

1 Einleitung

1.1 Das Prionprotein

1.1.1 Allgemeines

Der Begriff „Prion“ wurde von Stanley B. Prusiner als Akronym für „*small proteinacious infectious particle*“ eingeführt (Prusiner, 1982). Mit diesem neuen Begriff sollten die besonderen Eigenschaften der Erreger von Scrapie, einer neurodegenerativen Erkrankung bei Schafen und Ziegen (siehe Abschnitt 1.1.5), beschrieben werden. Denn diese Erreger, die Prionen, erwiesen sich als äußerst resistent gegen Methoden, die Nukleinsäuren inaktivieren (z. B. Behandlung mit Nukleasen oder Bestrahlung mit UV-Licht), konnten aber durch Protein-inaktivierende Methoden (z. B. Behandlung mit Denaturanzien oder Phenol) unschädlich gemacht werden (Prusiner, 1982).

Wenngleich in der Literatur stets die Möglichkeit einer im Proteinkern versteckten Nukleinsäure diskutiert wurde, hat sich die sog. Nur-Protein-Hypothese zunehmend durchgesetzt. Obwohl sie noch nicht endgültig bewiesen ist, erhielt Stanley B. Prusiner für die Entdeckung der Prionen als neuem biologischen Infektionsprinzip 1997 den Nobelpreis für Medizin. Nach der Nur-Protein-Hypothese werden heutzutage Proteine als die alleinigen Bestandteile von Prionen angesehen, weshalb sich der Begriff „Prionprotein“ (PrP) eingebürgert hat. Demnach basiert der Erreger von übertragbaren neurodegenerativen Krankheiten bei verschiedenen Säugerarten allein auf bestimmten Eigenschaften des Prionproteins. Diese übertragbaren neurodegenerativen Krankheiten werden daher auch als Prionkrankheiten bezeichnet. Sie sind in Abschnitt 1.1.5 eingehend dargestellt.

Bislang wurden einige Prionproteine verschiedener Säugerspezies strukturell charakterisiert. Dabei wurden keine identischen, jedoch stets sehr ähnliche Proteinsequenzen und -strukturen identifiziert. Grundlegende Gemeinsamkeiten der Prionproteine sind ein ungeordnetes N-terminales Ende, 3 α -Helices, 2 kurze β -Stränge,

eine hydrophobe Region, eine Oktapeptid-Wiederholungsregion, eine Disulfidbrücke und ein Glykosylphosphatidylinositol-Anker (Prusiner, 1998). Ferner können alle Prionproteine an 2 konservierten Asparaginresten glykosyliert werden. Dabei konnten bereits 52 verschiedene Glykane (aufgebaut aus den verschiedenen im Gehirn vorkommenden Sacchariden) als Prionbestandteil nachgewiesen werden (Rudd *et al.*, 1999, 2001). Die Strukturen der Prionproteine von Hamster und Mensch werden in den Abschnitten 1.1.3 und 1.1.4 detailliert dargestellt.

Das zelluläre Prionprotein (PrP^C) wird von einem einzelnen Gen (dem *PRPN*-Gen) codiert, das beim Menschen auf Chromosom 20 liegt (Robakis *et al.*, 1986) und in allen Zellen eines Organismus exprimiert wird. Seine Funktion ist zwar noch weitgehend unbekannt, allerdings konnte aus zahlreichen Versuchen mit Knockout-Mäusen und Zellkulturen eine antiapoptotische und neuroprotektive Wirkung des PrP^C abgeleitet werden (Roucou und Leblanc, 2005). Möglicherweise übt das PrP^C diese Wirkung durch Regulation des proapoptotischen Proteins Bax aus, doch ist der genaue Mechanismus dieser PrP-Funktion noch nicht verstanden (Roucou und Leblanc, 2005). Durch bislang ebenfalls noch nicht verstandene Mechanismen kann sich die Sekundärstruktur des normalen, apathogenen PrP^C ändern, wodurch das pathogene Scrapie-Prionprotein (PrP^{Sc}) entsteht. Bei dieser Konformationsänderung wird der α -helikale Anteil von 42% auf etwa 30% verringert und der Anteil an β -Faltblatt von 3% auf 43% erhöht (Pan *et al.*, 1993). PrP^C und PrP^{Sc} unterscheiden sich dabei nicht in ihrer Primärstruktur. Die Glykane, mit denen beide Konformationen glykosyliert sind, sind zwar aus den prinzipiell gleichen Sacchariden zusammengesetzt, allerdings unterscheiden sich die relativen Anteile der Saccharide und ihre jeweiligen Verknüpfungen, so dass die individuellen Strukturen der Glykane von PrP^C und PrP^{Sc} differieren (Rudd *et al.*, 1999, 2001). PrP^{Sc} gilt als teilweise resistent gegenüber einem Verdau mit Proteinase K (PK), während PrP^C durch PK vollständig abgebaut wird. Der PK-resistente Kern des PrP^{Sc} umfasst in etwa die Aminosäuren 90–231. Kürzlich wurde allerdings berichtet, dass rund 90% des PrP^{Sc}, das aus Hirnen von verstorbenen Creutzfeldt-Jakob-Patienten isoliert wurde, PK-sensitiv waren (Safar *et al.*, 2005). Sollte sich dieser Befund auch bei anderen Prionkrankheiten ergeben, hätte dies weitreichende Auswirkungen auf den Nachweis und die Reinigung von PrP^{Sc}, die bislang immer unter Ausnutzung seiner angenommenen PK-Resistenz durchgeführt wurden.

Die Untersuchung von rekombinantem Prionprotein verschiedener Spezies konnte das Wissen hinsichtlich Struktur, möglichen Energiezuständen und Faltungswegen

in vitro entscheidend verbessern und zahlreiche Hinweise auf die möglichen molekularen Vorgänge in vivo liefern (Glockshuber, 2001). Durch In-vitro-Untersuchungen an verschiedenen Prionprotein-Konstrukten konnte u. a. gezeigt werden, dass der Umwandlungsprozess von der α -helikalen zur β -Faltblatt-reichen Isoform des Prionproteins stets mit einer Aggregation assoziiert ist (Swietnicki *et al.*, 2000; Lu und Chang, 2002; Baskakov *et al.*, 2002; Sokolowski *et al.*, 2003). Je nach gewählten Bedingungen wurde die Bildung von relativ stabilen Oligomeren oder die Bildung von Amyloid-Fibrillen begünstigt. Es bedarf allerdings noch weiterer Untersuchungen, um die genaue Rolle, die diese unterschiedlichen Aggregationsformen des Prionproteins in Bezug auf die Prionkrankheiten spielen, aufzuklären.

Rekombinantes Prionprotein zeigte in vitro deutliche Wechselwirkungen mit Nucleinsäuren (Cordeiro *et al.*, 2001; Nandi *et al.*, 2002; Adler *et al.*, 2003) sowie einem Chaperonin (Stöckel und Hartl, 2001) und konnte durch diese Makromoleküle auch in eine β -Faltblatt-reiche Form umgefaltet werden. Ob jedoch an der $\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$ -Umwandlung in vivo weitere zelluläre Faktoren wie beispielsweise Glykane oder RNA beteiligt sind, ist nach wie vor umstritten (Shaked *et al.*, 2001; Deleault *et al.*, 2003; Caughey und Kocisko, 2003).

Kürzlich wurden erstmals aus rekombinantem murinem Prionprotein in vitro amyloide Fibrillen erzeugt, mit denen Mäuse infiziert werden konnten (Legname *et al.*, 2004), während bislang in vitro erzeugte Produkte des Prionproteins stets nicht infektiös waren. Wegen der experimentellen Rahmenbedingungen (es wurden Mäuse verwendet, die das Prionprotein stark überexprimieren und daher per se leichter an Scrapie erkranken als Wildtypmäuse) wird die Allgemeingültigkeit dieses Experiments allerdings noch bezweifelt (Couzin, 2004; Edskes und Wickner, 2004). Wenngleich also bereits wichtige Schritte zur Verifikation der Nur-Protein-Hypothese erbracht wurden, steht der letztendliche, einwandfreie und allgemein akzeptierte Beweis weiter aus.

Die beim Prionprotein beobachteten Fehlfaltungsmechanismen erscheinen im Hinblick auf andere Proteine von fundamentaler Bedeutung in der Natur zu sein. So gibt es zahlreiche Proteine, deren Fehlfaltung pathogene Folgen hat. Zu dieser Gruppe gehören beispielsweise die Phenylalaninhydroxylase und das Hämoglobin, die in ihren fehlgefalteten Formen die Phenylketonurie bzw. die Sichelzellenanämie verursachen (Dobson, 2001). Von großer krankheitsrelevanter Bedeutung sind auch das Huntingtin, das α -Synuclein und das β -Amyloid ($A\beta$). Diese Proteine können amyloide Strukturen bilden, die möglicherweise die krankheitsauslösenden Isoformen der

Proteine sind und Chorea Huntington, das Parkinson-Syndrom bzw. die Alzheimer-Krankheit verursachen.¹ Diese Erkrankungen zählen daher wie auch die Prionkrankheiten zu den sog. Amyloidosen, einer großen Gruppe von Erkrankungen, als deren Auslöser amyloide Proteine angesehen werden (Dobson, 2001).² Es gibt allerdings experimentelle Befunde, die bereits intermediären Produkten auf dem Fehlfaltungsweg der entsprechenden Proteine eine wichtige pathogene Rolle hinsichtlich der Entwicklung von Amyloidosen zuschreiben (Lansbury, 1999; Lashuel *et al.*, 2002).

Das Prionprotein nimmt in diesem Zusammenhang eine außergewöhnliche Stellung ein, da es das einzige bislang bekannte Protein ist, das in seiner fehlgefalteten Form (PrP^{Sc}) nicht nur pathogen, sondern auch infektiös ist. Ob dieselbe Isoform des Prionproteins für Pathogenität und Infektiosität verantwortlich ist, konnte indes noch nicht geklärt werden (Chiesa und Harris, 2001).

Es gibt allerdings auch zahlreiche Proteine, die *in vitro* zu Amyloiden gefaltet werden können, von denen bislang aber keine pathogenen Eigenschaften bekannt sind. Zu dieser Gruppe zählen u. a. die Phosphoglyceratkinase, das α -Lactalbumin, die Acylphosphatase und das Cytochrom C₅₅₂ (Damaschun *et al.*, 2000; Dobson, 2001). Es kann daher angenommen werden, dass zahlreiche Proteine in der Lage sind, auch *in vivo* unter geeigneten Bedingungen amyloide Strukturen zu bilden.

Zum besseren Verständnis der Faltungs- und Fehlfaltungswege von Proteinen sollen im Folgenden grundlegende Konzepte der Proteinfaltung kurz dargestellt werden.

1.1.2 Grundlagen der Proteinfaltung

Unterschiede in der Faltung eines Proteins beruhen auf der relativen Rotationsfreiheit der Bindungen zwischen dem α -Kohlenstoffatom des Proteinrückgrats und seinen Nachbarn in der Polypeptidkette. Dabei wird der Rotationswinkel um die Bindung zwischen dem α -Kohlenstoffatom und dem Stickstoffatom als ϕ und der um die Bindung zwischen dem α -Kohlenstoffatom und dem Carbonylkohlenstoffatom als ψ bezeichnet. ϕ und ψ können nur bestimmte Werte annehmen, die u. a.

¹Als Amyloid bezeichnet man aggregierte Proteine, die sich mit bestimmten Farbstoffen wie beispielsweise Kongorot ähnlich wie Stärke (Amylose) anfärben lassen und nach Bindung von Kongorot eine grün-gelbe Doppelbrechung von polarisiertem Licht aufweisen (Dobson, 2001). Amyloide bilden charakteristische unverzweigte Fibrillen mit einem Durchmesser von rund 10 bis 15 nm.

²Streng genommen werden Chorea Huntington und das Parkinson-Syndrom zwar nicht zu den Amyloidosen gezählt, da die entsprechenden amyloiden Proteinablagerungen intrazellulär und nicht extrazellulär auftreten (Dobson, 2001), jedoch soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit wie auch häufig in der Literatur auf eine solche Unterscheidung verzichtet werden.

von der Größe der Seitenkette des jeweiligen Aminosäurerests bestimmt werden. Diese von einem konkreten Protein realisierten Werte für ϕ und ψ können in einem sog. Ramachandran-Plot aufgetragen und bestimmte ϕ, ψ -Bereiche des Plots verschiedenen Sekundärstrukturen zugeordnet werden. Die Favorisierung einer Sekundärstruktur gegenüber einer anderen beruht dabei in erster Linie auf der inter- oder intramolekularen Stabilisierung dieser Struktur mittels Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen.

