

# 4 Diskussion

## 4.1 Überblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die  $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltung und die Aggregation des rekombinanten Prionproteins des Hamsters SHaPrP<sup>90-232</sup> unter Verwendung mehrerer unabhängiger Methoden und Bedingungen untersucht. Der methodische Schwerpunkt lag dabei auf der zeitaufgelösten FTIR-Spektroskopie. Das bei dem  $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltungsprozess des SHaPrP<sup>90-232</sup> in 1 M GuHCl bei pH 4,2 entstehende  $\beta$ -Faltblatt-reiche kritische Oligomer wurde rein dargestellt und eingehend charakterisiert. Ferner wurde die temperaturinduzierte Denaturierung/Aggregation des SHaPrP<sup>90-232</sup> FTIR-spektroskopisch beobachtet und mit der Bildung spezifischer Oligomere verglichen. Schließlich wurden die Wechselwirkungen des kritischen Oligomers und des SHaPrP<sup>90-232</sup>-Monomers mit Membranen vergleichend untersucht.

Die FTIR-Spektroskopie erwies sich dabei als geeignete und sensitive Methode, um die Sekundärstrukturänderungen des SHaPrP<sup>90-232</sup> zu beobachten. So konnten mittels der verwendeten Stopped-Flow-Apparatur sehr gut auswertbare Spektren vom SHaPrP<sup>90-232</sup> in Lösung gewonnen werden, obwohl in H<sub>2</sub>O und bei Konzentrationen gearbeitet wurde, die für FTIR-spektroskopische Verhältnisse niedrig waren. Bislang publizierte Spektren von rekombinanten Prionproteinen wurden entweder in D<sub>2</sub>O oder als getrockneter Film bzw. als H<sub>2</sub>O-Lösung mittels abgeschwächter Totalreflexions-FTIR-Spektroskopie gemessen (Zhang *et al.*, 1997; Xiong *et al.*, 2001; Callaham *et al.*, 2001; Sanghera und Pinheiro, 2002; Baskakov und Bocharova, 2005; Bocharova *et al.*, 2005).

Die  $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltung von rekombinantem Prionprotein wurde bislang hauptsächlich mit CD-Spektroskopie untersucht (Jackson *et al.*, 1999a; Hornemann und Glockshuber, 1998; Baskakov *et al.*, 2000, 2001; Swietnicki *et al.*, 2000). Die CD-Spektroskopie ist eine geeignete Methode, um generelle Unterscheidungen zwischen  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen zu bestimmen, und ist für den Nachweis von  $\alpha$ -Helices offensichtlich sogar etwas sensitiver als die FTIR-Spektroskopie (Sarver

und Krueger, 1991; Oberg *et al.*, 2004). Mittels FTIR-Spektroskopie kann man ebenso  $\alpha$ -Helices identifizieren, aber zusätzlich auch verschiedene  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen voneinander unterscheiden<sup>1</sup> sowie *turns* und einige Aminosäureseitenketten anhand ihrer spezifischen Absorptionen im IR-Spektrum identifizieren und Änderungen an diesen Strukturen verfolgen. Bei der  $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltung des Prionproteins war insbesondere eine genaue Charakterisierung der entstandenen  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen von Interesse, so dass aus FTIR-spektroskopischen Untersuchungen spezifischere Informationen gewonnen werden konnten als aus vergleichbaren Untersuchungen mittels CD-Spektroskopie.

Die Sensitivität der FTIR-Spektroskopie spiegelt sich in den nahezu identischen Spektren von SHaPrP<sup>90-232</sup> und huPrP<sup>91-231</sup> wider (vgl. Abb. 3.4): Im entsprechenden Differenzspektrum kann man eine kleine Differenzbande bei  $1678\text{ cm}^{-1}$ , die Unterschieden in den *turn*-Strukturen entspricht, erkennen. Dabei zeigte das SHaPrP<sup>90-232</sup> in den FTIR-Spektren etwas stärkere Absorptionen der *turn*-Strukturen als das huPrP<sup>91-231</sup>. Anhand der NMR-spektroskopischen Daten zu den jeweiligen Proteinstrukturen (vgl. Abschnitte 1.1.3 und 1.1.4) konnte gezeigt werden, dass die Schleife, die von den Aminosäuren 166–172 gebildet wird, beim SHaPrP<sup>90-232</sup> klarer strukturiert ist als beim huPrP<sup>91-231</sup>. Diesbezügliche Ergebnisse der FTIR- und NMR-Spektroskopie korrelieren somit sehr gut miteinander.

In den folgenden Abschnitten sollen die wichtigsten Aspekte und Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit Blick auf die aktuelle Literatur diskutiert werden.

## 4.2 Rekombinantes Prionprotein als Modell für die Faltung und Fehlfaltung des PrP<sup>C</sup>

Um die hier vorgestellten Faltungsstudien am rekombinant hergestellten Prionprotein durchführen zu können, war die reproduzierbare Herstellung von sehr reinem Protein erforderlich. Durch den mehrstufigen Reinigungsprozess unter Ausnutzung verschiedener Trennmethode(n) (insbesondere der Affinitätschromatographie und der Reversed-Phase-HPLC) konnte gewährleistet werden, dass ein solches Produkt für die In-vitro-Faltungsstudien zur Verfügung stand.

Das so hergestellte SHaPrP<sup>90-232</sup> wurde in der vorliegenden Arbeit nicht nur als generelles Faltungsmodell untersucht, sondern auch im Hinblick auf die möglichen

---

<sup>1</sup>Man kann i. d. R. intra- von intermolekularen  $\beta$ -Faltblättern mit jeweils paralleler oder antiparalleler Ausrichtung differenzieren.

Faltungswege des PrP<sup>C</sup> in vivo hin zu größeren molekularen Strukturen und letztlich dem PrP<sup>Sc</sup>. Wenngleich das rekombinante Prionprotein in der Literatur als anerkanntes Modellsystem für die Untersuchung der Faltungseigenschaften des PrP<sup>C</sup> gilt (vgl. die in Abschnitt 4.4.1 angegebene Literatur), könnten prinzipielle Bedenken auftreten, ob eine solche Übertragung eines Modellsystems angesichts der möglichen strukturellen Differenzen zwischen einem zellulären Protein und seinem rekombinant hergestellten Pendant überhaupt statthaft ist. Daher sollen im Folgenden noch einmal die grundlegenden Unterschiede zwischen dem PrP<sup>C</sup> des Hamsters und dem SHaPrP<sup>90-232</sup> dargestellt und soll ihre Bedeutung für das Modellsystem des rekombinanten Prionproteins diskutiert werden. Diese Unterschiede und ihre Bedeutung gelten in analoger Weise natürlich auch für das PrP<sup>C</sup> des Menschen und das huPrP<sup>91-231</sup>.

- Das SHaPrP<sup>90-232</sup> umfasste nur die Aminosäuren 90–232 der gesamten Sequenz des PrP<sup>C</sup>; es entsprach damit dem PK-resistenten Kern des PrP<sup>Sc</sup>.
- Das SHaPrP<sup>90-232</sup> war im Gegensatz zum PrP<sup>C</sup> nicht mit einem GPI-Anker versehen und stand folglich bei den Untersuchungen nicht in engem Kontakt mit einer Membran.
- Das SHaPrP<sup>90-232</sup> war nicht glykosyliert. Das PrP<sup>C</sup> verfügt hingegen über bis zu zwei große Glykanstrukturen.

