend von der identischen nativen Konformation des SHaPrP⁹⁰⁻²³², wider.

Wie aus Abb. 3.22 hervorgeht, war das Signal/Rauschen-Verhältnis im Amid-I-Bereich aufgrund der starken Absorption des Wassers bei 1643 cm⁻¹, die sich bei hohen Temperaturen nicht immer gut kompensieren ließ, recht niedrig. Um dieses hohe Rauschen zu umgehen, wurden temperaturabhängige Messungen auch in NaD₂PO₄-gepuffertem D₂O durchgeführt. Die resultierenden Differenzspektren dieser Messungen in 20 mM NaD₂PO₄ wiesen wie erwartet ein signifikant besseres Signal/Rauschen-Verhältnis auf (Abb. 3.23).

Da die Versuche in NaH₂PO₄ und NaD₂PO₄ unter Verwendung der gleichen experimentellen Rahmenbedingungen durchgeführt wurden, war es einfach, die

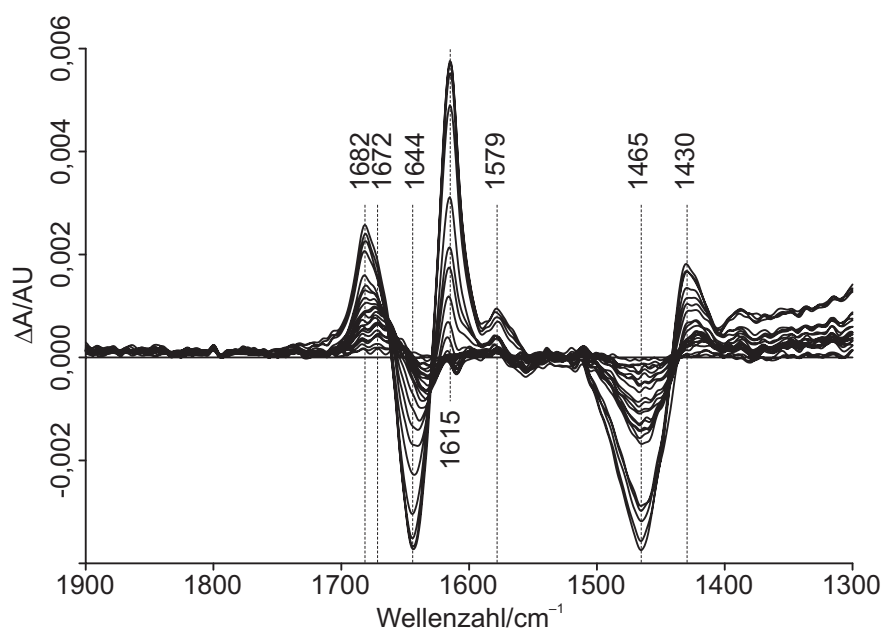


Abbildung 3.23: Differenzspektren von SHaPrP⁹⁰⁻²³² in 20 mM NaD₂PO₄ (pD 7,0) in einem Temperaturbereich von 20 bis 77 °C. Positive Differenzbanden entsprechen dem Entstehen einer Absorptionsbande im Reaktionsverlauf, negative deren Verschwinden. Bandenzuordnung: 1682, 1615 und 1430 cm⁻¹: β -Faltblatt; 1672 cm⁻¹: *turns*; 1644 und 1465 cm⁻¹: α -Helix; 1579 cm⁻¹: möglicherweise Aspartat.

Bandenzuordnungen für die temperaturabhängigen Differenzspektren in NaD₂PO₄ vorzunehmen. So ließ sich mit steigender Temperatur von 20 bis 77 °C anhand der negativen Differenzbanden bei 1644 cm⁻¹ (Amid-I'-Bereich) und 1465 cm⁻¹ (Amid-II'-Bereich) der Verlust an α -helikaler Struktur und anhand der positiven Differenzbanden bei 1682 und 1615 cm⁻¹ (Amid-I'-Bereich) sowie bei 1430 cm⁻¹ (Amid-II'-Bereich) der Zugewinn von β -Faltblatt-Struktur beobachten. Die Differenzbande bei 1579 cm⁻¹ könnte sich mit Änderungen von Schwingungen der Aspartatseitenketten erklären lassen (vgl. Tab. 1.3).