Bereits in den 50er Jahren des vergangenen Jahrhunderts hatte Christian Anfinsen die Struktur und Faltung von Proteinen erforscht. Seine These über die Bedeutung der Primärstruktur eines Proteins ist als „Anfinsen-Postulat“ bekannt geworden: „Jegliche Information, die zum Erreichen der nativen Konformation eines Proteins unter gegebenen Bedingungen notwendig ist, ist in seiner Aminosäuresequenz enthalten“ (Anfinsen, 1973). Mit diesem Postulat ist allerdings noch nicht erklärt, *wie* die Proteine ihre native Konformation finden. Ginge man davon aus, dass eine zufällige Suche nach dem Energieminimum (also der nativen Konformation) durchgeführt würde, so brauchte ein Protein, das aus 100 Aminosäuren besteht, schon rund 10^{11} Jahre, um sich korrekt zu falten – unter der Annahme, dass jeder Rest nur 2 verschiedene Konformationen annehmen kann und die Umwandlung von der einen in die andere Konformation nur 10^{-11} s dauern würde. Tatsächlich falten sich Proteine aber in Minuten oder Sekunden, teils sogar noch schneller. Dieser Widerspruch ist als Levinthal’sches Paradoxon bekannt (Levinthal, 1968). Im Laufe der letzten Jahrzehnte hat sich das Verständnis der Proteinfaltung durch zahlreiche Experimente und theoretische Berechnungen entscheidend verbessert (siehe beispielsweise Yon, 2002). So konnte gezeigt werden, dass energieminimierende Interaktionen zwischen verschiedenen Resten eines Proteins im Faltungsweg konserviert werden, sich also bestimmte gefaltete Kerne bilden, die dann wiederum zur leichteren Faltung weiterer Aminosäurereste beitragen. Dabei können Chaperone bestimmte Konformationen begünstigen und die Ausbeute an nativ gefaltetem Protein erhöhen (nicht aber deren Bildungsrate) (Yon, 2002). Die meisten Proteine durchlaufen während der Faltung den Zwischenzustand des *molten globule* (engl. für „geschmolzenes Kügelchen“). *Molten globules* sind kompakte Intermediate mit einem hohen Anteil an nativer Sekundärstruktur, aber noch fluktuierender Tertiärstruktur. Hydrophobe Oberflächenbereiche sind im *molten globule* noch frei zugänglich und nicht im Innern des Proteins angeordnet (Yon, 2002). Nach der Bildung des *molten globule* finden die langsameren Ereignisse der Proteinfaltung wie beispielsweise die korrekte An-

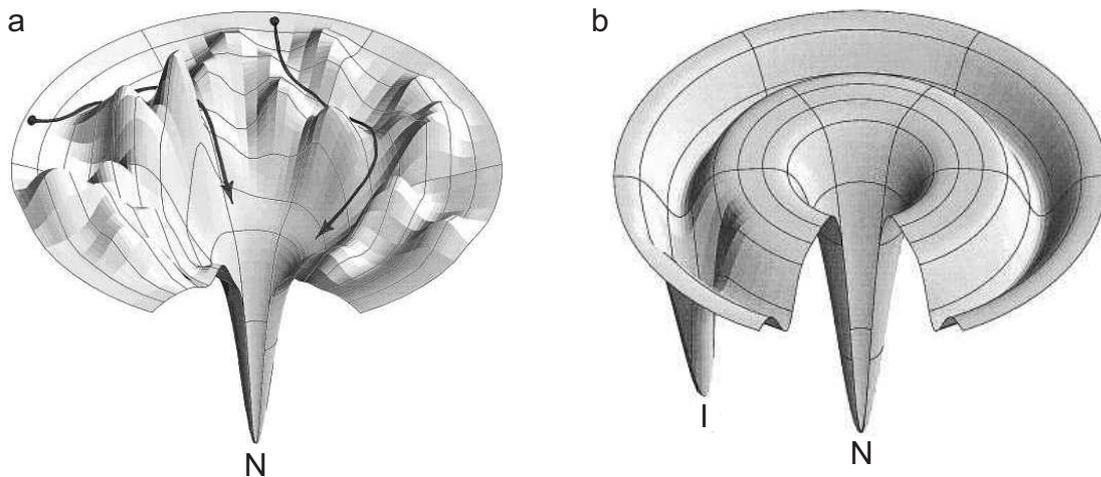


Abbildung 1.1: Zwei verschiedene Faltungstrichter zur Illustrierung möglicher Faltungswege eines Proteins. (a) Ein sich schnell faltendes Protein kann auf zahlreichen Wegen, von denen zwei beispielhaft dargestellt sind, den nativen Zustand N erreichen. (b) Existiert hingegen ein relativ stabiler intermediärer Zustand I, kann das Protein in diesem „gefangen“ werden, so dass es ohne Energiezufuhr den nativen Zustand N nicht mehr erreichen kann. Aus Chan und Dill (1998).

ordnung der hydrophoben Bereiche, die Aus- oder Umbildung von Disulfidbrücken und die präzise Ordnung der Sekundärstrukturelemente statt.

Am besten kann man sich den Prozess der Proteinfaltung mittels des sog. Faltungstrichters vorstellen, der die Energielandschaft während der Proteinfaltung repräsentiert (Abb. 1.1). Die Höhe des Faltungstrichters spiegelt dabei die Energie des Systems (also des sich faltenden Proteins) wider, während seine laterale Ausdehnung auf einem Energieniveau die Entropie des Systems darstellt. So kann eine ungefaltete Polypeptidkette auf zahlreichen verschiedenen Wegen unter Durchlaufen von diversen Zwischenzuständen, die mehr oder weniger stabil sein können, ihre native Konformation erreichen. Dabei kann sie – je nach Form des Faltungstrichters – in lokalen Energieminima „gefangen“ werden, ohne je das globale Minimum zu erreichen.³ Das bedeutet, dass die Proteinfaltung stets unter thermodynamischen und kinetischen Gesichtspunkten betrachtet werden muss. Je mehr sich die Polypeptidkette ihrem nativ gefalteten Zustand annähert, desto geringer ist die Anzahl der möglichen Konformationen, und desto geringer ist damit auch die Entropie des Systems. Dieser Nachteil wird allerdings durch die Minimierung der Energie mehr als ausgeglichen.

³Unter der Voraussetzung, dass das System keine Energiezufuhr von außen erfährt.

1.1.3 Das Prionprotein des Syrischen Hamsters

Das Prionprotein des Syrischen Hamsters (Goldhamster, *Mesocricetus auratus*) besteht in seiner unprozessierten Vorläuferform aus 254 Aminosäuren (Abb. 1.2).

```

1  MANLSYWLLA LFMVAMWTDVG LCKKRPKPGG WNTGGSRYPG QGSPGGNRYP PQGGGTWGQP
61  HGGGWGQPHG GGWGQPHGGG WGQPHGGGWG QGGGTHNQWN KPSKPKTNMK HMAGAAAAGA
121 VVGGLGGYML GSAMSRPMMH FGNDWEDRYY RENMNRYPNQ VYRVPDQYN NQNNFVHDCV
181 NITIKQHTVT TTTKGENFTE TDIKIMERVV EQMCTTQYQK ESQAYYDGRR SSAVLFSPP
241 VILLISFLIF LMVG

```

Abbildung 1.2: Primärstruktur des Prionproteins des Syrischen Hamsters (Basler *et al.*, 1986, Swiss-Prot-Code P04273). Das SHaPrP⁹⁰⁻²³² umfasst die unterstrichenen Aminosäuren.

Die Aminosäuren 1–22 bilden eine Signalsequenz und sind im nativen Prionprotein ebenso wie die Aminosäuren 232–254 abgespalten. Das reife Prionprotein umfasst also die Aminosäuren 23–231 („PrP voller Länge“) und weist die in Abschnitt 1.1.1 zum Teil schon kurz beschriebenen grundlegenden strukturellen Charakteristika der Prionproteine auf, die im Folgenden nach Wüthrich und Riek (2001) näher erläutert werden. Die Aminosäuren 52–91 stellen 5 Oktapeptide der sich wiederholenden Sequenz PHGGGWGQ dar. Lediglich das erste dieser Oktapeptide weist mit der Sequenz QGGGTWGQ eine geringe Abweichung vom Wiederholungsmotiv auf. Die Histidinreste der Oktapeptide können theoretisch unter Ausbildung einer Struktur mit mehreren Schleifen bis zu 4 Cu²⁺-Ionen komplexieren. Dabei würden die Aminosäuren 62–68, 70–76 und 78–84 die äußeren Schleifen dieser Struktur bilden. Ein weiteres Cu²⁺-Ion kann *in vitro* von den Histidinresten 96 und 111 (außerhalb der Oktapeptidregion) gebunden werden (Jones *et al.*, 2004). Ob *in vivo* aber überhaupt eine Cu²⁺-Bindung durch das Prionprotein stattfindet, ist noch nicht bekannt.

Der Abschnitt der Aminosäuren 112–124 ist ungewöhnlich hydrophob; möglicherweise handelt es sich um eine Transmembranregion. Am Serin-231 ist das Prionprotein mit einem Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) an der Zellmembran verankert, und zwischen den Cysteinresten 179 und 214 ist die einzige Disulfidbrücke des Proteins ausgebildet. An den Asparaginresten 181 und 197 kann das Prionprotein glykosyliert sein. Bei PrP^C und PrP^{Sc}, die aus Hamsterhirnen isoliert wurden, konnten zwar nicht-, mono- und diglykosylierte Isoformen identifiziert werden, allerdings stellte die diglykosylierte Isoform jeweils den Hauptanteil der Präparation dar (Rudd *et al.*, 1999), so dass man davon ausgehen kann, dass i. d. R. beide Glykosylierungsstellen auch tatsächlich besetzt sind.

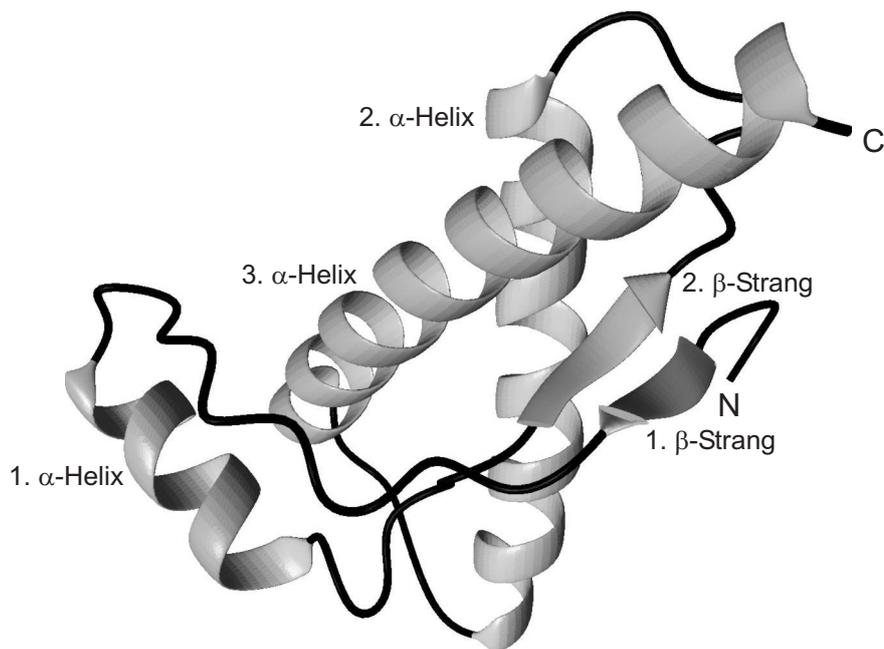


Abbildung 1.3: NMR-Struktur des Fragments 90–231 vom Prionprotein des Syrischen Hamsters (Protein-Data-Bank-Code 1B10). Dargestellt sind nur die Reste, die über eine ausgeprägte Sekundärstruktur verfügen (Aminosäuren 125–228). Am N-Terminus dieses Fragments ist der erste β -Strang lokalisiert, es schließen sich die erste α -Helix, der zweite β -Strang sowie die zweite und dritte α -Helix an. Die Abbildung wurde mit dem Programm MOLMOL erstellt (Koradi *et al.*, 1996).