**Einfluss der Beschränkung auf die Aminosäuren 90–232** Das die Aminosäuren 90–232 umfassende C-terminale Fragment des Prionproteins enthielt neben einem strukturell ungeordneten Abschnitt komplett diejenigen Bereiche des PrP<sup>C</sup>, die über eine ausgeprägte Sekundärstruktur verfügen. Wie die NMR-Untersuchungen des rekombinanten SHaPrP voller Länge und des SHaPrP<sup>90-231</sup> gezeigt haben, konnte kein Einfluss des langen ungeordneten N-terminalen Endes auf die geordneten Bereiche der Sekundärstruktur des Proteins festgestellt werden (Donne *et al.*, 1997; James *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1999). Es wäre aber theoretisch denkbar, dass bei einer Umfaltungsreaktion eine Interaktion des ungeordneten N-terminalen Bereichs mit den sich ändernden Sekundärstrukturelementen im C-terminalen geordneten Abschnitt bestimmte intermediäre Strukturen stabilisierte. Im Gegensatz zum rekombinanten SHaPrP voller Länge wäre beim SHaPrP<sup>90-232</sup> eine solche hypothetische Interaktion und Stabilisierung nicht möglich. Für solch

eine Interaktion konnten bislang aber keine experimentellen Befunde erbracht werden. Die Beschränkung auf die Aminosäuren 90–232 ist also offensichtlich für die Aussagekraft der Resultate nicht limitierend.

**Einfluss des fehlenden GPI-Ankers** Es ist bislang ebenfalls noch nicht experimentell nachgewiesen, ob die  $\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$ -Umwandlung tatsächlich an einer Membranoberfläche oder erst nach Ablösen des  $\text{PrP}^{\text{C}}$  von der Membran erfolgt. So konnte eine In-vitro-Umfaltung von  $\text{PrP}^{\text{C}}$  zu  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  nach Inkubation von membranengebundenem  $\text{PrP}^{\text{C}}$  mit auf separaten Membranen gebundenem  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  nur dann erfolgreich durchgeführt werden, wenn entweder das  $\text{PrP}^{\text{C}}$  von seiner Membran durch Abspalten des GPI-Ankers gelöst wurde oder aber die das  $\text{PrP}^{\text{C}}$  tragenden Membranen mit den das  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  tragenden Membranen durch Polyethylenglykol fusioniert wurden (Baron *et al.*, 2002). Das heißt, dass im Fall einer extrazellulären  $\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$ -Umwandlung ein Ablösen des  $\text{PrP}^{\text{C}}$  von der Membran vor der Umfaltung wahrscheinlich ist, im Fall einer Umwandlung an der Zelloberfläche bzw. einer intrazellulären Umfaltung aber nicht. Für eine Membranassoziiierung im Falle einer intrazellulären  $\text{PrP}^{\text{C}} \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$ -Umwandlung spricht zudem die beobachtete hohe Neurotoxizität von löslichem  $\text{PrP}^{\text{C}}$  im Cytosol (Ma *et al.*, 2002). Über mögliche toxische Wirkungen von  $\text{PrP}^{\text{C}}$  in der extrazellulären Matrix wurden noch keine Daten publiziert.

Bei der Anwendung eines Verfahrens der zyklischen Amplifikation von fehlgefaltetem Prionprotein (PMCA, für engl.: *protein misfolding cyclic amplification*; Saborio *et al.*, 2001) in einer modifizierten Form zeigte sich, dass  $\text{PrP}^{\text{res}}$  in vitro sowohl unter Verwendung von  $\text{PrP}^{\text{C}}$  aus einer Membranfraktion als auch mit  $\text{PrP}^{\text{C}}$  aus einer membranfreien Präparation sehr effizient amplifiziert werden konnte (Nishina *et al.*, 2004). Aus diesen Versuchen folgt, dass auch  $\text{PrP}^{\text{C}}$ , das nicht mehr an eine Membran gebunden ist, seine grundlegende Fähigkeit zur Fehlfaltung behält.

Ebenso konnte bei einer speziellen rekombinanten Variante des Prionproteins, die kovalent an eine Membran gebunden war, weder eine Erhöhung der Stabilität im Vergleich mit löslichem Prionprotein noch eine veränderte Sekundärstruktur festgestellt werden (Eberl *et al.*, 2004). Der Einfluss des fehlenden GPI-Ankers auf die grundlegenden Faltungseigenschaften des SHaPrP<sup>90–232</sup> kann daher als vermutlich gering angesehen werden.

In diesem Zusammenhang sei aber auch auf die zahlreichen Substanzen und Umgebungparameter hingewiesen, die im zellulären Milieu einen wichtigen Einfluss

auf die Umfaltungsprozesse haben könnten und sich *in vitro* nicht in äquivalenter Komplexität simulieren lassen. So ist es denkbar, dass *in vivo* beispielsweise bestimmte Ionen, Proteine oder Nukleinsäuren stabilisierend oder destabilisierend auf intermediäre Isoformen des Prionproteins wirken und dementsprechend die Faltung zu einer bestimmten Isoform begünstigen.

**Einfluss der fehlenden Glykosylierung** Die Zuckerketten, mit denen das PrP<sup>C</sup> glykosyliert ist, nehmen viel Raum an der Proteinoberfläche ein. Daher lässt sich nicht nur die sterische Beeinflussung eines Umfaltungsprozesses, sondern auch eine Beeinflussung der Raumstruktur des PrP<sup>C</sup> durch die Zuckerketten vermuten. Wie jedoch durch den NMR-spektroskopischen Vergleich des bovinen PrP<sup>C</sup> und des bovinen rekombinanten PrP voller Länge gezeigt werden konnte, besitzen beide Proteine eine praktisch identische dreidimensionale Struktur (Hornemann *et al.*, 2004). Die entsprechenden CD-Spektren und Daten zur thermischen Stabilität legen auch eine praktisch nicht unterscheidbare Sekundärstruktur beider Proteinvarianten nahe (Hornemann *et al.*, 2004). Die Zuckerketten haben also offensichtlich einen weitaus geringeren Einfluss auf die Struktur und die Eigenschaften des PrP<sup>C</sup> als ursprünglich vermutet. Gleichwohl schirmen sie einen großen Teil der Proteinoberfläche gegenüber möglichen Interaktionspartnern ab und können möglicherweise begünstigend auf die Stabilität bestimmter Strukturen von intermediären Isoformen oder des PrP<sup>Sc</sup> wirken (Hornemann *et al.*, 2004). Dennoch zeigen diese Untersuchungen eindrucksvoll, dass die fehlende Glykosylierung beim rekombinanten Prionprotein wahrscheinlich nur vernachlässigbare Auswirkungen hinsichtlich der Übertragbarkeit seiner Faltungseigenschaften auf die des PrP<sup>C</sup> hat.

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass die Ergebnisse aus Faltungsstudien am rekombinanten SHaPrP<sup>90-232</sup> auf die grundlegenden Faltungsprinzipien des PrP<sup>C</sup> *in vivo* übertragen werden können. Das SHaPrP<sup>90-232</sup> stellt somit ein geeignetes Modellsystem für die Untersuchung dieser generellen Faltungsprinzipien des PrP<sup>C</sup> dar.

### 4.3 Stopped-Flow-FTIR-Spektroskopie

Mittels der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten FTIR-spektroskopischen Messungen in der Stopped-Flow-Apparatur konnten Spektren gewonnen werden, die

einerseits aufgrund der Datenaufnahme im Rapid-Scan-Modus eine hohe Zeitauflösung hatten und andererseits dank der verwendeten Messküvette auch bei den für FTIR-spektroskopische Verhältnisse niedrigen Proteinkonzentrationen noch sehr gut auswertbar waren.

### 4.3.1 Zeitauflösung

Die Zeitauflösung der Messungen könnte noch weiter erhöht werden, wenn das FTIR-Spektrometer mit der Pumpen- und Ventilsteuerelektronik der Stopped-Flow-Apparatur synchronisiert würde. Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stopped-Flow-System erfolgten die Schaltung der Ventile und damit das Einbringen der Probe in die Messküvette unabhängig vom Spektrometer. Wie in Abschnitt 2.3.1.1 (Absatz „Totzeit“ auf Seite 48) erläutert, wurde der frühestmögliche Start der Messung durch die Wartezeit von 100 ms nach dem Schalten des Stopp/Fluss-Ventils von der Elektronik der Stopped-Flow-Apparatur vorgegeben. Da der tatsächliche Start der Messung jedoch von der Position des beweglichen Interferometerspiegels abhing, divergierten die jeweiligen Zeitpunkte der Spektrenaufnahme bei mehreren Wiederholungsversuchen. Die Standardabweichung der einzelnen Messzeitpunkte gegenüber dem berechneten Zeitmittelwert betrug beispielsweise im Fall der Untersuchung der  $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltung des SHaPrP<sup>90-232</sup> in 1 M GuHCl bei pH 4,2 rund 36 ms. Das heißt, dass durch Mittelung mehrerer unabhängiger Experimente zwar das Signal/Rauschen-Verhältnis deutlich verbessert werden konnte, man dabei aber eine Unschärfe der Zeitkomponente in Kauf nehmen musste.