Die Wahl des Lösungsmittels (NaH₂PO₄ in H₂O oder NaD₂PO₄ in D₂O) hatte keinen Einfluss auf die eigentliche Denaturierungs-/Aggregations-Reaktion, wie aus den Verläufen der normierten Aggregationskurven ersichtlich ist (Abb. 3.24). Diese Kurven geben die Intensität der β -Faltblatt-Differenzbande im Amid-I- bzw. Amid-I'-Bereich wieder und sind damit ein Indikator für die Denaturierung/Aggregation des SHaPrP⁹⁰⁻²³². Das im Vergleich zu den in NaH₂PO₄ durchgeführten Messungen deutlich bessere Signal/Rauschen-Verhältnis bei den in NaD₂PO₄ durchgeführten Messungen spiegelte sich in einer signifikant verminderten Streuung der Messpunkte um die angepasste Kurve wider. Der Mittelpunkt der Denaturierungsreaktion

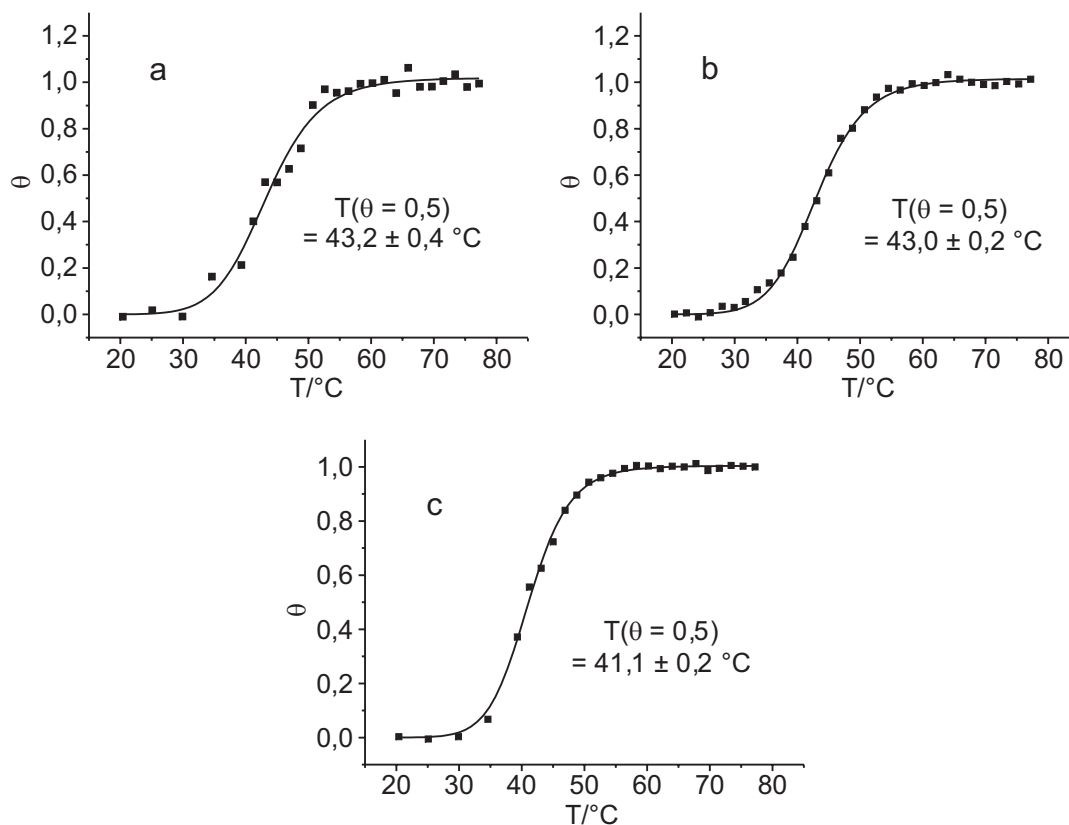


Abbildung 3.24: Temperaturinduzierte Aggregation des SHaPrP⁹⁰⁻²³² bei pH/pD 7,0. $\theta(T)$ wurde aus den Intensitäten der β -Faltblatt-Differenzbande im Amid-I- bzw. Amid-I'-Bereich berechnet. $\theta(T) = 0$ gibt das SHaPrP⁹⁰⁻²³² in seiner nativen Form wieder, während $\theta(T) = 1$ das vollständig denaturierte/aggregierte Protein indiziert. (a) Messung in 20 mM NaH₂PO₄ bei einer Proteinkonzentration von 4 mg · ml⁻¹. (b) Messung in 20 mM NaD₂PO₄ bei einer Proteinkonzentration von 4 mg · ml⁻¹. (c) Messung in 20 mM NaD₂PO₄ bei einer Proteinkonzentration von 8 mg · ml⁻¹. Die durchgezogenen Linien geben die jeweiligen Kurvenanpassungen nach Gl. 2.2 wieder.