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Fragment des Prionproteins des Syrischen Hamsters umfasst die Aminosäuren 90–232, die in der Sequenz unterstrichen sind (Abb. 1.2). Es wird als SHaPrP^{90–232} bezeichnet und entspricht weitgehend dem PK-resistenten Kern des PrP^{Sc}. Da es in *E. coli* exprimiert wurde, war es allerdings nicht glykosyliert und hatte auch keinen GPI-Anker.

Die Sekundärstruktur des rekombinanten SHaPrP voller Länge (Donne *et al.*, 1997) und die des rekombinanten SHaPrP^{90–231} (James *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1999) konnten mittels kernmagnetischer Resonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) bestimmt werden. Die NMR-Struktur des kürzeren Fragments wurde dabei mit höherer Auflösung bestimmt als die des SHaPrP voller Länge; es konnte jedoch kein signifikanter Einfluss des strukturell ungeordneten N-terminalen Bereichs, der bei beiden Proteinkonstrukten bis zur Aminosäure 119 reicht, auf das Proteinsegment mit geordneter Sekundärstruktur festgestellt werden. In dem Bereich geordneter Sekundärstruktur bilden die Aminosäuren 129–131 und 161–163 zwei kurze β -Stränge, die antiparallel zueinander ausgerichtet sind, und die Aminosäuren 144–154, 172–193 sowie 200–227 formen insgesamt drei α -Helices (Abb. 1.3). Die NMR-Signale

der Reste 167–175 konnten beim Hamster-Prionprotein im Gegensatz zu den NMR-Spektren der Prionproteine anderer Spezies vollständig beobachtet werden. Anhand dieser Signale konnte gezeigt werden, dass die Schleife zwischen dem zweiten β -Strang und der zweiten α -Helix gut definiert ausgebildet ist. Dass bestimmte Abschnitte des Prionproteins die inhärente Eigenschaft besitzen, große Konformationsänderungen zu vollziehen, konnte *in vitro* mittels Antikörper-Bindungsstudien an immobilisiertem rekombinantem Hamster-Prionprotein gezeigt werden (Leclerc *et al.*, 2001). Insbesondere im Bereich der Aminosäuren 109–115 können demnach signifikante strukturelle Änderungen erfolgen, wenn sich das Prionprotein an eine Oberfläche anlagert, selbst wenn die Proteinkonzentration so niedrig gewählt wird, dass Kontakte zwischen einzelnen Prionproteinmolekülen praktisch ausgeschlossen werden können (Leclerc *et al.*, 2001).

1.1.4 Das Prionprotein des Menschen

Das Prionprotein des Menschen besteht in seiner unprozessierten Vorläufer-Form aus 253 Aminosäuren und weist rund 90% Sequenzidentität mit dem Prionprotein des Syrischen Hamsters auf (Abb. 1.4).

```

1  MANLGCWMLV LFBATWSDLG LCKKRPKPGG WNTGGSRYPG QGSPGGNRYP PQGGGGWGQP
61  HGGGGWGQPHG GGWGQPHGGG WGQPHGGGGW QGGGTHSQWN KPSKPKNMK HMAGAAAAGA
121 VVGGLGGYML GSAMSRPIIH FGSYEDRYR RENMHRYPNQ VYRPMDEYS NQNNFVHDCV
181 NITIKQHTVT TTTKGENFTE TDVKMERVV EQMCITQYER ESQAYYQRGS SMVLFSSPPV
241 ILLISFLIFL IVG

```

Abbildung 1.4: Primärstruktur des Prionproteins des Menschen (Kretzschmar *et al.*, 1986, Swiss-Prot-Code P04156). Das huPrP^{91–231} umfasst die unterstrichenen Aminosäuren.

Die im nativen Prionprotein abgespaltene Signalsequenz umfasst wie beim Prionprotein des Syrischen Hamsters die Aminosäuren 1–22, allerdings ist das reife menschliche Prionprotein eine Aminosäure kürzer als das des Hamsters, da der GPI-Anker bereits am Serin-230 gebunden ist. Es umfasst also die Reste 23–230, während die Aminosäuren 231–253 im reifen Protein abgespalten sind. Die Oktapeptid-Wiederholungsregion umfasst wiederum die Aminosäuren 52–91. Das Oktapeptidmotiv ist identisch mit dem des Hamster-Prionproteins, lediglich die Sequenz des ersten Oktapeptids weicht mit QGGGGWGQ geringfügig ab. Eine Komplexierung von Cu²⁺-Ionen könnte wie beim Hamster-Prionprotein erfolgen. Die Glykosylierungsstellen finden sich wieder an den Asparaginresten 181 und 197, ebenso ist die Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen 179 und 214 ausgebildet.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete huPrP^{91–231} umfasst die in der Sequenz unterstrichenen Aminosäuren (Abb. 1.4). Auch das huPrP^{91–231} war wegen der Expression in *E. coli* weder glykosyliert noch mit einem GPI-Anker versehen.

Die Struktur des rekombinanten menschlichen Prionproteins wurde ebenfalls durch NMR-Spektroskopie ermittelt (Zahn *et al.*, 2000) und unterscheidet sich nur sehr wenig von der des Hamster-Prionproteins (vgl. Abb. 1.3). Der N-terminale Bereich ist wiederum ungeordnet und flexibel, zwei kurze β -Stränge werden von den Aminosäuren 128–131 und 161–164 gebildet und sind ebenfalls antiparallel zueinander ausgerichtet. Die drei α -Helices werden von den Aminosäuren 144–154, 173–194 und 200–228 geformt. Anders als beim Hamster-Prionprotein konnten zwischen den Strukturen des menschlichen Prionproteins voller Länge und des C-terminalen Fragments der Reste 121–230 leichte Unterschiede hinsichtlich der Stabilität der jeweiligen Enden von zweiter und dritter α -Helix beobachtet werden. Offensichtlich stabilisiert der ungeordnete N-terminale Bereich des menschlichen Prionproteins die entsprechenden α -Helices, wenngleich dieser Effekt nicht groß genug ist, um die Gesamtstruktur des Proteins beobachtbar zu verändern.

Die NMR-Signale der Reste 166–172 konnten, verglichen mit denen des Hamster-Prionproteins, weniger gut aufgelöst detektiert werden, so dass die entsprechende Schleife zwischen zweitem β -Faltblatt und zweiter α -Helix vermutlich eine höhere Flexibilität als beim Hamster-Prionprotein aufweist.

Die erste α -Helix des menschlichen Prionproteins ist etwas weiter als die des Hamster-Prionproteins aus dem Proteinkern nach außen orientiert. Dadurch ergibt sich zusammen mit der weniger rigiden Schleife zwischen dem zweiten β -Strang und der zweiten α -Helix eine leicht veränderte molekulare Oberfläche, die auf zwei sich gegenüberliegenden Seiten des Proteins zur Ausprägung kommt (vgl. Abb. 1.3). Genau diese Bereiche wurden als wichtige Stellen für die intermolekulare Wechselwirkung zwischen einzelnen Prionproteinmolekülen vorgeschlagen (Prusiner, 1998) und könnten so einen entscheidenden Einfluss auf die sog. Speziesbarriere⁴ haben. Während sich die Prionproteine von Hamster und Mensch hinsichtlich der molekularen Oberfläche verhältnismäßig deutlich unterscheiden (obwohl die Sekundärstrukturen der jeweiligen Prionproteine nahezu identisch sind), konnte nur eine sehr kleine Differenz zwischen den molekularen Oberflächen der Prionproteine von Mensch und

⁴Unter Speziesbarriere versteht man die molekulare Hürde, die bei der Infektion von einer Spezies mit PrP^{Sc} einer anderen Spezies überwunden werden muss, um die entsprechende Prionkrankheit effektiv zu übertragen. Eine hohe Speziesbarriere ist gleichbedeutend mit weitgehender „Immunität“ gegen eine Infektion mit PrP^{Sc} der entsprechenden Spezies.

Rind festgestellt werden (Wüthrich und Riek, 2001). Unter der Annahme, dass die molekulare Oberflächenstruktur des Prionproteins die vermuteten Auswirkungen auf die Speziesbarriere hat, ist die Speziesbarriere zwischen Hamster und Mensch also vergleichsweise hoch und die zwischen Mensch und Rind vergleichsweise niedrig. Dies hat wichtige Auswirkungen hinsichtlich einer möglichen BSE-Übertragung vom Rind auf den Menschen.

1.1.5 Prionkrankheiten

Die Prionkrankheiten werden, da sie übertragbar sind und mit einer schwammartigen Auflösung des Gehirns einhergehen, auch als transmissible spongiforme Enzephalopathien bezeichnet. Zu den Prionkrankheiten zählen beim Menschen die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom, die letale familiäre Schlaflosigkeit und Kuru (Hörnlimann *et al.*, 2001). Letztere Erkrankung ist nur beim Stamm der Fore in Papua-Neuguinea aufgetreten und konnte auf rituellen Kannibalismus⁵ zurückgeführt werden (Gajdusek, 1977). Prionkrankheiten können genetische Ursachen haben, durch Infektionen übertragen werden oder sporadisch auftreten. Es sind mehr als 20 Mutationen des *PRPN*-Gens bekannt, die als auslösend oder stark begünstigend für die vererbten Formen menschlicher Prionkrankheiten angesehen werden (Prusiner, 1998).

Auch bei Nerzen, Hirschen, Elchen und Katzen sind Prionkrankheiten unter verschiedenen Namen bekannt. Zu den wichtigsten Prionkrankheiten im Tierreich zählen jedoch Scrapie bei Schafen und Ziegen sowie die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) bei Rindern (Hörnlimann *et al.*, 2001). Typische Ausprägungen dieser Krankheiten sind Koordinationsstörungen der Bewegung (Ataxie), unkontrollierte Zuckungen einzelner Muskeln (Myoklonie) sowie Verstörtheit und Schreckhaftigkeit (Kimberlin und Walker, 1977).

Im Krankheitsverlauf der Prionkrankheiten lassen sich im Gehirn – wie bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen auch – eine Rückbildungen von Neuronen sowie eine Vermehrung von Astrozyten und Gliazellen (Astrozytose und Gliose) beobachten (Jeffrey *et al.*, 1995). Ferner kann es zu Neuronenfehlbildungen mit verkleinerten Dendriten und Axon-Dystrophien kommen. Eine verstärkte Bildung von Ubiquitin-Protein-Konjugaten im pathologischen Nervengewebe deutet auf eine

⁵Stammesangehörige, insbesondere Frauen und Kinder, haben sich das Gehirn von Verstorbenen u. a. ins Gesicht gerieben und auch gegessen. Über die Schleimhäute (beispielsweise der Augen) kann eine sehr effiziente Übertragung von infektiösem Prionprotein erfolgen.

erhöhte Abbaurate von Proteinen hin (Jeffrey *et al.*, 1995). Die Neuronenrückbildung, die u. a. durch Autophagozytose hervorgerufen wird, führt wie auch die Inkorporation abnormaler Membranen in Organellen zu einer Vakuolisierung der Gehirns substanz. Die Vakuolen haben einen Durchmesser von 3,0–6,5 μm und sind die Ursache für das schwammartige Erscheinungsbild eines Gehirns im Verlauf einer Prionkrankheit.⁶

Nach dem erstmaligen Nachweis von BSE in Deutschland im Herbst 2000 wurden die Bemühungen auch hierzulande intensiviert, die molekularen Ursachen der Prionkrankheiten besser zu verstehen und damit möglicherweise auch den Zusammenhang zwischen BSE und einer varianten Form der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD), die vorwiegend bei jungen Patienten aufgetreten ist, belegen zu können. Den aktuell rund 188 000 BSE-Fällen⁷ weltweit stehen zwar nur ca. 160 Fälle von vCJD⁸ gegenüber, doch lassen sich hinsichtlich Verbreitung und Erregerstamm-Typisierung zahlreiche Parallelen zwischen beiden Erkrankungen ziehen, die auf eine enge Verbindung hindeuten, so dass man aktuell davon ausgeht, dass die vCJD durch den Verzehr von hochinfektiösem Gewebe BSE-infizierter Rinder verursacht wird (Hörnlimann *et al.*, 2001). Besonders auffällig ist, dass fast alle vCJD-Fälle (über 150) in Großbritannien auftraten, wo auch die mit Abstand meisten BSE-Fälle (fast 183 000) registriert wurden.