Würden Stopped-Flow-Apparatur und FTIR-Spektrometer hingegen synchronisiert, könnte vor dem Start einer Messung aus der aktuellen Position des beweglichen Interferometerspiegels und der zuvor experimentell ermittelten Zeit, die für den Transport der Probe in die Messküvette und das Schalten der Ventile benötigt wird, der optimale Startzeitpunkt für den gesamten Ablauf der beschriebenen Vorgänge bestimmt werden. Das hätte den Vorteil, dass einerseits keine zeitliche Unschärfe der jeweiligen Spektren von verschiedenen Experimenten mehr bestünde und andererseits die jeweilige Messung immer zum frühestmöglichen Zeitpunkt gestartet werden könnte.

Zwischen dem ohne Synchronisation von Stopped-Flow-Apparatur und FTIR-Spektrometer experimentell beobachteten frühesten und dem spätesten Start einer Messung bei der Untersuchung der  $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltungsreaktion vom SHaPrP<sup>90-232</sup> in 1 M GuHCl lagen 77 ms. Für die Beobachtung sehr schneller Reaktionen kann eine

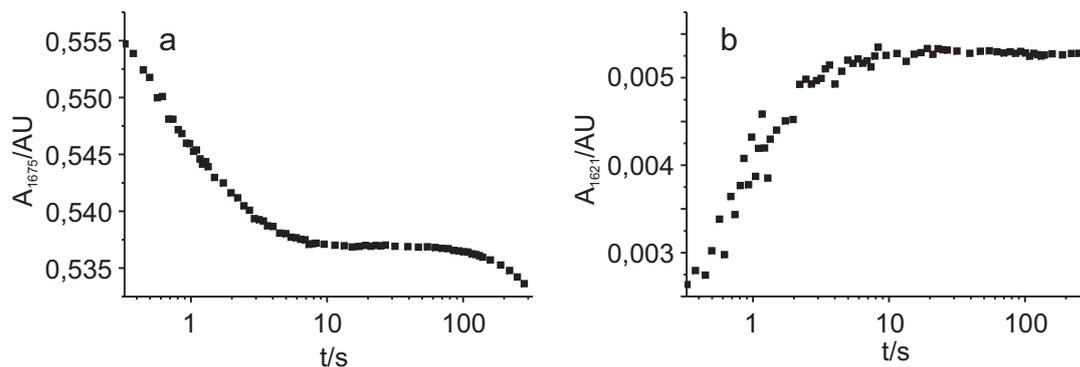
zeitliche Unschärfe dieser Größenordnung nach Mittelung von Spektren verschiedener unabhängiger Experimente bereits deutliche Auswirkungen auf die beobachtete Kinetik haben. Im Fall der durch 1 M GuHCl induzierten  $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltungsreaktion des SHaPrP<sup>90-232</sup> mit einer Halbwertszeit  $\tau = 2,5$  s, in der die Hälfte der beobachteten Änderungen abgeschlossen war, konnte eine solche zeitliche Unschärfe jedoch noch toleriert werden. Mit wachsender Anzahl der *scans*, die pro Spektrum gemittelt werden, fällt die zeitliche Unschärfe der Spektren untereinander im Vergleich mit der für die Aufnahme der jeweiligen Spektren benötigten Zeit überdies immer weniger ins Gewicht. Nichtsdestotrotz wäre es erstrebenswert, alle zur Mittelwertbildung verwendeten Spektren aus unabhängigen Messungen zum exakt gleichen Zeitpunkt der Reaktion aufnehmen zu können.

Eine solche Synchronisation von Stopped-Flow-Apparatur und FTIR-Spektrometer wurde in der Literatur bereits beschrieben (Reinstädler *et al.*, 1996) und soll auch bei den Nachfolgemodellen der in dieser Arbeit verwendeten Stopped-Flow-Apparatur realisiert werden.

### 4.3.2 Temperierung

Einzelne Messungen der  $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltungsreaktion vom SHaPrP<sup>90-232</sup> in 1 M GuHCl erfolgten unter Temperierung der Messküvette ober- und unterhalb der Raumtemperatur. Dabei zeigte sich, dass die Temperaturanpassung der Probe mehrere Sekunden dauerte, wie der zeitabhängige Verlauf der GuHCl-Absorption bei  $1675\text{ cm}^{-1}$  belegte (Abb. 4.1a). Die Temperaturanpassung konnte dabei so genau beobachtet werden, weil die IR-Absorption von GuHCl stark temperaturabhängig ist.<sup>2</sup> Bei getrennten Messungen der Probe (SHaPrP<sup>90-232</sup> in 1 M GuHCl) und des Puffers (1 M GuHCl ohne SHaPrP<sup>90-232</sup>) hatten selbst geringe Unterschiede im Verlauf der Temperaturanpassung so deutliche Auswirkungen auf die Bandenintensität, dass für Probenspektren, die während der Temperaturäquilibrierung aufgenommen wurden, keine artefaktfreie Pufferkompensation durchgeführt werden konnte. Deshalb zeigten die entsprechenden Differenzspektren der Gesamtreaktion auch stets Differenzbanden der GuHCl-Absorption als Artefakte der nicht optimalen Kompensation. Außerdem wurden die Differenzbanden der abnehmenden  $\alpha$ -helikalen Struktur und des gebildeten  $\beta$ -Faltblatts im Amid-I-Bereich durch die starke Änderung der

<sup>2</sup>Wie bereits in Abschnitt 2.3.1.5 erwähnt, führen selbst Abweichungen von wenigen Zehntelgrad zu einer signifikanten Änderung der IR-Absorption von vielen Stoffen. Davon sind insbesondere Substanzen, die Wasserstoffbrücken bilden, wie beispielsweise Wasser und GuHCl, betroffen.



**Abbildung 4.1:** Zeitabhängige Intensitätsverläufe ausgewählter IR-Absorptionsbanden der Reaktion von SHaPrP<sup>90-232</sup> in 1 M GuHCl bei pH 4,2 in der auf 37 °C temperierten Stopped-Flow-Apparatur. (a) Intensität der Absorption von GuHCl bei 1675 cm<sup>-1</sup> im unkompensierten Proteinspektrum. Die Temperaturanpassung der Probe erfolgte innerhalb der ersten 10 Sekunden des Experiments. Die Intensitätserniedrigung der GuHCl-Absorptionsbande ab ca. 150 s war nicht temperaturbedingt, sondern konnte auf Diffusionseffekte zurückgeführt werden. (b) Intensität der Amid-I-β-Faltblatt-Bande bei 1621 cm<sup>-1</sup> im Proteinspektrum, bei dem GuHCl- und Pufferabsorptionen bereits kompensiert wurden. Man beachte die unterschiedlichen Skalierungen der beiden Grafiken.

GuHCl-Absorption so stark beeinflusst, dass ihre zeitabhängigen Intensitätsverläufe nicht mehr die präzise Aufnahme von Reaktionskinetiken gestatteten (Abb. 4.1b).

Man muss an dieser Stelle beachten, dass die absolute GuHCl-Absorption rund 100-mal intensiver war als die des vollständig ausgebildeten β-Faltblatts vom SHaPrP<sup>90-232</sup>. Die relative Intensitätsänderung der GuHCl-Absorption während der Temperaturäquilibrierung war immerhin noch rund 10-mal so stark wie die gesamte Intensitätsänderung der β-Faltblatt-Bande während der α→β-Umfaltungsreaktion (vgl. Abb. 4.1a mit Abb. 4.1b).