$T(\theta = 0,5)$ wurde bei einer Proteinkonzentration von 4 mg · ml⁻¹ für die Reaktion in NaH₂PO₄ mit $43,2 \pm 0,4$ °C bestimmt und für die Reaktion in NaD₂PO₄ mit $43,0 \pm 0,2$ °C. Während gewöhnlich eine etwas höhere Denaturierungs-/Aggregations-Temperatur von Proteinen in D₂O, verglichen mit der in H₂O, festgestellt werden kann (Makhatadze *et al.*, 1995), konnte dies bei den hier dargestellten Versuchen nicht beobachtet werden.

Um eine mögliche Konzentrationsabhängigkeit des Denaturierungs-/Aggregations-Prozesses des SHaPrP⁹⁰⁻²³² zu untersuchen, wurde die Proteinkonzentration bei sonst unveränderten Rahmenbedingungen auf 8 mg · ml⁻¹ verdoppelt.⁸

⁸Da mit 4 mg · ml⁻¹ bereits im unteren Bereich der notwendigen Konzentration für FTIR-Experimente gearbeitet wurde, konnten die Effekte bei noch niedrigeren Konzentrationen nicht untersucht werden.

Diese Erhöhung der SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Konzentration hatte wie erwartet das Absinken der Denaturierungs-/Aggregations-Temperatur auf $41,1 \pm 0,2$ °C zur Folge. Die Denaturierungs-/Aggregations-Temperatur des SHaPrP⁹⁰⁻²³² war also – wie auch die anderer Proteine – konzentrationsabhängig.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die temperaturinduzierten Aggregate eine gegenüber den kritischen Oligomeren veränderte Sekundärstruktur aufwiesen, die sich insbesondere in der Stärke der jeweils beobachteten Wasserstoffbrückenbindungen der β -Faltblatt-Strukturen widerspiegelte.

3.4 Wechselwirkungen von SHaPrP⁹⁰⁻²³² mit Membranen

Die Existenz eines ringförmigen kritischen Oligomers warf zusammen mit seiner gegenüber dem Monomer deutlich erhöhten Hydrophobizität (vgl. Abschnitt 3.2.7) die Frage auf, ob und ggf. wie das kritische Oligomer mit Membranen wechselwirkt und ob sich grundlegende Unterschiede zur Membranwechselwirkung des monomeren SHaPrP⁹⁰⁻²³² feststellen lassen. Denkbar wäre beispielsweise die Integration des Oligomers in eine Membran mit nachfolgender Porenbildung (die ringförmige Öffnung des Oligomers würde dann als Pore fungieren). Auf diese Art könnte das SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Oligomer auch eine cytotoxische Wirkung entfalten, wie sie beispielsweise beim α -Synuclein bereits beobachtet wurde (vgl. Abschnitt 4.4.3.3).

3.4.1 FRET-Spektroskopie

Mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer-Spektroskopie (FRET-Spektroskopie) wurde untersucht, ob sich das SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Oligomer an künstliche vesikuläre Membranen anlagert bzw. in diese einbaut. Mit der FRET-Spektroskopie kann allerdings nicht zwischen diesen beiden möglichen Wechselwirkungen unterschieden werden. Als Lipide für die Modellmembranen wurden Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylcholin (PC) verwendet. PS trägt eine negative Nettoladung, während PC keine resultierende Nettoladung besitzt. Mit der Auswahl dieser beiden Lipide sollten ladungsvermittelte Protein-Lipid-Interaktionen von nichtladungsvermittelten Wechselwirkungen unterschieden werden können.