1.2 Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie

1.2.1 Physikalische Grundlagen

1.2.1.1 Allgemeines

Die Infrarotspektroskopie beruht auf der Anregung von Molekülschwingungen mittels elektromagnetischer Strahlung mit einer Wellenlänge von 800 nm bis 1 mm. Die gängige Einheit für die Charakterisierung der Strahlung, die bei der Infrarotspektroskopie verwendet wird, ist die Wellenzahl $\tilde{\nu}$, die sich mit $\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda}$ als Reziprokes der Wellenlänge λ errechnet und deren Einheit reziproke Zentimeter (cm^{-1}) sind.

⁶Wie aus der Größe der Vakuolen abgeleitet werden kann, erscheint ein Gehirn auch bei fortgeschrittener Prionkrankheit makroskopisch noch intakt, während die schwammartige Auflösung nur mikroskopisch beobachtet werden kann.

⁷<http://home.hetnet.nl/~mad.cow>; Stand Juni 2005.

⁸http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/cjd/cjd_fact_sheet.htm und <http://www.cjd.ed.ac.uk/figures.htm>; Stand Juni 2005.

Sie ist unter Berücksichtigung der Lichtgeschwindigkeit c mit $\nu = \frac{c}{\lambda}$ und folglich $\tilde{\nu} = \frac{\nu}{c}$ direkt zur Frequenz ν und damit zur Energie der verwendeten Strahlung proportional.

Man unterscheidet in nahes, fernes und mittleres Infrarot, wobei diese Bezeichnungen mit Bezug auf den sichtbaren Bereich der elektromagnetischen Strahlung gewählt wurden. Das nahe Infrarot schließt sich mit einem Wellenlängenbereich von $\lambda = 800 \text{ nm}$ bis $2,5 \mu\text{m}$ ($\tilde{\nu} = 12\,500\text{--}4\,000 \text{ cm}^{-1}$) unmittelbar an den sichtbaren Bereich an, das mittlere Infrarot folgt mit Wellenlängen von $\lambda = 2,5$ bis $50 \mu\text{m}$ ($\tilde{\nu} = 4\,000\text{--}200 \text{ cm}^{-1}$) und das ferne Infrarot schließlich mit Wellenlängen von $\lambda = 50 \mu\text{m}$ bis 1 mm ($\tilde{\nu} = 200\text{--}10 \text{ cm}^{-1}$). Üblicherweise wird das mittlere Infrarot für spektroskopische Zwecke an Biomolekülen verwendet, da in diesem Bereich die molekularen Grund- bzw. Normalschwingungen beobachtet werden.

Molekülschwingungen kann man in erster Näherung mit Hilfe der klassischen Mechanik beschreiben, wenn man sich die beiden kovalent miteinander verbundenen Atome eines zweiatomigen Moleküls als kugelförmige Körper mit definierter, punktförmiger Masse vorstellt und die Bindung zwischen ihnen als eine Feder betrachtet. Als Näherung der tatsächlichen Gegebenheiten in einem Molekül und zur Verdeutlichung dieses Modells soll zunächst der harmonische Oszillator erläutert werden.

1.2.1.2 Harmonischer Oszillator

Auf die Massen m_1 und m_2 wirkt immer dann eine rücktreibende Kraft $F_{\text{rück}}$, wenn die Massen aus ihrer Ruhelage r_0 gebracht werden, die sich aus dem Gleichgewichtsabstand beider Massen ergibt. Gemäß dem Hook'schen Gesetz

$$F_{\text{rück}} = -k \cdot x \quad (1.1)$$

ist diese Kraft proportional zur Auslenkung $x = \Delta r = r - r_0$. k bezeichnet dabei die Federkonstante. Da die Kraft als Produkt aus Masse und Beschleunigung definiert ist, kann die Beschleunigung, die auf die ausgelenkte Masse m wirkt, als

$$\frac{d^2x}{dt^2} = \frac{F_{\text{rück}}}{m} = \frac{-k \cdot x}{m} \quad (1.2)$$

ausgedrückt werden.

Die potenzielle Energie des harmonischen Oszillators ändert sich mit der auf das System wirkenden Kraft:

$$dE_{pot} = -F_{rück} dx = k \cdot x dx. \quad (1.3)$$

Durch Integration

$$\int_0^E dE_{pot} = k \int_0^x x dx \quad (1.4)$$

erhält man die potenzielle Energie des harmonischen Oszillators

$$E_{pot} = \frac{1}{2}k \cdot x^2. \quad (1.5)$$

Harmonische Schwingungen der Masse m genügen der Schwingungsdifferentialgleichung

$$\frac{d^2x}{dt^2} = -\omega_0^2 \cdot x \quad (1.6)$$

und lassen sich somit als periodische Veränderung der Auslenkung x mit der Zeit t durch eine Cosinusfunktion beschreiben:

$$x = x_0 \cdot \cos(\omega_0 t). \quad (1.7)$$

x_0 bezeichnet dabei als Maximalwert von x die Amplitude und ω_0 die Kreiseigenfrequenz. Aus den Gln. 1.2 und 1.6 folgt

$$-\omega_0^2 \cdot x = \frac{-k \cdot x}{m} \quad \text{und damit} \quad \omega_0^2 = \frac{k}{m}. \quad (1.8)$$

Unter Berücksichtigung der Schwingungsdauer T und der Frequenz ν gilt:

$$\omega = \frac{2\pi}{T} = 2\pi\nu. \quad (1.9)$$

Substituiert man nun die Masse m durch die reduzierte Masse μ mit

$$\mu = \frac{m_1 \cdot m_2}{m_1 + m_2}, \quad (1.10)$$

lässt sich die Eigenfrequenz ν_0 eines harmonischen Oszillators aus den Gln. 1.8 und 1.9 leicht berechnen:

$$\nu_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}. \quad (1.11)$$

Die Federkonstante k entspricht hierbei in einem Molekül der Bindungsstärke.

Allerdings lassen sich mit dem mechanischen Modell die tatsächlichen Schwingungen von miteinander verbundenen Atomen nur unzureichend beschreiben. Durch Lösen der Schrödinger-Gleichung für dieses Modell gelangt man jedoch zur quantenmechanischen Betrachtung, mit der sich die Energie des harmonischen Oszillators als

$$E_n = h \cdot \nu_0 \left(n + \frac{1}{2} \right) \quad (1.12)$$

beschreiben lässt. h ist die Planck'sche Konstante, n die Schwingungsquantenzahl und ν_0 die Eigenfrequenz des Oszillators. Die Schwingungsquantenzahl kann nur die Werte ganzer positiver Zahlen und 0 annehmen ($n = 0, 1, 2, 3, \dots$).

Aus den Gln. 1.11 und 1.12 folgt, dass die Gesamtenergie des harmonischen Oszillators nur äquidistante, diskrete Werte annehmen kann. Übergänge von einem Energieniveau in ein anderes sind beim Modell des harmonischen Oszillators stets nur zwischen benachbarten Niveaus möglich (Auswahlregel $\Delta n = \pm 1$). Die Potenzialkurve des harmonischen Oszillators (Abb. 1.5a) verdeutlicht diese Eigenschaften und Bedingungen.

Überträgt man die Modellvorstellung des harmonischen Oszillators auf ein Molekül, bedeutet das, dass eingestrahktes Licht nur dann absorbiert werden kann, wenn die Energie des einfallenden Lichtquants $h\nu_0$ genauso groß ist wie die Energiedifferenz zweier benachbarter Schwingungszustände des Moleküls. Zwar sind beliebig viele Schwingungszustände denkbar, doch kann von einem bestimmten Schwingungszustand stets nur der unmittelbar benachbarte Zustand (Grundschiwingung) angeregt werden.

1.2.1.3 Anharmonischer Oszillator

Die tatsächlichen Bedingungen in einem Molekül beschreibt das Modell des anharmonischen Oszillators weitaus besser. Dessen Gesamtenergie kann in Näherung

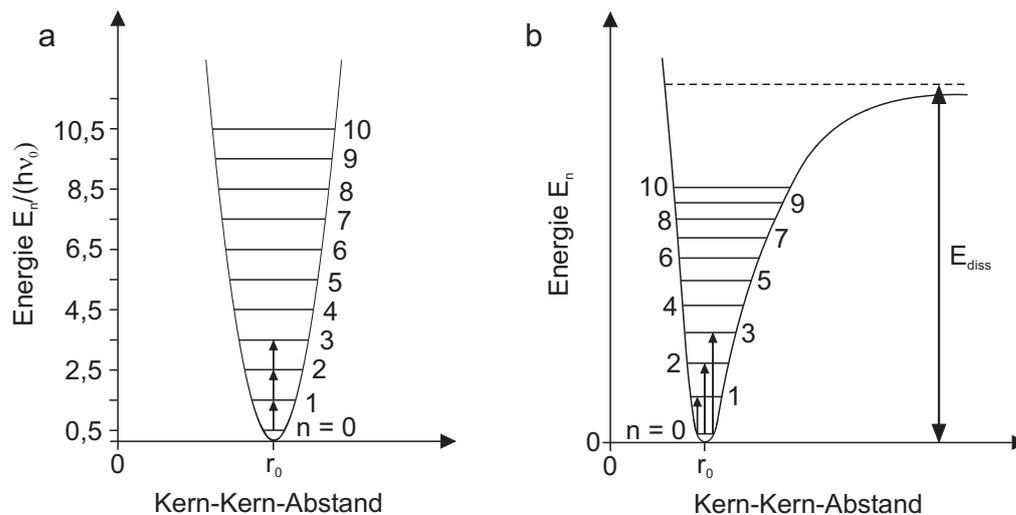


Abbildung 1.5: Potenzialkurve des harmonischen (a) und anharmonischen (b) Oszillators. Ein Teil der möglichen Schwingungsübergänge ist durch Pfeile gekennzeichnet. Bei Raumtemperatur befinden sich die meisten Moleküle im Grundzustand $n = 0$, von dem aus dann praktisch alle Übergänge erfolgen.

als die um einen Anharmonizitätsterm erweiterte Gesamtenergie des harmonischen Oszillators (Gl. 1.12) beschrieben werden:

$$E_n = h \cdot \nu_0 \left(n + \frac{1}{2} \right) - x_e \cdot h \cdot \nu_0 \left(n + \frac{1}{2} \right)^2. \quad (1.13)$$

x_e bezeichnet hierbei die Anharmonizitätskonstante. In der resultierenden Potenzialkurve (Morse-Potenzial) sind die Energieniveaus nicht mehr äquidistant verteilt. Ferner ist der Übergang nicht nur in ein benachbartes, sondern auch in ein weiter entfernt liegendes Energieniveau möglich (Abb. 1.5b). Das bedeutet, dass aus dem Grundzustand E_0 sowohl die Grundschiwingung mit E_1 als auch Obertonschwingungen mit $E_{\geq 2}$ angeregt werden können ($\Delta n = \pm 1, \pm 2, \pm 3 \dots$). Allerdings nimmt die Wahrscheinlichkeit von Schwingungsübergängen mit wachsendem n stark ab, so dass die relativen Intensitäten von Obertönen stets viel niedriger sind als die von Grundschiwingungen.

Das Modell des anharmonischen Oszillators berücksichtigt auch, dass ein Molekül dissoziieren kann (der Abstand zwischen zwei Atomen also gegen ∞ geht), wenn man ihm Energie in Höhe seiner Dissoziationsenergie E_{diss} zuführt.