Die relativ langsame Temperaturäquilibrierung der gemessenen Substanzen hatte also zur Folge, dass die experimentelle Totzeit bei Stopped-Flow-Messungen, die ober- bzw. unterhalb der Umgebungstemperatur durchgeführt wurden, de facto von 250 ms auf mehrere Sekunden anstieg. Für das Nachfolgemodell der Stopped-Flow-Apparatur ist daher geplant, nicht nur die Temperatur der Messküvette, sondern die des gesamten Messraums, in dem sich die Probenschleifen, der Mikromischer und die entsprechenden Ventile befinden, zu kontrollieren. Die Temperaturäquilibrierung der Probe kann dann bereits in den Probenschleifen erfolgen, und die experimentelle Totzeit wird damit unabhängig von der gewünschten Messtemperatur.

## 4.4 Das kritische Oligomer des SHaPrP<sup>90-232</sup>

### 4.4.1 Stand der Literatur

Die Umwandlung verschiedener rekombinanter Prionproteinkonstrukte unterschiedlicher Aminosäuresequenz in  $\beta$ -Faltblatt-reiche, aggregierte Strukturen wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen untersucht (Swietnicki *et al.*, 2000; Morillas *et al.*, 2001; Glockshuber, 2001; Lu und Chang, 2002; Lu *et al.*, 2003; Baskakov *et al.*, 2001, 2002, 2004; Baskakov und Bocharova, 2005; Bocharova *et al.*, 2005). Übereinstimmend wurde dabei das Auftreten eines speziellen,  $\beta$ -Faltblatt-reichen Oligomers während des Aggregationsprozesses beobachtet. Einige experimentelle Ergebnisse deuten zwar darauf hin, dass das Oligomer eine Isoform des Prionproteins ist, die wahrscheinlich nicht auf dem Faltungsweg zu Fibrillen liegt (Baskakov *et al.*, 2002; Bocharova *et al.*, 2005). Da ein solches Oligomer aber sowohl vom Prionprotein voller Länge als auch von kürzeren Sequenzen unter einer Vielzahl von Bedingungen bei hauptsächlich niedrigem pH-Wert gebildet wird, kann dennoch eine generelle Rolle von Oligomeren bei der Fehlfaltung des Prionproteins angenommen werden.

Eine Ende der 90er Jahre noch viel beachtete  $\beta$ -Faltblatt-reiche, angeblich monomere Isoform, die unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen aus rekombinantem humanem Prionprotein huPrP<sup>91-231</sup> gewonnen wurde (Jackson *et al.*, 1999b), konnte unter ähnlichen Bedingungen von anderen Arbeitsgruppen auch mit anderen rekombinanten Prionproteinen nicht bestätigt werden. So entstanden beispielsweise aus dem rekombinanten Maus-Prionprotein muPrP<sup>23-231</sup> unter ebenfalls reduzierenden und destabilisierenden Bedingungen carbamylierte monomere Isoformen, die eine ungeordnete Sekundärstruktur aufwiesen (Lu und Chang, 2001; Lu *et al.*, 2003). Unter verschiedenen Bedingungen wurde hier bei Raumtemperatur eine rasche Aggregation der Monomere beobachtet, die mit der Bildung von  $\beta$ -Faltblatt-Struktur einherging. Bei pH-Werten von 3 bis 5 konnten dabei sowohl Oligomere, die ringförmige Strukturen aufwiesen, als auch Protofibrillen beobachtet werden (Lu *et al.*, 2003). Eine huPrP<sup>91-231</sup>-Variante, bei der die beiden Cysteinreste durch Alaninreste ausgetauscht waren und die somit keine Disulfidbrücke bilden konnte, hatte eine weitgehend ungeordnete Sekundärstruktur und aggregierte bereits bei niedriger Ionenstärke unter Ausbildung einer  $\beta$ -Faltblatt-reichen Sekundärstruktur (Maiti und Surewicz, 2001). Ein unter reduzierenden Bedingungen untersuchtes huPrP<sup>91-231</sup>, das über die beiden nativen Cysteinreste verfügte, zeigte dabei das

gleiche Verhalten (Maiti und Surewicz, 2001). Die Bildung einer  $\beta$ -Faltblatt-reichen Struktur scheint beim Prionprotein also sehr eng mit einer Aggregatbildung bzw. Oligomerisierung verknüpft zu sein.

Vor diesem Hintergrund sollen im Folgenden die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Bildung des kritischen Oligomers vom SHaPrP<sup>90-232</sup> und seine mögliche biologische Funktion im Vergleich mit Prionproteinfibrillen sowie den Fibrillen und Oligomeren anderer Proteine diskutiert werden.

### 4.4.2 Bildung des kritischen Oligomers

#### 4.4.2.1 Bestimmung der Reaktionsordnung

Die  $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltung des SHaPrP<sup>90-232</sup> konnte aus den FTIR-Daten anhand des zeitlichen Verlaufs der Intensitäten der  $\beta$ -Faltblatt-Differenzbande bei  $1621\text{ cm}^{-1}$  und der  $\alpha$ -Helix-Differenzbande bei  $1653\text{ cm}^{-1}$  als eine Reaktion zweiter Ordnung charakterisiert werden.

Für die Bestimmung der Reaktionsordnung wurden die jeweiligen zeitabhängigen Intensitäten mit einer Funktion nach Gl. 3.2 angepasst. Mit dieser Funktion können allgemein Differenzspektren angepasst werden, die unter Verwendung des letzten Spektrums einer Mess-Serie als Minuend und eines variablen Subtrahenden berechnet wurden (wie beispielsweise in Abb. 3.6 gezeigt). Mit der Funktion nach Gl. 3.1 könnten hingegen Differenzspektren angepasst werden, die unter Verwendung des ersten Spektrums einer Mess-Serie als Subtrahend und eines variablen Minuenden berechnet würden.

Während das Ergebnis beider Kurvenanpassungen mathematisch äquivalent ist, äußert sich die Art der Differenzspektrenberechnung jedoch in der Gesamtqualität der Differenzspektren. Da das erste Spektrum einer Mess-Serie mit nur wenigen *scans* aufgenommen wird, um eine hohe Zeitauflösung zu Reaktionsbeginn zu gewährleisten, besitzt es gegenüber dem letzten Spektrum einer Mess-Serie, das aus der Addition vieler *scans* resultiert, ein vergleichsweise niedriges Signal/Rauschen-Verhältnis. Wird dieses Spektrum nun als Referenz für jedes zu berechnende Differenzspektrum verwendet, haben die resultierenden Spektren ein deutlich niedrigeres Signal/Rauschen-Verhältnis als bei Verwendung des letzten Spektrums einer Mess-Serie.

Um die Reaktionsordnung der  $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltung aus mehreren Methoden zu bestimmen, wurde die Bildung des kritischen Oligomers des SHaPrP<sup>90-232</sup> nicht nur

mittels FTIR-Spektroskopie und Lichtstreuung (vgl. Abschnitt 3.2), sondern auch mittels CD-Spektroskopie untersucht (Sokolowski *et al.*, 2003). Wenngleich die Aussagen der CD-Spektroskopie hinsichtlich der Sekundärstruktur eines Proteins nicht so detailliert wie die der FTIR-Spektroskopie sind, lässt sich dennoch eine generelle Unterscheidung von  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblatt treffen (vgl. Abschnitt 4.1). Gegenüber der FTIR-Spektroskopie hat die CD-Spektroskopie dabei den Vorteil, dass bei deutlich niedrigeren Proteinkonzentrationen gearbeitet werden kann.

Aus dem zeitabhängigen Verlauf der Intensität der spezifischen Elliptizität bei 215 nm (charakteristisch für  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen) konnte durch Messungen bei verschiedenen SHaPrP<sup>90-232</sup>-Konzentrationen ebenfalls eine Reaktionskinetik zweiter Ordnung bestimmt werden. Aus der Konzentrationsabhängigkeit der entsprechenden apparenten Raten  $k_{app}$  wurde hingegen eine Reaktionsordnung von 2,6 ermittelt. Diese Inkonsistenz der Reaktionsordnung je nach Bestimmungsmethode deutet auf einen komplexeren  $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltungsprozess des SHaPrP<sup>90-232</sup> hin, der mindestens zwei Reaktionsschritte erfordert. So könnte beispielsweise erst ein entfaltetes Intermediat entstehen, das dann im zweiten Schritt zum  $\beta$ -Faltblattreichen Oligomer reagieren würde. Sowohl aus den FTIR- als auch aus den CD-Experimenten wurde aber stets eine apparente Zweizustandsumfaltung von  $\alpha$ -helikalen Anteilen in  $\beta$ -Faltblatt-reiche Strukturen ermittelt – die mögliche Existenz eines Intermediats bei dieser Umfaltungsreaktion konnte aus den entsprechenden Spektren nicht abgeleitet werden. Entweder waren putative Intermediate nur in sehr niedriger Konzentration vorhanden, oder aber ihre Sekundärstruktur war der des Ausgangs- oder des Endzustands so ähnlich, dass sich diese Strukturen mit den angewandten spektroskopischen Methoden nicht differenzieren ließen.