Wie aus den FRET-Spektren in Abb. 3.25 ersichtlich ist, zeigten sowohl das monomere als auch das oligomere SHaPrP⁹⁰⁻²³² deutliche Wechselwirkungen mit PS und

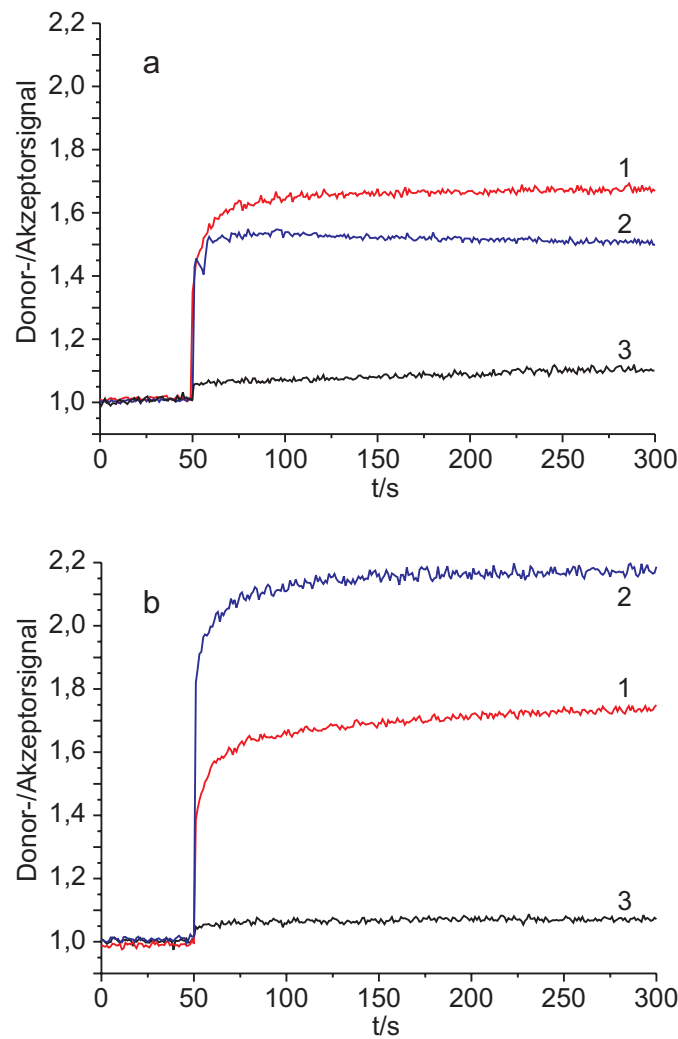


Abbildung 3.25: Untersuchung der Wechselwirkung von SHaPrP⁹⁰⁻²³² mit Membranen mittels FRET-Spektroskopie. Je größer der Quotient aus Donor- und Akzeptorsignal, desto stärker ist die beobachtete Wechselwirkung des Proteins mit den Modellmembranen. (a) SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Oligomer mit PS bei pH 4,2 (Kurve 1), mit PS bei pH 7,0 (Kurve 2) und mit PC bei pH 4,2 (Kurve 3). (b) SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Monomer mit PS bei pH 4,2 (Kurve 1), mit PS bei pH 7,0 (Kurve 2) und mit PC bei pH 4,2 (Kurve 3).

praktisch keine Wechselwirkung mit PC. Das oligomere SHaPrP⁹⁰⁻²³² wies dabei, verglichen mit dem monomeren nativen Protein, überraschenderweise keine erhöhte, sondern je nach pH-Wert nur eine ähnlich starke oder sogar schwächere Membraninteraktion auf. So unterschieden sich die Wechselwirkungen von Monomer und Oligomer mit PS bei pH 4,2 praktisch nicht (Kurven 1 in Abb. 3.25), während das Oligomer bei pH 7,0 eine deutlich schwächere Wechselwirkung mit PS als das Monomer zeigte (Kurven 2 in Abb. 3.25).

Die Hauptereignisse der Wechselwirkung des SHaPrP⁹⁰⁻²³² mit PS fanden sowohl beim Oligomer als auch beim Monomer innerhalb weniger Sekunden nach Zugabe des Proteins zur Lipidlösung (bei 50 s) statt (Abb. 3.25). Innerhalb von weniger als einer Minute waren dann alle FRET-spektroskopisch beobachtbaren Interaktionsergebnisse abgeschlossen, so dass sich Donor- und Akzeptorsignal bis zum Ende des Beobachtungszeitraums von 300 s praktisch nicht mehr veränderten.

3.4.2 Rekonstituierte planare Membranen

Durch Untersuchungen an rekonstituierten planaren Membranen kann ermittelt werden, ob ein Protein mit Modellmembranen interagiert und ob bei dieser Interaktion beispielsweise Poren in den Membranen gebildet werden.