Bei Raumtemperatur sind die meisten Molekülschwingungen allerdings in ihrem Grundzustand $n = 0$. In diesem Bereich kann die Potenzialkurve des anharmoni-

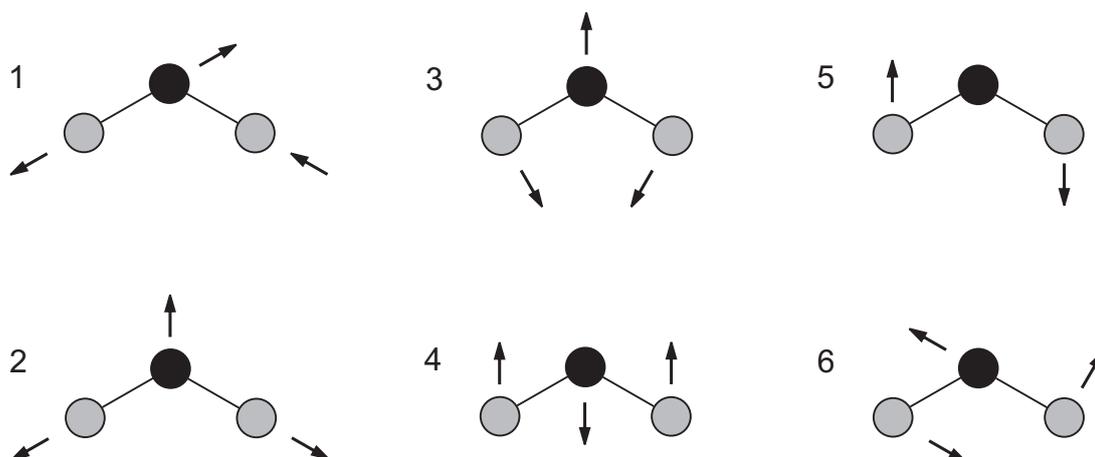


Abbildung 1.6: Übersicht über die verschiedenen Schwingungstypen am Beispiel einer isolierten CH_2 -Gruppe aus einer Kohlenwasserstoffkette. Valenzschwingungen (ν) sind in Darstellung 1 und 2 zu sehen, Deformationsschwingungen (δ) in den Darstellungen 3–6. 1: antisymmetrische Streck- und Biegeschwingung (ν_{as}), 2: symmetrische Streck- und Biegeschwingung (ν_s), 3: Biegeschwingung (engl.: *bending*, wird als „klassische“ Deformationsschwingung i. d. R. mit δ bezeichnet), 4: Kippschwingung (engl.: *wagging*, w), 5: Torsionsschwingung (engl.: *twisting*, τ), 6: Pendelschwingung (engl.: *rocking*, r). Nach Winter (1998).

schen Oszillators näherungsweise gut mit der des harmonischen Oszillators beschrieben werden.

1.2.1.4 Molekülschwingungen

Um die möglichen Eigenschwingungen (Normalschwingungen) eines Moleküls zu berechnen, muss man die Anzahl N der Atome und die Geometrie des Moleküls berücksichtigen. Ein N -atomiges Molekül besitzt $3N$ Freiheitsgrade der Bewegung. 3 Freiheitsgrade davon entfallen auf Translationsbewegungen (in x-, y- und z-Richtung). Gewinkelte Moleküle haben 3 Freiheitsgrade der Rotation, lineare Moleküle nur 2. Für Molekülschwingungen bleiben folglich bei gewinkelten Molekülen $3N - 6$ und bei linearen Molekülen $3N - 5$ Freiheitsgrade übrig.

Schwingungen in Richtung der Bindungsachse werden als Valenz- oder Streck- und Biegeschwingung bezeichnet und solche, bei denen der Bindungswinkel geändert wird, als Deformationsschwingungen (Abb. 1.6).

Ein n -atomiges Molekül hat genau $N - 1$ Bindungen. Somit sind $N - 1$ Valenz- und Biegeschwingungen möglich. In gewinkelten Molekülen können dann noch $(3N - 6) - (N - 1) = 2N - 5$ und in linearen Molekülen folglich $2N - 4$ Deformationsschwingungen auftreten.

Im Allgemeinen weisen Valenzschwingungen eine höhere Kraftkonstante k der anzuregenden Bindung auf und besitzen somit nach Gl. 1.11 eine höhere Eigenfrequenz als Deformationsschwingungen. Sie können im Infrarotspektrum daher – für identische Bindungen – bei höheren Wellenzahlen als Deformationsschwingungen beobachtet werden. Aus Gl. 1.11 folgt allgemein, dass die Eigenfrequenz einer Molekülschwingung umso größer ist, je höher die Bindungsstärke k und je niedriger die reduzierte Masse μ (siehe Gl. 1.10) der an der Bindung beteiligten Atome ist. Das hat wichtige Implikationen für die Infrarotspektroskopie, da durch den Einsatz von Isotopen die Eigenfrequenz und damit die resultierende Absorption bestimmter Bindungsschwingungen beeinflusst werden kann.

Im Infrarotspektrum können allerdings nur diejenigen Schwingungen beobachtet werden, bei denen sich das elektrische Dipolmoment während der Schwingung ändert. Je größer die Änderung des Dipolmoments ist, desto größer ist auch die IR-Absorption der entsprechenden Schwingung. Dabei ist die Änderung des Dipolmoments umso größer, je größer die Partialladungen der an der Bindung beteiligten Atome sind. Das bedeutet, dass die IR-Absorption umso stärker ist, je ausgeprägter die Bindungspolarität ist. So rufen C=O-Schwingungen sehr starke IR-Absorptionen hervor, während C=C-Schwingungen mit asymmetrisch substituierten Kohlenstoffatomen nur schwache IR-Absorptionen verursachen. Keine Änderung des Dipolmoments (und damit auch keine IR-Absorption) tritt beispielsweise bei C=C-Schwingungen mit symmetrisch substituierten Kohlenstoffatomen und bei symmetrischen Streckerschwingungen von weiteren linearen, symmetrischen Molekülen (wie z. B. CO₂) auf. Auch die Schwingung von Molekülen, die aus zwei identischen Atomen bestehen (z. B. O₂), führt zu keiner Änderung des Dipolmoments und kann daher nicht im Infrarotspektrum beobachtet werden.

Da sich bei symmetrischen Molekülen durch Schwingungen i. d. R. die Polarisierbarkeit des Moleküls ändert, lassen sich solche Schwingungen aber gut mittels Raman-Spektroskopie beobachten.

1.2.2 Messprinzip und Datenprozessierung

Die Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR-Spektroskopie) ist eine Weiterentwicklung der klassischen Infrarotspektroskopie. Die in beiden Fällen verwendeten Messgrößen sind die Transmission T und, daraus abgeleitet, die Absorption A . Die Transmission ist der Quotient aus der Lichtintensität der Probenmessung I und der Lichtintensität der Referenzmessung I_0 , während sich die Absorption aus

dem negativen dekadischen Logarithmus der Transmission errechnet und nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz

$$A = -\log T = -\log \frac{I}{I_0} = \epsilon \cdot c \cdot d \quad (1.14)$$

abhängig vom Extinktionskoeffizienten ϵ , der Konzentration c und der Schichtdicke d der Probe ist.

Während bei der klassischen Infrarotspektroskopie die Absorption einer Probe bei einzelnen Wellenlängen nacheinander bestimmt wird, wird bei der FTIR-Spektroskopie der gesamte gewünschte Wellenlängenbereich auf einmal erfasst. Dies wird durch die Verwendung eines Interferometers, des Kernstücks eines FTIR-Spektrometers, gewährleistet. Seine Funktionsweise soll am Beispiel des Michelson-Interferometers kurz dargestellt werden (Abb. 1.7).

Das Michelson-Interferometer Licht aus einer IR-Quelle trifft auf einen halbdurchlässigen Strahlteiler, der 50 % des einfallenden Lichts zu einem beweglichen Spiegel passieren lässt und 50 % zu einem im rechten Winkel angeordneten festen Spiegel reflektiert. Von beiden Spiegeln werden die getrennten IR-Strahlen wieder zum Strahlteiler reflektiert und überlagern sich dort. Je nach Spiegelauslenkung x ändert sich die optische Wegdifferenz δ beider Lichtstrahlen mit $\delta = 2 \cdot x$. So kann es bei der Überlagerung beider Lichtstrahlen zu einer konstruktiven Interferenz ($\delta = n \cdot \lambda$ mit $n = 0, 1, 2, 3, \dots$) oder zu einer destruktiven Interferenz ($\delta = m \cdot \lambda$ mit $m \neq n$) kommen. Entspricht δ gerade dem Halben der Wellenlänge λ , kommt es zu einer Totalauslöschung des Lichts. 50 % des eingestrahnten (und von den Spiegeln reflektierten) Lichts gelangen vom Strahlteiler wieder zurück zur IR-Quelle, während 50 % auf die Probe fokussiert werden, diese durchstrahlen und anschließend auf den Detektor treffen. Dort wird ein Signal, dessen Intensität F von der Auslenkung x des beweglichen Spiegels abhängig ist, detektiert. Diese Funktion $F(x)$ wird als Interferogramm bezeichnet und kann durch folgende Formel beschrieben werden:

$$F(x) = \int_0^{\infty} I(\tilde{\nu}) \cdot \cos(2 \cdot \pi \cdot \tilde{\nu} \cdot x) d\tilde{\nu}. \quad (1.15)$$

Fourier-Transformation Die Überführung dieser Funktion aus dem Ortsraum in den Frequenzraum wird als Fourier-Transformation bezeichnet und liefert als

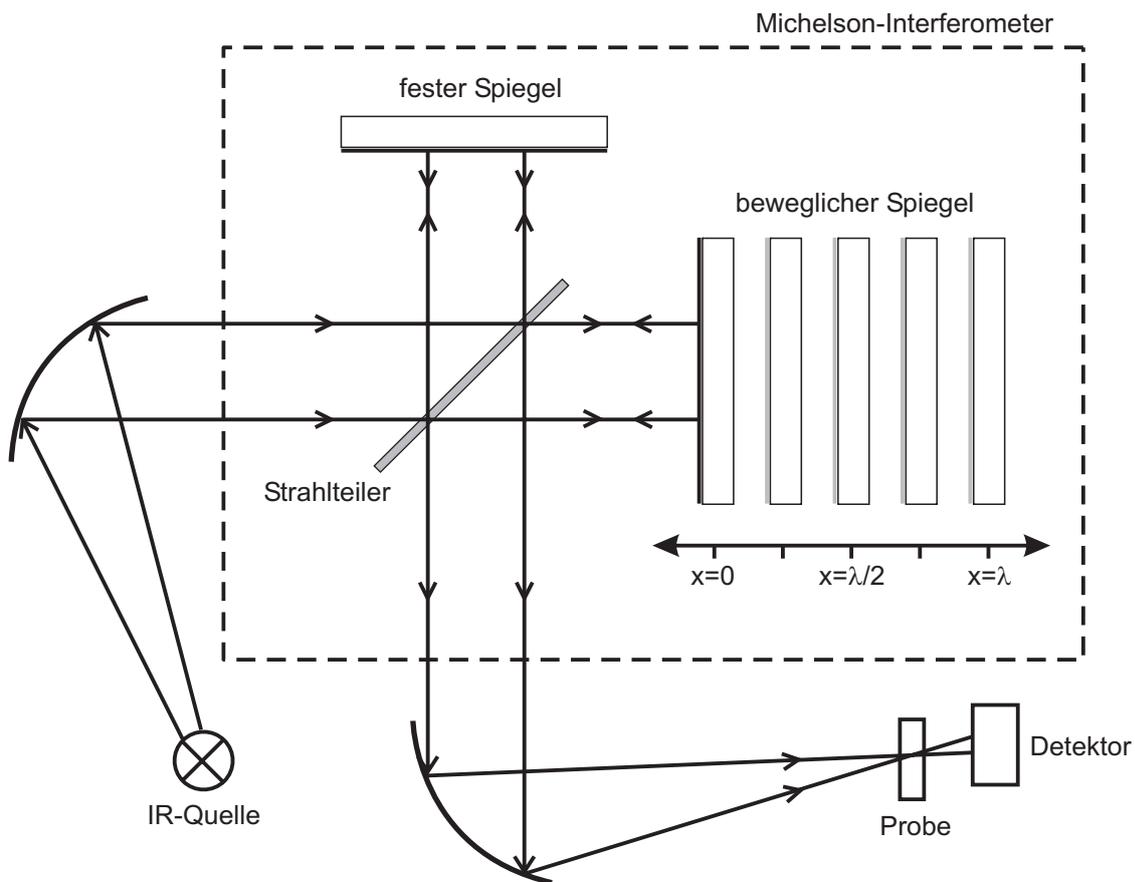


Abbildung 1.7: Schema eines FTIR-Spektrometers mit Michelson-Interferometer. Die gestrichelt dargestellte Box repräsentiert das Interferometer mit Strahlteiler, festem und beweglichem Spiegel.

Resultat die Intensität in Abhängigkeit der Wellenzahl, die der Frequenz proportional ist (vgl. Abschnitt 1.2.1.1):

$$I(\tilde{\nu}) = 2 \int_0^{\infty} F(x) \cdot \cos(2 \cdot \pi \cdot \tilde{\nu} \cdot x) dx. \quad (1.16)$$

Diese Funktion $I(\tilde{\nu})$ repräsentiert das resultierende Spektrum. Durch separate Aufnahme von Spektren für Probe und Hintergrund bzw. Puffer (als sog. Einkanalspektren) und anschließende Verrechnung der jeweiligen Intensitäten nach Gl. 1.14 erhält man das resultierende Absorptionsspektrum. Diese Vorgehensweise ist in Abb. 1.8 illustriert.