Aus den durch Lichtstreuung gewonnenen Daten wurde für den zeitgleich mit der  $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltung ablaufenden Oligomerisierungsprozess eine Reaktionsordnung von 3 bestimmt. Zusammen mit der Reaktionsordnung von 2, die aus den FTIR-Daten berechnet wurde, konnte in der vorliegenden Arbeit für den Gesamtprozess der  $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltung und der Oligomerisierung also eine Reaktionsordnung von 2 bis 3 ermittelt werden, die damit deutlich kleiner als die von Baskakov *et al.* (2002) bestimmte 5. Reaktionsordnung ausfiel.<sup>3</sup>

---

<sup>3</sup>Diese Reaktionsordnung bezieht sich auf Experimente, bei denen das Oligomer in Harnstoff durch Verdünnung der Harnstoffkonzentration von 10 M auf 5 M generiert wurde.

Detaillierte und weitergehende Analysen der kinetischen Prozesse der  $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltung und Oligomerisierung des SHaPrP<sup>90-232</sup> sowie ähnlicher Prozesse bei anderen Proteinen wurden von Modler (2003) und Modler *et al.* (2004) erstellt.

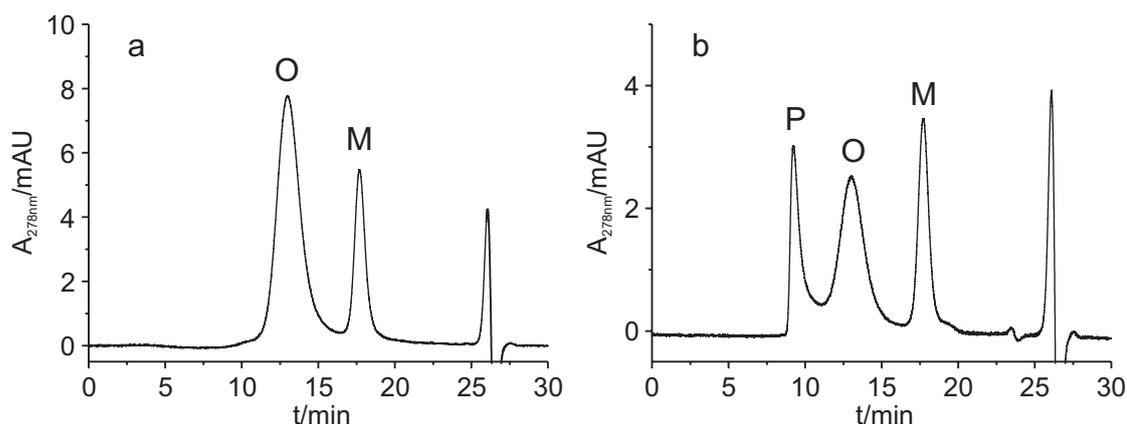
### 4.4.2.2 Auswirkungen auf Aminosäureseitenketten

Wie aus den Differenzspektren der Reaktion des nativen SHaPrP<sup>90-232</sup> zum kritischen Oligomer abgeleitet werden konnte (Abb. 3.6), hatte die gravierende  $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltung der SHaPrP<sup>90-232</sup>-Sekundärstruktur keine detektierbaren Auswirkungen auf die Absorptionen von Aminosäureseitenketten. Besonders auffallend war dabei, dass die Bande der Tyrosin-Ringschwingungen bei  $1517\text{ cm}^{-1}$  während des Umfaltungsprozesses keine Veränderung ihrer Lage und Halbwertsbreite erfuhr. Wurde das SHaPrP<sup>90-232</sup> vollständig in 6 M GuHCl bei pH 7,0 entfaltet, verschob sich diese Bande hingegen erwartungsgemäß von  $1517$  nach  $1516\text{ cm}^{-1}$ . Eine Verschiebung in dieser Größenordnung ist typisch für Ent- und Rückfaltungsprozesse von Proteinen (Reinstädler *et al.*, 1999; Moritz *et al.*, 2002).

Das SHaPrP<sup>90-232</sup> verfügt über fünf Tyrosinreste in  $\alpha$ -Helices, zwei in  $\beta$ -Faltblättern und drei in Schleifen und *turns*. Man kann also davon ausgehen, dass die Veränderungen an der Sekundärstruktur des SHaPrP<sup>90-232</sup> während des  $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltungsprozesses auch zu gravierenden Änderungen der Mikroumgebungen der Tyrosinreste führen. Eine mögliche Erklärung dafür, dass bei der  $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltung anders als bei der vollständigen Entfaltung des SHaPrP<sup>90-232</sup> keine Verschiebung der Tyrosin-Ringschwingungsbande beobachtet wurde, könnte die gegenseitige Aufhebung der individuellen Absorptionsverschiebungen der einzelnen Tyrosinreste zu einer Nettodifferenz von null sein. Diese Erklärung erscheint insbesondere im Hinblick auf Experimente plausibel, die ergaben, dass ein Tyr–Tyr–Arg-Motiv<sup>4</sup> im muPrP<sup>23-231</sup> nach der Bildung von  $\beta$ -Faltblatt-reichen Oligomeren dem Lösungsmittel besser zugänglich war als im nativen Monomer und dadurch von entsprechenden Antikörpern erkannt werden konnte (Paramithiotis *et al.*, 2003). Die Antikörper konnten hingegen nicht an monomeres, nativ gefaltetes muPrP<sup>23-231</sup> binden, wohl aber auch an PrP<sup>Sc</sup> (Paramithiotis *et al.*, 2003).

---

<sup>4</sup>In den Prionproteinen von Maus, Mensch und Hamster gibt es zwei Tyr–Tyr–Arg-Motive: eines in der ersten  $\alpha$ -Helix und eines im zweiten  $\beta$ -Strang.



**Abbildung 4.2:** Chromatogramme der analytischen Größenausschluss-Chromatographie nach Generierung von SHaPrP<sup>90-232</sup>-Oligomeren. (a) Oligomer-Generierung in einem Becherglas. (b) Oligomer-Generierung in einem Gefäß aus Polypropylen. Der Oligomerpeak ist jeweils mit O, der Monomerpeak mit M und der Peak von größeren Aggregaten (Multimere oder Protofibrillen) mit P gekennzeichnet. Der Peak bei 26 min wurde durch unterschiedliche GuHCl-Konzentrationen in Probe und Laufpuffer verursacht.

#### 4.4.2.3 Oberflächenabhängige Aggregatgröße

Bei der Darstellung von reinem Oligomer hatte sich gezeigt, dass das Material der Reaktionsgefäße, die für die  $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltungs- und Oligomerisierungsreaktion verwendet wurden, einen signifikanten Einfluss auf die Größe der entstandenen Aggregate hatte. Wurde die Reaktion in einem Becherglas durchgeführt, bildeten sich ausschließlich Oligomere. Wurden stattdessen Gefäße aus Polypropylen verwendet (Falcon-Röhrchen; Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA), bildeten sich neben den Oligomeren auch deutlich größere Aggregate (Multimere oder Protofibrillen), wie eine vergleichende Untersuchung mittels Größenausschluss-Chromatographie zeigte (Abb. 4.2). Die präparative Oligomer-Generierung wurde daher nur in Glasgefäßen durchgeführt.