Auf der Grundlage der Vorversuche mittels FRET-Spektroskopie wurde hier insbesondere die Wechselwirkung des SHaPrP⁹⁰⁻²³² mit PS untersucht und bei pH 4,2 gearbeitet. So sollten vergleichbare Bedingungen für die Wechselwirkungen zwischen den Monomeren bzw. den Oligomeren und den Modellmembranen gewährleistet werden.

Sowohl das monomere als auch das oligomere SHaPrP⁹⁰⁻²³² zeigten – wie nach den FRET-Ergebnissen erwartet – eine Interaktion mit planaren PS-Membranen, die anhand der Veränderung der Membrankapazität nach Zugabe des Proteins ermittelt werden konnte (Abb. 3.26).

Während die Membrankapazität durch Interaktion mit dem Oligomer beim dargestellten Experiment auf etwa 87 % ihres Ausgangswertes sank (von 117 auf 102 pF), konnte durch Interaktionen mit dem Monomer eine Abnahme auf 71 % des Ausgangswertes beobachtet werden (von 99 auf 70 pF). Die absoluten Werte der Membrankapazität spielen dabei allerdings nur eine untergeordnete Rolle, da jede rekonstituierte Membran eine bestimmte Kapazität besaß, die geringfügig von den Kapazitäten anderer rekonstituierter Membranen abwich.⁹ Die relativen Änderungen zeigen jedoch deutlich, wie stark die jeweiligen Wechselwirkungen zwischen der Membran und dem applizierten Protein waren.

Als Nachweis für die Bildung von Poren in rekonstituierten Membranen durch Proteine dient die Detektion eines Stromflusses nach Anlegen einer Spannung von bis zu ± 200 mV. Das Verhalten der rekonstituierten PS-Membranen gegenüber den angelegten Spannungen war allerdings nicht einheitlich. So waren die Membranen

⁹Eine Membran wurde dabei jeweils als stabil betrachtet und für eine Messung verwendet, wenn ihre Kapazität ≥ 95 pF war.

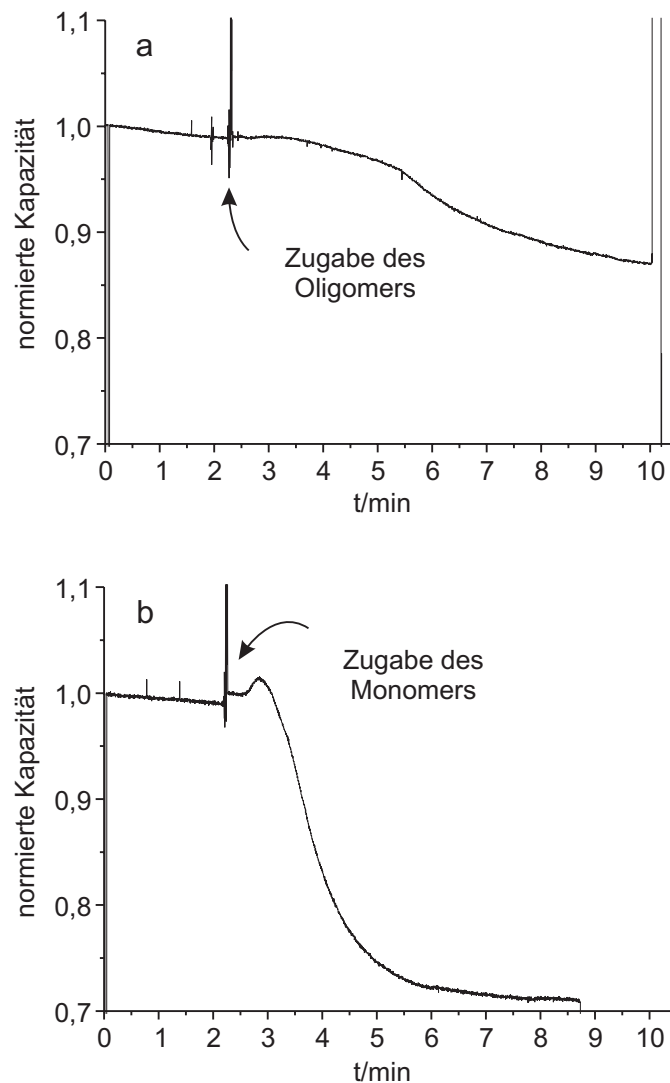


Abbildung 3.26: Kapazitätskurven von rekonstituierten planaren PS-Membranen während der Interaktion mit SHaPrP⁹⁰⁻²³² bei pH 4,2. (a) Wechselwirkung zwischen Membran und Oligomer. (b) Wechselwirkung zwischen Membran und Monomer. Es wurden jeweils 30 µl SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Lösung einer Konzentration von 0,05 mg · ml⁻¹ zugegeben.