Der HeNe-Laser Aus den Gln. 1.15 und 1.16 wird ersichtlich, dass die exakte Bestimmung der Spiegelauslenkung von entscheidender Bedeutung für die Berechnung

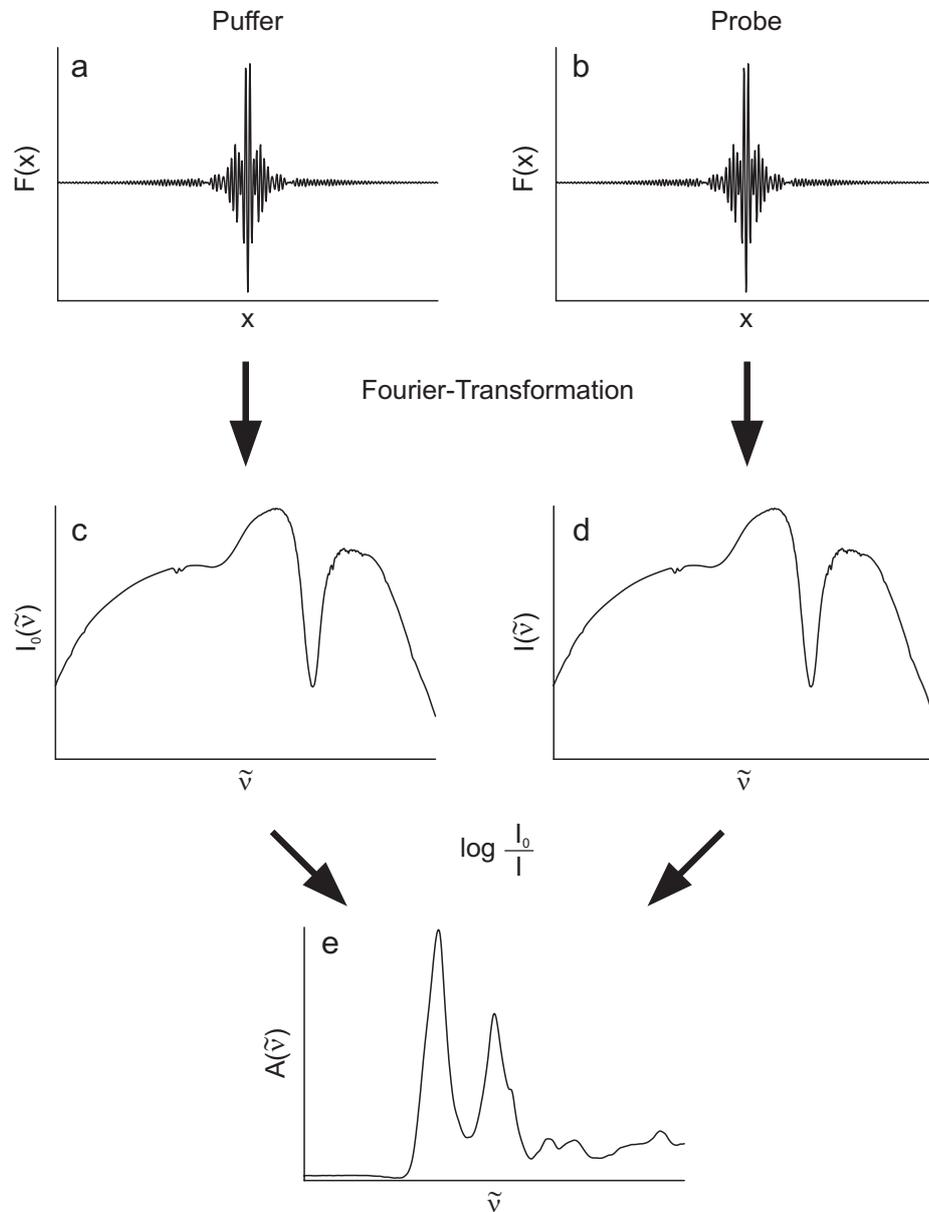


Abbildung 1.8: Datengewinnung bei der FTIR-Spektroskopie. Aus den Interferogrammen von Puffer (a) und Probe (b), die die Intensitäten F als Funktion der Spiegelauslenkung x wiedergeben, werden durch Fourier-Transformation zwei Einkanalspektren (c und d), die die Intensität I_0 bzw. I als Funktion der Wellenzahl $\tilde{\nu}$ widerspiegeln. Verrechnet man die Einkanalspektren c und d gemäß Gl. 1.14 miteinander, erhält man das resultierende Absorptionsspektrum mit der Absorption A als Funktion der Wellenzahl $\tilde{\nu}$ (e).

eines FTIR-Spektrums ist. Da eine mechanische Bestimmung der Spiegelposition nicht verlässlich möglich ist, wird ein HeNe-Laser in den IR-Strahlengang eingekoppelt, aus dessen Interferenzmuster, das durch Laserdioden detektiert wird, stets die exakte Spiegelposition bestimmt werden kann. Das vom HeNe-Laser emittierte Licht hat eine Wellenlänge von $\lambda = 633 \text{ nm}$, was einer Wellenzahl von $\tilde{\nu} \approx 15\,800 \text{ cm}^{-1}$ entspricht. Bei einer konstanten Spiegelbewegung wird das Licht des Lasers mit einem zeitlich cosinusförmigen Verlauf moduliert.⁹ Die Modulationsfrequenz $f_{mod}(\tilde{\nu})$ berechnet sich nach

$$f_{mod}(\tilde{\nu}) = \frac{1}{t_{mod}(\tilde{\nu})} = \frac{v}{x(\tilde{\nu})} = \frac{v}{\lambda/2} = 2 \cdot v \cdot \tilde{\nu} \quad (1.17)$$

mit der Spiegelgeschwindigkeit v und dem Weg $x(\tilde{\nu}) = \frac{\lambda}{2}$, den der Spiegel zurücklegen muss, damit die optische Wegdifferenz δ der Wellenlänge λ des eingestrahnten Lichts entspricht. Die Spiegelgeschwindigkeit wird i. d. R. als Modulationsfrequenz des Laserinterferogramms angegeben. So entspricht einer „Spiegelgeschwindigkeit“ von 200 kHz nach Gl. 1.17 eine tatsächliche Geschwindigkeit des Spiegels von rund $6,3 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$.

Lichtquelle und Detektor Als Lichtquelle im mittleren Infrarot wird im Allgemeinen ein Stab aus Siliciumcarbid, ein so genannter Globalar, verwendet, der durch Anlegen einer Spannung zum Glühen gebracht wird. Zur Detektion der IR-Strahlung kommen u. a. DTGS-Detektoren (aus deuteriertem Triglycinsulfat) oder MCT-Detektoren (aus Quecksilber, Cadmium und Tellur; engl.: *mercury*, *cadmium*, *telluride*) zum Einsatz. Das ferroelektrische DTGS-Element erfährt durch auftreffendes IR-Licht eine temperaturabhängige Änderung der elektrischen Polarisation und kann bei Raumtemperatur verwendet werden. MCT-Detektoren sind hingegen Photoelemente, bei denen die Leitfähigkeit des Halbleitermaterials durch auftreffendes IR-Licht verändert wird. Sie müssen mit flüssigem Stickstoff gekühlt werden, sind aber deutlich empfindlicher als DTGS-Detektoren und haben außerdem eine höhere Ansprechgeschwindigkeit als diese. Für Messungen bei hoher Modulationsfrequenz des IR-Lichts (dazu zählen alle zeitaufgelösten Messungen) eignen sich daher nur MCT-Detektoren. Gegenüber DTGS-Detektoren haben sie allerdings den Nachteil, dass sie bei sehr niedrigen Absorptionen und bei Absorptionen von mehr

⁹Das eingestrahlte IR-Licht wird selbstverständlich auch moduliert. Da es sich allerdings um polychromatisches Licht handelt, ist das resultierende Interferogramm eine Überlagerung aller modulierten Frequenzen und kann nicht mehr mit einer einzigen Cosinusfunktion beschrieben werden.

als 1 AU das Signal nicht linear detektieren. Während man diese Nichtlinearität bei niedrigen Absorptionen korrigieren kann, sind spektrale Bereiche, in denen eine Probe eine höhere Absorption als 1 AU aufweist, mit einem MCT-Detektor nicht mehr quantitativ untersuchbar.

Datenprozessierung Tatsächlich wird zur Berechnung eines Spektrums aus einem Interferogramm nicht die in Gl. 1.16 angegebene kontinuierliche Fourier-Transformation verwendet, sondern – aufgrund der digitalen Datenaufnahme – deren diskrete Variante, die sehr gut an die kontinuierliche Form angenähert ist, wenn die Dichte der Datenpunkte ausreichend hoch ist. Dennoch können insbesondere solche Intensitätsinformationen im Interferogramm, aus denen durch Fourier-Transformation Banden sehr kleiner Halbwertsbreite entstehen, genau zwischen zwei Datenpunkten liegen, wodurch ein fehlerhafter Intensitätsverlust dieser Banden im Spektrum auftreten würde. Durch das Anfügen von Nullen an die Enden des Interferogramms (engl.: *zero filling*) werden zusätzliche Datenpunkte erzeugt. Damit werden der apparente Spiegelweg und die Datenpunktauflösung des Spektrums erhöht.

Die spektrale Auflösung $\Delta\tilde{\nu}$ eines FTIR-Spektrums ist abhängig von der maximalen Auslenkung x_{max} des beweglichen Interferometerspiegels:

$$\Delta\tilde{\nu} = \frac{1}{x_{max}}. \quad (1.18)$$

Da die tatsächliche Spiegelauslenkung nur endlich groß ist, wird das Interferogramm am Ende des Spiegelwegs praktisch abgeschnitten, obwohl die Restintensität noch größer als null ist. Das führt dazu, dass an den Enden des Interferogramms, an denen das *zero filling* ansetzt, ein kleiner Absatz entsteht. Das hat im Fourier-transformierten Spektrum Banden zur Folge, deren Flanken nicht sanft, sondern mit einer gedämpften Oszillation abklingen. Diese artifiziellen Nebenbanden (engl.: *side lobes*) enthalten einen Teil der spektralen Intensität der Hauptbande und verfälschen damit das Spektrum. Durch Multiplikation des Interferogramms nach erfolgtem *zero filling* mit einer Apodisierungsfunktion erhält man ein geglättetes Interferogramm, das an seinen Enden gegen null konvergiert. Es liefert nach Fourier-Transformation ein geglättetes Spektrum mit Banden ohne *side lobes*. Allerdings wird die spektrale Auflösung mit steigender Glättung des Interferogramms vermindert, so dass stets

ein geeigneter Kompromiss zwischen gewünschter Glättung des Interferogramms und benötigter Auflösung des Spektrums gefunden werden muss.

Infrarotspektren von Proteinen und anderen biologischen Makromolekülen weisen aufgrund der Überlagerung einer Vielzahl von Absorptionsbanden häufig eine recht breite Kontur auf, die zur Evaluierung der Spektren nicht geeignet ist. Eine gängige und einfach durchzuführende Methode der Bandenschärfung ist die Berechnung der zweiten Ableitung eines Absorptionsspektrums. Durch diese Operation werden Banden mit geringer Halbwertsbreite verstärkt, während sehr breite Banden (die beispielsweise durch eine instabile Basislinie entstehen können) eliminiert werden. Man erhält so eine sehr gut aufgelöste Feinstruktur eines Spektrums, die für qualitative Aussagen hervorragend geeignet ist. Da die Bandenintensitäten in einer zweiten Ableitung jedoch stärker von den Halbwertsbreiten der entsprechenden Banden im Absorptionsspektrum als von deren Intensitäten abhängen, sind quantitative Aussagen nur eingeschränkt möglich.