#### 4.4.2.4 Varianten der Bildungsbedingungen

Für die in der Literatur beschriebene Bildung der Oligomere verschiedener Prionproteine waren stets ein niedriger pH-Wert, leicht destabilisierende Bedingungen und eine ausreichend hohe Ionenstärke notwendig. Bei Untersuchungen, in denen Harnstoff anstelle von GuHCl zur Destabilisierung des Prionproteins eingesetzt wurde, musste der Reaktionspuffer mit mindestens 150 mM NaCl versetzt werden, um durch diese Erhöhung der Ionenstärke für effiziente Umfaltungsbedingungen zu sorgen (Caughey *et al.*, 1998). Lediglich eine stark destabilisierte Variante des huPrP<sup>90-231</sup>,

bei der der Phenylalaninrest 198 durch einen Serinrest ausgetauscht wurde, konnte auch ohne Denaturans bei verschiedenen pH-Werten in ein  $\beta$ -Faltblatt-reiches Oligomer überführt werden (Vanik und Surewicz, 2002).

Anhand des muPrP<sup>89-231</sup> konnte nachgewiesen werden, dass das bei niedrigem pH-Wert gebildete Oligomer thermodynamisch stabiler als das Monomer ist (Baskakov *et al.*, 2001). Eine Rückfaltung des vollständig entfalteten Prionproteins in einem denaturansfreien Puffer niedriger Ionenstärke führte aber zur kinetisch kontrollierten Bildung des  $\alpha$ -helikalen Monomers (Baskakov *et al.*, 2001). In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass die Rückfaltung von muPrP<sup>121-231</sup> ohne detektierbare kinetische Intermediate erfolgte und sich als eine der schnellsten Proteinfaltungsreaktionen erwies, die bislang bekannt sind (Wildegger *et al.*, 1999). Der Unterschied der freien Energie zwischen dem  $\beta$ -Faltblatt-reichen Oligomer und dem  $\alpha$ -helikalen Monomer wurde für das muPrP<sup>89-231</sup> mit  $2 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$  bestimmt (Baskakov *et al.*, 2001). Die Energiebarriere, die überwunden werden muss, um das Monomer zum Oligomer umzufalten, beträgt für das muPrP<sup>89-231</sup> hingegen  $20 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$  (Baskakov *et al.*, 2001). Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der Primär- und Sekundärstrukturen des muPrP<sup>89-231</sup> und des SHaPrP<sup>90-232</sup> kann man diese Werte nahezu fehlerfrei auf das SHaPrP<sup>90-232</sup> übertragen.

In der vorliegenden Arbeit durchgeführte Versuche, diese Energiebarriere beim SHaPrP<sup>90-232</sup> mit anderen Agenzien als dem etablierten GuHCl abzusenken, haben zu keinen positiven Ergebnissen geführt. Die Änderung des Redoxpotenzials der SHaPrP<sup>90-232</sup>-Lösung durch DTT bzw. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führte weder unter reduzierenden Bedingungen noch unter oxidierenden Bedingungen zu einer detektierbaren Veränderung der SHaPrP<sup>90-232</sup>-Sekundärstruktur. Offensichtlich konnten im beobachteten Zeitfenster Reduktionen bzw. Oxidationen einzelner Aminosäureseitenketten (insbesondere Cystein- und Methioninreste) des nativen Proteins nicht erreicht werden, oder sie verursachten keine ausreichend hohe Destabilisierung der nativen SHaPrP<sup>90-232</sup>-Struktur, um eine  $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltung zu initiieren.

Wie kürzlich gezeigt werden konnte, führte auch beim SHaPrP<sup>29-231</sup> die vollständige Oxidation seiner Methioninreste zu keiner Änderung der Sekundär- oder Tertiärstruktur des Proteins (Requena *et al.*, 2004). Daher wurde auch über eine mögliche zelluläre Rolle des Prionproteins als Antioxidans spekuliert (Requena *et al.*, 2004). Offensichtlich sind die Sekundärstrukturen des SHaPrP<sup>29-231</sup> und des in der vorliegenden Arbeit untersuchten SHaPrP<sup>90-232</sup> gegenüber der Oxidation ihrer Methioninreste also gleichermaßen inert.

Vielversprechender in Bezug auf das Absenken der für eine  $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltung zu überwindenden Energiebarriere verliefen die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente, bei denen die Ionenstärke erhöht wurde. So konnte bei pH 4,2 in Abhängigkeit der NaCl-Konzentration eine  $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltung der SHaPrP<sup>90-232</sup>-Sekundärstruktur beobachtet werden, deren Differenzspektren große Ähnlichkeit mit denen hatten, die sich aus der Reaktion von SHaPrP<sup>90-232</sup> in 1 M GuHCl bei pH 4,2 ergaben. Allerdings deuteten signifikant unterschiedliche Kinetiken der  $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltung darauf hin, dass auf molekularer Basis wahrscheinlich grundlegend andere Prozesse abliefen, die lediglich zu einem Produkt mit einer den kritischen Oligomeren sehr ähnlichen Sekundärstruktur führten. Insbesondere der zeitliche Verlauf des Verlusts von  $\alpha$ -helikalen Strukturen und der Bildung von  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen unterschied sich signifikant vom Verlauf der Vorgänge, die bei der Bildung der kritischen Oligomere beobachtet wurden: Die Auflösung der  $\alpha$ -Helix-Strukturen begann vor der Bildung der  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen und folgte im Gegensatz zur  $\beta$ -Faltblatt-Bildung einem bimolekularen Prozess. Es wäre interessant, mittels Lichtstreuung und Elektronenmikroskopie zu überprüfen, ob es sich bei den NaCl-induzierten Isoformen des SHaPrP<sup>90-232</sup> – wie vermutet – um unspezifische  $\beta$ -Faltblatt-reiche Aggregate oder aber doch um definierte Oligomere handelt. Anhand der Sekundärstruktur der jeweiligen Produkte allein konnte eine solche Unterscheidung bislang nicht vorgenommen werden.

Ein anderer Ansatz, das Prionprotein zu destabilisieren, wurde von Torrent *et al.* (2004) verfolgt: Durch die kurzzeitige Anwendung von Druck in einer Höhe von 600 MPa konnten, ausgehend von monomerem SHaPrP<sup>90-231</sup>, Oligomere und Protofibrillen erzeugt werden. Nach Inkubation des SHaPrP<sup>90-231</sup> über Nacht bei 600 MPa entstanden Fibrillen, die mit Kongorot angefärbt werden konnten. Die FTIR-Spektren der Oligomere und der Fibrillen unterschieden sich voneinander, wiesen aber beide neben  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen noch signifikante Anteile von  $\alpha$ -helikaler Struktur auf (Torrent *et al.*, 2004). Die druckvermittelte Destabilisierung des Prionproteins stellt möglicherweise eine gute Alternative zur denaturansinduzierten Destabilisierung dar.

### 4.4.3 Biologische Funktion von Oligomeren

Eine wichtige Frage betrifft die Relevanz der Oligomere hinsichtlich des Fehlfaltungsprozesses des PrP<sup>C</sup> *in vivo*. Unter den experimentellen Voraussetzungen der vorliegenden Arbeit wurden stets Oligomere und Protofibrillen generiert, nicht jedoch

reife Fibrillen. Da PrP<sup>res</sup>, das aus Hirnen kranker Organismen extrahiert wurde, stets eine fibrilläre Struktur aufweist, muss man die Rolle der Fibrillen und die der Oligomere hinsichtlich der Pathogenese von Prionkrankheiten kritisch hinterfragen. Im Folgenden sollen die möglichen Fehlfaltungswege des PrP<sup>C</sup> näher beleuchtet werden, wobei zwischen Infektiosität und Toxizität einzelner Aggregationsformen unterschieden wird.