nach Zugabe des SHaPrP⁹⁰⁻²³² teilweise so stark destabilisiert, dass sie bereits zerstört wurden, bevor mit dem Anlegen einer Spannung begonnen werden konnte. Teilweise kam es bei niedrigen Spannungen von bis zu ± 50 mV zur Zerstörung der Membran, teilweise aber auch erst bei Spannungen von ± 100 bis ± 200 mV. Demgegenüber waren die Membranen bei den als Negativkontrolle durchgeführten Experimenten, bei denen statt SHaPrP⁹⁰⁻²³² nur der entsprechende Puffer zugegeben wurde, bis ± 200 mV stabil.

Bei keinem Experiment konnte ein Stromfluss detektiert werden. Das lässt darauf schließen, dass das SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Oligomer nicht dazu in der Lage war, Poren in den rekonstituierten Membranen zu bilden, bzw. dass gebildete Poren für die verwendeten Ladungsträger (Na⁺ und Cl⁻) nicht durchlässig waren. Es wurden zwar auch Subphasen mit KCl sowie KCl und MgCl₂ für die Membranpräparation eingesetzt, allerdings gelang es nicht, in diesen Subphasen stabile Membranen auszubilden. Daher liegen keine Ergebnisse hinsichtlich anderer Ladungsträger als Na⁺ bzw. Cl⁻ vor.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das SHaPrP⁹⁰⁻²³² eine deutliche Wechselwirkung mit Membranen zeigte, die aus dem negativ geladenen Lipid PS aufgebaut waren. Das kritische Oligomer wies dabei im Vergleich zum SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Monomer allerdings keine stärkeren, sondern überwiegend schwächere Interaktionen mit den Membranen auf. In keinem Fall konnte an den untersuchten Membranen eine Bildung von Poren durch das Oligomer beobachtet werden.

3.4.3 Neurotoxizität des kritischen Oligomers

Bei anderen krankheitsassoziierten Proteinen wie beispielsweise dem α -Synuclein und dem A β konnten oligomere Intermediate isoliert werden, die in vitro neurotoxische Eigenschaften aufwiesen (vgl. Abschnitt 4.4.3.3). Daher wurde in dieser Arbeit auch eine potenzielle Neurotoxizität der kritischen Oligomere des SHaPrP⁹⁰⁻²³² untersucht.

Wie aus den beiden vorangehenden Abschnitten ersichtlich wurde, konnte weder die antizipierte erhöhte Membranaktivität des kritischen Oligomers, verglichen mit dem SHaPrP⁹⁰⁻²³²-Monomer, noch eine Membranporenbildung durch das Oligomer verifiziert werden. Diese Resultate deuteten bereits darauf hin, dass das kritische Oligomer trotz seiner ringförmigen Struktur möglicherweise auch keine neurotoxische Wirkung entfalten könnte.

Eine Untersuchung der Zell-Überlebensrate von kultivierten neuronalen N2a-Zellen konnte keinen signifikanten Einfluss von extern zugegebenem SHaPrP⁹⁰⁻²³² auf die Zellen nachweisen. Im Vergleich mit der Pufferkontrolle wiesen weder die Zellen, die mit monomerem SHaPrP⁹⁰⁻²³² inkubiert wurden, noch die Zellen, die mit dem kritischen Oligomer inkubiert wurden, erkennbare Unterschiede hinsichtlich ihres Wachstums oder ihrer Aktivität auf.

Wie in Abschnitt 2.10 beschrieben, erfolgte die Proteinzugabe auch bei niedrigem pH-Wert, um eine optimale Stabilität der Oligomere und die größtmögliche

Wahrscheinlichkeit der Membraninteraktion zu garantieren. Auf die getestete Zelllinie hatten die Oligomere jedoch keine nachweisbare neurotoxische Wirkung.

Auf weitergehende Untersuchungen der N2a-Zellen wurde aufgrund der negativen Resultate dieser Experimente verzichtet.