Vergleich mit konventioneller Infrarotspektroskopie Gegenüber der klassischen Infrarotspektroskopie besitzt die FTIR-Spektroskopie entscheidende Vorteile:

- Durch die Verwendung einer polychromatischen Lichtquelle und den Verzicht auf Prismen und Spaltmonochromatoren (die in der konventionellen Infrarotspektroskopie eingesetzt werden müssen) ist der Energiedurchsatz bei der FTIR-Spektroskopie sehr hoch, woraus ein deutlich verbessertes Signal/Rauschen-Verhältnis resultiert (Jaquinot-Vorteil).
- Durch die exakte Bestimmung der Spiegelposition mittels eines HeNe-Lasers (s. o.) kann die Wellenzahl mit einer Präzision von 0,01 bis 0,001 cm^{-1} bestimmt werden (Connes-Vorteil).
- Der Zeitbedarf für die Aufnahme eines Spektrums ist durch die simultane Detektion aller Wellenlängen im gewünschten Bereich um ein Vielfaches niedriger als bei der klassischen Infrarotspektroskopie (Multiplex- oder Fellgett-Vorteil). Durch diesen geringen Zeitbedarf sind zeitaufgelöste Messungen möglich.

1.2.3 Infrarotspektroskopie an Proteinen

Die Konformation eines Proteins wird durch die Bindungswinkel ϕ und ψ der Peptidbindungen seines Rückgrats (siehe Abschnitt 1.1.2) und die daraus resultierenden

Tabelle 1.1: Übersicht über die durch die Peptidbindung verursachten Banden von Proteinen im Infrarotspektrum nach Bandekar (1992); Arrondo *et al.* (1993)

Amidbande	Lage/cm ⁻¹	Art der Schwingung ^a ; Anteil an der Amidbande ^b
A	3 300	100 % $\nu(\text{N-H})^c$
B	3 100	100 % $\nu(\text{N-H})^c$
I	1 650	80 % $\nu(\text{C=O})$, < 10 % $\delta_i(\text{N-H})$, < 10 % $\nu(\text{C-N})$, < 10 % $\delta(\text{C-C-N})$
II	1 550	50 % $\delta_i(\text{N-H})$, 30 % $\nu(\text{C-N})$, < 10 % $\delta_i(\text{C=O})$, < 10 % $\nu(\text{C-C})$, < 10 % $\nu(\text{N-C})$
III	1 300	40 % $\nu(\text{C-N})$, 30 % $\delta_i(\text{N-H})$, 20 % $\nu(\text{C-C})$, 10 % $\delta_i(\text{C=O})$
IV	625	40 % $\delta_a(\text{C=O})$, 30 % $\nu(\text{C-C})$, 10 % $\delta(\text{C-N-C})$
V	725	70 % $\tau(\text{C-N})$, 30 % $\delta_a(\text{N-H})$
VI	600	85 % $\delta_a(\text{C=O})$, 10 % $\tau(\text{C-N})$
VII	200	65 % $\delta_a(\text{N-H})$, 15 % $\tau(\text{C-N})$, 10 % $\delta_a(\text{C=O})$

^aAbkürzungen: (ν) Streckschwingung, (δ_i) Deformationsschwingung in der Ebene der Amidbindung, (δ_a) Deformationsschwingung aus der Ebene der Amidbindung heraus und (τ) Torsionsschwingung; vgl. Abb. 1.6.

^bDie angegebenen Anteile basieren auf Untersuchungen von N-Methylacetamid und sind für Proteine lediglich Näherungswerte, die je nach der Struktur des Proteinrückgrats schwanken können.

^cIn Fermi-Resonanz mit dem 1. Oberton der Amid-II-Schwingung.

möglichen Wasserstoffbrückenbindungen und anderen stabilisierenden Faktoren bestimmt. Zur schwingungsspektroskopischen Untersuchung der Sekundärstruktur von Proteinen sind daher die Absorptionen der Peptidbindungen die wichtigsten Informationsträger. Sie werden als Amidbanden¹⁰ bezeichnet. Die ungefähre spektrale Lage der Amidbanden ist in Tab. 1.1 zusammengefasst. Da eine Vielzahl von Einzelschwingungen mit distinkter Mikroumgebung für die Absorption in einem bestimmten Amidbereich verantwortlich ist, variieren die genaue Lage, die Halbwertsbreite und die Einzelkomponenten der jeweiligen Amidbanden je nach Untersuchungsobjekt.¹¹

¹⁰Chemisch betrachtet ist das durch die Peptidbindungen verknüpfte Proteinrückgrat ein Polyamid.

¹¹Auf dieser Variabilität beruht ja überhaupt die Möglichkeit der spektroskopischen Charakterisierung von Proteinen und anderen Molekülen.

Die Amid-A- und die Amid-B-Bande können für die quantitative Bestimmung des Austauschs von Protonen gegen Deuteronen (H/D-Austausch) in einem Protein verwendet werden. Eine Aufspaltung der N–H-Streckschwingungsabsorption in eine Banden-Dublette (Amid-A und Amid-B) kommt aufgrund von Wechselwirkungen mit dem ersten Oberton der N–H-Deformationsschwingung aus dem Amid-II-Bereich zustande, die als Fermi-Resonanz bezeichnet werden. Ohne Fermi-Resonanz würde man nur eine Bande beobachten, deren spektrale Position in etwa zwischen der Amid-A- und der Amid-B-Bande läge.

Während die Amid-I- und Amid-II-Bande wichtige Informationen über die Sekundärstruktur eines Proteins liefern (s. u.), werden die Amid-III- bis Amid-VII-Bande für diese Zwecke kaum verwendet, da sie gegenüber Änderungen in der Sekundärstruktur eines Proteins nur wenig sensitiv sind und teilweise sehr breite Konturen haben, die eine Auflösung in unterschiedliche Bestandteile zusätzlich erschweren. Um die niederfrequenten Amidbanden untersuchen zu können, muss bei der Wahl des Materials für Küvettenfenster beachtet werden, dass standardmäßig eingesetztes Calciumfluorid unterhalb von 900 bis 1 000 cm^{-1} für IR-Licht undurchlässig ist und die Amid-IV- bis Amid-VII-Bande daher nicht beobachtet werden können. Andere Materialien (z. B. Silberhalogenide oder Polyethen) sind hingegen auch oder nur in diesem Bereich IR-durchlässig.

1.2.3.1 Messungen in wässriger Lösung

Um nativ gefaltete Proteine strukturell mittels Infrarotspektroskopie zu charakterisieren, bietet sich eine Messung in wässriger Lösung an. Allerdings ist der Amid-I-Bereich in H_2O -Lösungen nicht frei zugänglich, sondern wird von der O–H-Deformationsschwingung, die eine äußerst intensive IR-Absorption bei rund 1 645 cm^{-1} aufweist, überlagert. Um diese Wasserabsorption kompensieren zu können, müssen die Schichtdicken der Küvetten von Proben- und Referenzmessung sehr gut übereinstimmen. Im Idealfall verwendet man für beide Messungen dieselbe Küvette. Um noch in dem Bereich zu messen, in dem der Detektor linear arbeitet, ist es zudem erforderlich, insgesamt Küvetten geringer Schichtdicken ($< 12 \mu\text{m}$) zu verwenden. Küvetten mit einer Schichtdicke von 8 μm haben sich hierbei für die Messung von Proteinen in H_2O bewährt. Sie stellen einen guten Kompromiss zwischen benötigtem Signal/Rauschen-Verhältnis (das umso schlechter wird, je niedriger die Schichtdicke ist) und maximal möglicher Schichtdicke hinsichtlich der Detektorlinearität dar.

Durch den Austausch von $^1\text{H}_2\text{O}$ (H_2O) gegen $^2\text{H}_2\text{O}$ (D_2O) wird der durch die O–H-Deformationsschwingung überdeckte Bereich frei zugänglich, da die O–D-Deformationsschwingung aufgrund der größeren Masse eines Deuterons gegenüber der eines Protons um rund 450 cm^{-1} niederfrequent verschoben auftritt (siehe Gl. 1.11). Die bei in D_2O durchgeführten Messungen an Proteinen beobachteten Amidbanden werden mit einem Strich gekennzeichnet, um sie von den in H_2O beobachteten Banden zu unterscheiden. Ihre Lage wird durch den H/D-Austausch je nach Art der zugrunde liegenden Schwingung unterschiedlich stark beeinflusst. So sind Amid-A'- und Amid-B'-Bande gegenüber der Amid-A- und Amid-B-Bande um rund 1000 cm^{-1} niederfrequent verschoben, während die Amid-II'-Bande um rund 100 cm^{-1} gegenüber der Amid-II-Bande niederfrequent verschoben ist. Auch die Amid-I'-Bande wird vom H/D-Austausch beeinflusst, obwohl sie hauptsächlich auf C=O-Streckschwingungen zurückzuführen ist. Da sie aber zu einem geringen Anteil von N–H-Deformationsschwingungen verursacht wird (vgl. Tab. 1.1), führt ein Austausch von Protonen gegen Deuteronen zu einer Verschiebung der Amid-I'-Bande gegenüber der Amid-I-Bande um $5\text{--}15\text{ cm}^{-1}$ zu niedrigeren Wellenzahlen.

In D_2O kann mit Küvetten deutlich höherer Schichtdicke gearbeitet werden (üblich sind $50\text{ }\mu\text{m}$), wodurch das Signal/Rauschen-Verhältnis verbessert werden kann. Sollen jedoch direkte Vergleichsmessungen einer Probe in H_2O und D_2O durchgeführt werden, bietet es sich an, in beiden Fällen mit gleicher Schichtdicke zu messen.

1.2.3.2 Sekundärstrukturbestimmung

Wie bereits erwähnt, eignen sich für die Sekundärstrukturbestimmung eines Proteins am besten die Amid-I- und die Amid-II-Bande, da sie sehr intensiv und konformationssensitiv sind. Die Amid-I-Bande wird hauptsächlich durch C=O-Streckschwingungen des Peptidrückgrats hervorgerufen, während die Amid-II-Bande größtenteils durch eine Kopplung von N–H-Biegeschwingungen und C–N-Streckschwingungen verursacht wird. Aus der Lage der Einzelkomponenten der jeweiligen Amidbande kann man die Sekundärstruktur eines Polypeptids oder Proteins bestimmen. Tab. 1.2 zeigt eine Übersicht über die verschiedenen bestimmbareren Sekundärstrukturelemente und die Lage der entsprechenden Absorptionsbanden im IR-Spektrum.

Sowohl die Amid-I- als auch die Amid-II-Bande spiegeln die Stärke und Geometrie von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Carbonyl-Sauerstoff und dem Wasserstoff der Aminogruppe von wechselwirkenden Peptidgruppen gut wider. Starke

Tabelle 1.2: Lage der Absorptionsbanden von Proteinen verschiedener Konformation im Amid-I-, Amid-I'-, Amid-II- und Amid-II'-Bereich nach Barth und Zscherp (2002); Fabian und Schultz (2000); Susi (1972); Krimm und Bandekar (1986); Venyaminov und Kalnin (1990)

Sekundärstrukturelement	Bandenlage in H ₂ O/cm ⁻¹	Bandenlage in D ₂ O/cm ⁻¹
α -Helix	1 648–1 657 1 545–1 550	1 642–1 660 um 1 460
β -Faltblatt (niederfrequent)	1 620–1 641 1 530–1 535	1 615–1 638 um 1 430
β -Faltblatt (hochfrequent)	1 674–1 695	1 672–1 694
<i>turns</i>	1 662–1 686	1 653–1 691
ungeordnete Struktur	1 642–1 657 um 1 550	1 639–1 654

Wasserstoffbrückenbindungen verursachen sowohl bei der C=O-Bindung als auch bei der N–H-Bindung eine Verminderung der Elektronendichte. Dadurch wird die C=O-Bindung geschwächt und die Kraftkonstante k der C=O-Streckschwingung erniedrigt. Die N–H-Bindung wird zwar auch geschwächt, doch aufgrund der „Fixierung“ des Protons am wechselwirkenden Carbonylsauerstoff steigt k für die N–H-Biegeschwingung an. Nach Gl. 1.11 ändert sich damit die Eigenfrequenz der jeweiligen Schwingung in entgegengesetzte Richtung. Je stärker also die Wasserstoffbrückenbindungen in einem Protein sind, desto stärker wird die Amid-I-Bande zu niedrigeren und die Amid-II-Bande zu höheren Wellenzahlen verschoben.

Allein mit unterschiedlich starken Wasserstoffbrückenbindungen lassen sich die beobachteten Lagen der Absorptionsbanden in IR-Spektren von Proteinen jedoch nicht vollständig erklären. Ein wichtiger Mechanismus, der die Amid-I-Bande wesentlich beeinflusst, ist die Übergangsdipolkopplung (TDC, für engl. *transition dipole coupling*). Als TDC bezeichnet man eine Resonanzinteraktion zwischen zwei schwingenden Dipolen von Amidgruppen, die sich in räumlicher Nähe befinden. Sie soll hier kurz nach den Ausführungen von Barth und Zscherp (2002) dargestellt werden.