### 4.4.3.1 Infektiosität

In vitro fehlgefaltetes rekombinantes Prionprotein, mit dem transgene Mäuse erstmals möglicherweise erfolgreich infiziert werden konnten (Legname *et al.*, 2004), wurde in fibrillärer Form appliziert. Damit wurde angeblich erstmals ohne Zuhilfenahme weiterer zellulärer Bestandteile Infektiosität in vitro aus rekombinantem Prionprotein erzeugt. Für die Bedeutung der Nur-Protein-Hypothese hat ein solches Experiment große Bedeutung. Allerdings wurden Bedenken hinsichtlich der Durchführung dieses Experiments geäußert, so dass es noch nicht allgemein als Beweis der Nur-Protein-Hypothese anerkannt ist (Couzin, 2004; Edskes und Wickner, 2004). Insofern konnte die bereits häufig postulierte Bedeutung der Fibrillen als infektiöse Isoform des Prionproteins auch anhand der von Legname *et al.* (2004) durchgeführten Studie nicht belegt werden. Somit müssen auch Oligomere als putativ infektiöse Form des Prionproteins weiter berücksichtigt werden.

### 4.4.3.2 Rolle von Oligomeren und Fibrillen auf dem Fehlfaltungsweg des PrP<sup>C</sup>

Eine wichtige Frage betrifft den generellen Faltungsweg des PrP<sup>C</sup>: Sind Oligomere und Protofibrillen Vorstufen der Fibrillen, oder muss man sie als Isoformen betrachten, die nicht auf dem direkten Faltungsweg des PrP<sup>C</sup> zum PrP<sup>Sc</sup> liegen? Die in der vorliegenden Arbeit in der Stopped-Flow-Apparatur bei 25 °C und bei 37 °C gebildeten SHaPrP<sup>90-232</sup>-Oligomere hatten identische Sekundärstrukturen. Allein die Temperatur scheint also keinen nachweisbaren Einfluss auf die Sekundärstruktur der Oligomere zu haben; demgegenüber wurde eine Fibrillenbildung von rekombinantem Prionprotein bislang nur bei 37 °C beschrieben (Baskakov *et al.*, 2002; Baskakov und Bocharova, 2005; Bocharova *et al.*, 2005). Das ist ein Hinweis darauf, dass die in vitro erzeugten Oligomere keine Vorstufe der in vitro generierten Fibrillen sind. Kinetische Daten lassen zudem vermuten, dass sich die Fibrillen in vitro direkt aus den  $\alpha$ -helikalen Monomeren und nicht aus Oligomeren bilden (Baskakov

*et al.*, 2002). Die prinzipiellen Unterschiede der Rahmenbedingungen, die für die In-vitro-Generierung von Oligomeren bzw. Fibrillen notwendig sind, hängen zudem offensichtlich insbesondere von der Proteinkonzentration, vom pH-Wert und davon ab, ob der Reaktionsansatz unter ständiger Bewegung auf einem Schüttler oder ohne „Schütteln“ inkubiert wird (Baskakov *et al.*, 2002; Baskakov und Bocharova, 2005; Bocharova *et al.*, 2005). So wurde beobachtet, dass die Prionproteine verschiedener Spezies bei hoher Proteinkonzentration und niedrigem pH-Wert bei ruhiger Inkubation Oligomere und Protofibrillen bildeten, während bei niedriger Proteinkonzentration, neutralem pH-Wert und ständiger Bewegung der Probe Fibrillen entstanden (Bocharova *et al.*, 2005). Eine Destabilisierung der nativen Proteinstruktur war in beiden Fällen durch die Addition von Denaturanzien notwendig.

Wie in Abschnitt 4.4.4 gezeigt wird, kann auf Basis der Sekundärstruktur allerdings praktisch nicht zwischen in vitro hergestellten Oligomeren und in vitro erzeugten Fibrillen des rekombinanten Prionproteins unterschieden werden, während sich diese beiden Strukturen signifikant von der PrP<sup>res</sup>-Sekundärstruktur unterscheiden. Dieser Befund stellt die Relevanz von in vitro erzeugten Fibrillen bezüglich der in vivo ablaufenden Vorgänge infrage. Die Bedeutung von jeweils in vitro gebildeten Oligomeren bzw. Fibrillen für den Fehlfaltungsweg des PrP<sup>C</sup> kann auf der Grundlage der bislang publizierten Daten noch nicht abschließend beurteilt werden.

Allerdings muss auch noch geklärt werden, ob die Fibrillen, die in PrP<sup>res</sup>-Präparationen beobachtet wurden, tatsächlich Strukturen darstellen, die so auch in vivo vorkommen, oder ob sie ein Artefakt der biochemischen Aufreinigung sind. Einerseits ist es zwar denkbar, dass diese Fibrillen auch in vivo auftreten und wichtige pathogene Funktionen haben, andererseits wäre es auch plausibel, dass sie erst während der PrP<sup>res</sup>-Extraktionsprozedur, die unter Verwendung von Detergenzien und PK erfolgt, entstehen (McKinley *et al.*, 1991).

#### 4.4.3.3 Toxizität

**A $\beta$  und  $\alpha$ -Synuclein** Bei der Alzheimer-Krankheit und dem Parkinson-Syndrom konnte keine Korrelation zwischen der Menge von fibrillären Ablagerungen und der Schwere der Krankheit festgestellt werden, so dass vermutet wurde, dass oligomere oder protofibrilläre Intermediate die pathogenen Isoformen des A $\beta$  bzw. des  $\alpha$ -Synucleins sind und durch Umwandlung zu Fibrillen unschädlich gemacht werden können (Lansbury, 1999; Volles und Lansbury, 2002; Selkoe, 2002; Lashuel *et al.*, 2002). Dabei muss man berücksichtigen, dass das kleinste stabile Intermediat die

größte spezifische Aktivität besitzen würde, da das molare Verhältnis der Bindungsstellen, die für die potenziell pathogenen Wechselwirkungen mit zellulären Faktoren benötigt werden, zum Protein umso größer ist, je kleiner das notwendige Intermediat ist (Lansbury, 1999). Auch bei anderen Proteinen, die mit Fehlfaltungskrankheiten assoziiert sind, konnten toxische Oligomere oder Protofibrillen identifiziert werden (Caughey und Lansbury, 2003; Stefani und Dobson, 2003). Die mögliche pathogene Rolle von Oligomeren wurde durch die Beobachtung untermauert, dass die oligomeren Isoformen des A $\beta$  ringförmige Strukturen bildeten, die nicht von bakteriellen Toxinen unterscheidbar waren und zudem eine toxische Wirkung auf Zellkulturen hatten (Lashuel *et al.*, 2002). Oligomere des A $\beta$  und anderer Proteine sollten demnach ihre toxische Wirkung durch die Bildung von Poren in Membranen ausüben können. Bei  $\alpha$ -Synuclein-Oligomeren beispielsweise konnte *in vitro* bereits ein porenähnlicher Mechanismus der Membranpermeabilisierung beobachtet werden (Volles und Lansbury, 2002; Walsh und Selkoe, 2004). Darüber hinaus wurde kürzlich gezeigt, dass A $\beta$ -Oligomere *in vivo* eine transiente Verschlechterung kognitiver Funktionen bei Ratten auslösen können, wenngleich sie keinen kompletten Verlust von funktionsfähigen neuronalen Zellen verursachten (Cleary *et al.*, 2005). Hinweise auf eine mögliche Porenbildung durch A $\beta$ -Oligomere ergaben sich aus diesen Versuchen jedoch nicht.

Die molekularen Strukturen von Oligomeren, die von verschiedenen Proteinen *in vitro* gebildet wurden, sind interessanterweise so ähnlich, dass sie unabhängig von der Aminosäuresequenz der jeweiligen Proteine von einem gemeinsamen Antikörper erkannt werden konnten (Kayed *et al.*, 2003). Durch Bindung des Antikörpers konnte zudem die *In-vitro*-Toxizität der jeweiligen Oligomere inhibiert werden (Kayed *et al.*, 2003). Mono- oder multimeren Isoformen der untersuchten Proteine wurden von diesem Antikörper hingegen nicht erkannt (Kayed *et al.*, 2003).