TDC wird nicht über kovalente Bindungen übertragen, sondern erfolgt durch den Raum und beruht auf Coulomb'schen Wechselwirkungen zwischen bewegten Partialladungen. Die Effizienz der TDC hängt von der relativen Orientierung und

dem Abstand der gekoppelten Dipole ab. Sie ist am größten, wenn die gekoppelten Dipole mit der gleichen Frequenz schwingen.

Die Orientierung und der Abstand der gekoppelten Dipole A und B können mit einem geometrischen Faktor X_{AB} beschrieben werden:

$$X_{AB} = \frac{\cos \alpha - 3 \cos \beta \cos \gamma}{R^3}. \quad (1.19)$$

α bezeichnet dabei den Winkel zwischen den beiden Übergangsdipolmomenten¹², β und γ geben die Winkel zwischen einer Linie, die die beiden Mittelpunkte der Übergangsdipolmomente verbindet, und den Übergangsdipolmomenten der Oszillatoren A bzw. B wieder, und R ist schließlich der Abstand zwischen den Zentren beider Übergangsdipolmomente.

Durch die Energieübertragung von einem Oszillator auf einen benachbarten Oszillator ist der angeregte Zustand nicht mehr einer einzelnen schwingenden Gruppe zuzuordnen, sondern als delokalisiert anzusehen. Betrachtet man zwei gekoppelte Oszillatoren, können folglich zwei distinkte angeregte Energieniveaus beobachtet werden, je nachdem, ob die beiden Oszillatoren miteinander in Phase oder außer Phase schwingen. Durch diesen als Exciton-Spaltung bezeichneten Effekt kann für die β -Faltblatt-Struktur eine hoch- und eine niederfrequente Komponente innerhalb der Amid-I-Bande beobachtet werden. Die Energiedifferenz ΔE zwischen dem Grundzustand und dem angeregten Zustand im Falle von TDC lässt sich als

$$\Delta E = \Delta E_{keineWW} \pm V_{AB} \quad (1.20)$$

beschreiben mit der Energiedifferenz $\Delta E_{keineWW} = E_1 - E_0$, die ohne Wechselwirkungen zwischen den Dipolen beobachtet werden könnte, und V_{AB} als einer Größe, die die Wahrscheinlichkeit der Energieübertragung vom oszillierenden Dipol A auf den oszillierenden Dipol B angibt.

Natürlich gilt die beschriebene Exciton-Spaltung nicht nur für die Absorptionen von β -Faltblättern, sondern auch für die der anderen Sekundärstrukturelemente. Allerdings sind die Effekte hier so gering, dass i. d. R. jeweils nur einzelne Banden beobachtet werden können. So geht die Exciton-Spaltung für α -Helices beispielsweise mit

¹²Das Übergangsdipolmoment eines zweiatomigen Oszillators lässt sich aus der Änderung des Dipolmoments mit dem Abstand zwischen den beiden an der Schwingung beteiligten Partialladungen berechnen.

wachsender Länge der Helix praktisch gegen null, wie mittels Isotopenaustauschexperimenten belegt werden konnte (Barth und Zscherp, 2002).

Für die Unterscheidung von parallelem und antiparallelem β -Faltblatt ist die Exciton-Spaltung von großer Bedeutung. Zwar unterscheiden sich die berechneten Spektren für endliche parallele und antiparallele β -Faltblätter praktisch nicht (auch für ein endliches paralleles β -Faltblatt kann eine hochfrequente Amid-I-Komponente beobachtet werden), allerdings tritt die hochfrequente β -Faltblatt-Komponente bei unendlichen β -Faltblättern nur dann auf, wenn sie antiparallel ausgerichtet sind. Da bereits sechs β -Stränge in einem β -Faltblatt ausreichen, um das Spektrum eines endlichen β -Faltblatts dem eines unendlichen β -Faltblatts sehr gut anzunähern, treten bei zahlreichen Proteinen in der Natur „unendliche“ β -Faltblätter auf (Barth und Zscherp, 2002). Die Länge der einzelnen β -Stränge spielt dabei praktisch keine Rolle, da die für die Exciton-Spaltung verantwortliche TDC zwischen Amidgruppen in benachbarten Strängen und nicht innerhalb eines Stranges auftritt. Bei der Betrachtung von intermolekularen β -Faltblatt-Strukturen, die definitionsgemäß sehr ausgedehnt sind, kann also aus einer hochfrequenten β -Faltblatt-Komponente im Amid-I-Bereich stets abgeleitet werden, dass die β -Stränge antiparallel zueinander ausgerichtet sind.

1.2.3.3 Absorptionen der Aminosäureseitenketten

Neben dem Peptidrückgrat verursachen auch die Seitenketten der Aminosäuren teilweise recht intensive Absorptionen im Infrarotspektrum (Tab. 1.3). Diese Absorptionen können dazu verwendet werden, Mechanismen von Proteinreaktionen aufzuklären, da sich einzelne Aminosäuren hierbei häufig im Zentrum des Reaktionsgeschehens befinden. Auch für die Beobachtung der Faltung von Proteinen spielen die sich ändernden Mikroumgebungen einzelner Aminosäuren eine wichtige Rolle. So lassen sich durch neue inter- oder intramolekulare Wechselwirkungspartner oder auch durch Modifizierungen wie beispielsweise Protonierungen o. ä. im Laufe einer Reaktion häufig zwei oder mehr distinkte Zustände mit ihren entsprechenden IR-Absorptionen detektieren. Mit höherem experimentellem Aufwand kann man durch gezielten Isotopenaustausch einzelner Atome an einzelnen Aminosäuren zusätzliche mechanistische Informationen gewinnen.

Die durch Tyrosin-Ringschwingungen verursachte Bande bei 1517 cm^{-1} kann beispielsweise hervorragend für die relative Bestimmung der Proteinkonzentration in einer Probe herangezogen werden und eignet sich daher auch sehr gut zur

Tabelle 1.3: Absorptionen ausgewählter Aminosäureseitenketten in H₂O und D₂O im Bereich von 1 500 bis 1 700 cm⁻¹ (Barth, 2000; Barth und Zscherp, 2002)

Aminosäure		Bandenlage in H ₂ O/cm ⁻¹	Bandenlage in D ₂ O/cm ⁻¹	Art der Schwingung ^a
Arginin	(Arg)	1 614–1 663	1 581–1 586	$\nu_s(\text{CN}_3\text{H}_5^+)$
		1 652–1 695	1 605–1 608	$\nu_{as}(\text{CN}_3\text{H}_5^+)$
Asparagin	(Asn)	1 677–1 678	1 648	$\nu(\text{C}=\text{O})$
Aspartat	(Asp)	1 574–1 579	1 584	$\nu_{as}(\text{COO}^-)$
Glutamat	(Glu)	1 556–1 560	1 567	$\nu_{as}(\text{COO}^-)$
Glutamin	(Gln)	1 668–1 687	1 635–1 654	$\nu(\text{C}=\text{O})$
		1 586–1 610	1 163	$\delta(\text{NH}_2)$
Tyrosin	(Tyr)	1 614–1 621	1 612–1 618	$\nu(\text{C}-\text{C}), \delta(\text{C}-\text{H})$
		1 516–1 518	1 513–1 517	$\nu(\text{C}-\text{C}), \delta(\text{C}-\text{H})$

^aAbkürzungen: (ν_s) symmetrische Streckschwingung, (ν_{as}) antisymmetrische Streckschwingung, (δ) Deformationsschwingung, vgl. Abb. 1.6.

Normierung und den anschließenden Vergleich von Proteinspektren unterschiedlicher Konzentration. Diese Methode funktioniert allerdings nicht beim Vergleich von Spektren verschiedener Proteine, sondern nur bei verschiedenen Spektren eines Proteins, da die Anzahl und Mikroumgebung der Tyrosinreste und damit auch die entsprechende Absorption dieser Reste von Protein zu Protein variiert.

Kleine Intensitätsänderungen oder Bandenverschiebungen der Absorptionen von Aminosäureseitenketten im Laufe von Faltungs- bzw. Fehlfaltungsprozessen können als wichtige Marker dieser Reaktionen dienen.

1.3 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, mögliche Faltungs- und Fehlfaltungswege des zellulären Prionproteins (PrP^C) anhand des rekombinanten Prionproteins des Syrischen Hamsters (SHaPrP⁹⁰⁻²³²) in vitro näher zu untersuchen. Insbesondere sollten dabei die dramatischen Sekundärstrukturänderungen beim Übergang des vorwiegend α -helikal gefalteten PrP^C zum β -Faltblatt-reichen PrP^{Sc} ($\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltung) am SHaPrP⁹⁰⁻²³² charakterisiert werden.

Zu diesem Zweck sollte das SHaPrP⁹⁰⁻²³² unter destabilisierenden Bedingungen mittels zeitaufgelöster Techniken der FTIR-Differenzspektroskopie unter

Verwendung einer neuartigen Stopped-Flow-Apparatur untersucht werden. Die Vorteile dieser neuen Technologien – insbesondere die hohe Struktursensitivität der FTIR-Differenzspektroskopie, ihre hohe Zeitauflösung und die Möglichkeit, in H_2O (statt des sonst häufig verwendeten D_2O) bei vergleichsweise niedriger Proteinkonzentration messen zu können – sollten hier vorteilhaft eingesetzt werden, um neue Aussagen zur Bildung bestimmter Fehlfaltungsprodukte des PrP^{C} treffen zu können.

Es sollten ferner verschiedene Möglichkeiten der Destabilisierung (Inkubation des Proteins mit dem chaotropen Agens Guanidinhydrochlorid, Variation der Ionenstärke, Einfluss von reduzierenden und oxidierenden Substanzen) auf ihre Eignung zur Induktion einer $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltungsreaktion des SHaPrP^{90-232} getestet werden.

Darüber hinaus sollten die nativen Sekundärstrukturen der rekombinanten Prionproteine von Hamster und Mensch FTIR-spektroskopisch charakterisiert werden, um zu klären, ob die anhand von NMR-spektroskopischen Untersuchungen bereits beschriebenen geringen Unterschiede zwischen beiden Strukturen auch mittels FTIR-Spektroskopie detektiert werden können.

Aus der Literatur war bereits bekannt, dass die Inkubation von rekombinantem Prionprotein unter destabilisierenden Bedingungen neben der $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltung eine Proteinaggregation zur Folge hat, doch war diese Aggregation bislang noch nicht genau charakterisiert. Um detailliertere Informationen über den Aggregationszustand des SHaPrP^{90-232} zu erhalten, sollten daher auch Messungen mittels dynamischer Lichtstreuung und Elektronenmikroskopie durchgeführt werden.

Ein sich während dieses Aggregationsprozesses bildendes transient stabiles Intermediat, das sog. kritische Oligomer, sollte rein dargestellt und durch die Wahl geeigneter Pufferbedingungen über einen für die erforderlichen Untersuchungen ausreichend langen Zeitraum stabilisiert werden. Diese Untersuchungen sollten insbesondere die morphologische Charakterisierung des kritischen Oligomers und die Beschreibung seiner Wechselwirkungen mit Membranen umfassen. Dabei sollte speziell untersucht werden, ob das kritische Oligomer in der Lage ist, Poren in Membranen zu bilden. Um mögliche Membranwechselwirkungen des Oligomers von denen des SHaPrP^{90-232} -Monomers abgrenzen zu können, sollten entsprechende Vergleichsexperimente durchgeführt werden.

Schließlich sollten die Sekundärstrukturänderungen beim Übergang des monomeren SHaPrP^{90-232} zum kritischen Oligomer mit den entsprechenden Änderungen,

die bei der temperaturinduzierten Denaturierung/Aggregation des Prionproteins entstehen, FTIR-spektroskopisch verglichen werden.

Für eine spätere hochaufgelöste Bestimmung der Sekundär- und Raumstruktur des kritischen Oligomers in Lösung sollte die prinzipielle Durchführbarkeit dieses Experiments evaluiert werden. Dazu sollte das kritische Oligomer, ausgehend von vollständig mit dem Kohlenstoffisotop ^{13}C und dem Stickstoffisotop ^{15}N markiertem monomerem SHaPrP⁹⁰⁻²³², hergestellt und anschließend mittels NMR-Spektroskopie untersucht werden.