**Prionprotein** Auch Oligomere des rekombinanten SHaPrP<sup>90-231</sup> zeigten cytotoxische Eigenschaften bei Zellkulturuntersuchungen (Kazlauskaitė *et al.*, 2005). Allerdings wurden die Oligomere dieser Untersuchungen durch Rückfaltung des vollständig entfalteten SHaPrP<sup>90-231</sup> unter reduzierenden Bedingungen gewonnen, so dass die entsprechenden Oligomere keine native Disulfidbrücke ausbildeten. Zwar wurde in der Literatur ein Prionprotein-Dimer beschrieben, das eine intermolekulare Disulfidbrücke zwischen zwei Monomeren bildete (Knaus *et al.*, 2001), und daraus ein Modell für Oligomere mit intermolekularen Disulfidbrücken entwickelt (Lee und Ei-

senberg, 2003), doch konnte bereits gezeigt werden, dass die Disulfidbrücke im PrP<sup>Sc</sup> intramolekular ausgebildet ist (Welker *et al.*, 2002). Deshalb geht man heute davon aus, dass ein Öffnen und Neuverknüpfen der Disulfidbrücke für die Umwandlung von PrP<sup>C</sup> in PrP<sup>Sc</sup> nicht notwendig ist (Welker *et al.*, 2002). Prionprotein-Isoformen ohne native Disulfidbrücke sind also wahrscheinlich als artifizielle Produkte der In-vitro-Untersuchungen anzusehen und treten in vivo höchstwahrscheinlich nicht auf. Da die FTIR-Spektren der unter reduzierenden Bedingungen erzeugten Oligomere zudem von einer Bande bei 1 675 cm<sup>-1</sup> dominiert wurden, die  $\beta$ -turns zugeordnet wurde (Kazlauskaitė *et al.*, 2005), eine solche Struktur aber weder bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten gefunden wurde noch in der Literatur an anderer Stelle beschrieben ist, dürfte die Relevanz dieser Oligomere hinsichtlich der Fehlfaltung des PrP<sup>C</sup> eher gering sein.

Bei dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten kritischen Oligomer des SHaPrP<sup>90-232</sup> war die Disulfidbrücke intakt. Allerdings konnte keine Neurotoxizität in einer Zellkulturuntersuchung an N2a-Zellen detektiert werden. Auch wurde – wie in Abschnitt 4.6.2 noch diskutiert wird – keine Porenbildung in Membranen beobachtet, die auf eine mögliche Cytotoxizität hindeuten würde.

Dennoch weisen die Ergebnisse aus einer In-vivo-Studie darauf hin, dass intermediäre Isoformen auf dem Fehlfaltungsweg des Prionproteins eine neurotoxische Wirkung haben. So konnte anhand eines transgenen Mausmodells gezeigt werden, dass pathologische Symptome, die im frühen Stadium nach der Infektion mit PrP<sup>Sc</sup> in neuronalem Gewebe auftraten, durch eine Terminierung der PrP<sup>C</sup>-Expression rund 8 Wochen nach Infektion in den entsprechenden Zellen wieder zurückgebildet werden konnten (Mallucci *et al.*, 2003). Während Mäuse mit kontinuierlicher PrP<sup>C</sup>-Expression 12–18 Wochen nach der Infektion starben, überlebten die Mäuse, bei denen die PrP<sup>C</sup>-Expression gestoppt wurde, trotz massiver extraneuronaler Akkumulation von PrP<sup>Sc</sup> ausnahmslos, ohne klinische Symptome zu entwickeln (Mallucci *et al.*, 2003). Aus diesen Untersuchungen wurde abgeleitet, dass PrP<sup>Sc</sup> als solches offensichtlich nicht neurotoxisch ist, sondern dass Intermediate der PrP<sup>C</sup>→PrP<sup>Sc</sup>-Umwandlung für die neuronalen Schäden verantwortlich sind, die typischerweise im Verlauf einer Prionkrankheit beobachtet werden können.

**Apathogene Proteine** Auch bei Proteinen, von denen keine pathogene Wirkung in vivo bekannt ist, wurde in vitro eine Oligomerisierung und Protofibrillogeneese bzw. Fibrillogeneese beobachtet (Bucciantini *et al.*, 2002; Modler *et al.*, 2003).

Oligomere dieser verschiedenen Proteine zeigten eine hohe Cytotoxizität, während die fibrillären Formen nur moderat cytotoxisch waren (Bucciantini *et al.*, 2002). Hieraus wurde geschlossen, dass die Toxizität von oligomeren Intermediaten bei Proteinfehlfaltungskrankheiten wahrscheinlich ein allgemeines Phänomen und nicht nur auf wenige, spezielle Krankheiten beschränkt ist.

### 4.4.4 Struktur des kritischen Oligomers

#### 4.4.4.1 FTIR-spektroskopisch ermittelte Sekundärstruktur

Aus den FTIR-spektroskopischen Daten der vorliegenden Arbeit wurde eine weitgehend antiparallele intermolekulare  $\beta$ -Faltblatt-Struktur des kritischen Oligomers abgeleitet. Die entsprechenden diagnostischen Absorptionsbanden im Amid-I-Bereich lagen bei  $1620\text{--}1621\text{ cm}^{-1}$  und  $1691\text{ cm}^{-1}$ . Allein aus dem Auftreten der hochfrequenten Amid-I- $\beta$ -Faltblatt-Komponente bei  $1691\text{ cm}^{-1}$  kann noch nicht bestimmt werden, ob es sich um parallele oder antiparallele  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen handelt. Die große Frequenzdifferenz zwischen hochfrequenter und niederfrequenter  $\beta$ -Faltblatt-Bande ist aber für ausgedehnte intermolekulare antiparallele  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen charakteristisch (Kubelka und Keiderling, 2001). Sowohl bei einem parallelen  $\beta$ -Faltblatt als auch bei kürzeren antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen, die nicht planar, sondern etwas verdrillt waren<sup>5</sup>, wurden zwar auch eine hoch- und eine niederfrequente  $\beta$ -Faltblatt-Komponente im Amid-I-Bereich beobachtet, doch war die Frequenzdifferenz zwischen beiden Banden stets deutlich niedriger als beim hier untersuchten kritischen Oligomer (Kubelka und Keiderling, 2001).

Vergleicht man die in dieser Arbeit aufgenommenen FTIR-Spektren des kritischen Oligomers mit denen der *in vitro* hergestellten Fibrillen von rekombinantem menschlichem Prionprotein (Baskakov und Bocharova, 2005) und den FTIR-Spektren des aus Hamsterhirnen isolierten PrP<sup>res</sup> (Kneipp *et al.*, 2004) miteinander, fallen gravierende Unterschiede auf. Das PrP<sup>res</sup> wies anhand einer FTIR-Absorptionsbande bei  $1659\text{ cm}^{-1}$  signifikante Anteile von  $\alpha$ -helikalen Strukturen auf (Kneipp *et al.*, 2004). Diese spektrale Lage ist charakteristisch für Absorptionsbanden von  $\alpha$ -Helices in Membranproteinen. Weder die Spektren der kritischen Oligomere noch die der *in vitro* erzeugten Fibrillen verfügten hingegen über signifikante Absorptionen  $\alpha$ -helikaler Strukturen. Die FTIR-Spektren des PrP<sup>res</sup> zeigten zwei unterschiedliche  $\beta$ -Faltblatt-spezifische Banden bei  $1626$  und  $1634\text{ cm}^{-1}$  sowie eine hochfrequente

---

<sup>5</sup>Je kürzer ein  $\beta$ -Faltblatt ist, desto wahrscheinlicher nimmt es eine verdrillte Struktur an.

Komponente der  $\beta$ -Faltblatt-Absorption bei  $1694\text{ cm}^{-1}$  (Kneipp *et al.*, 2004). Diese Banden konnten zwei distinkten  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen zugeordnet werden, die sich in der Stärke ihrer Wasserstoffbrückenbindungen und wahrscheinlich hinsichtlich ihrer Anordnung (inter- bzw. intramolekular) unterschieden (Kneipp *et al.*, 2004). Demgegenüber waren die  $\beta$ -Faltblatt-Absorptionen in den FTIR-Spektren der in vitro erzeugten Fibrillen denen der kritischen Oligomere sehr ähnlich (s. o.): Banden im Amid-I- und Amid-II-Bereich bei  $1693$ ,  $1622$  und  $1535\text{ cm}^{-1}$  zeigten eine intermolekular ausgerichtete antiparallele  $\beta$ -Faltblatt-Struktur an (Baskakov und Bocharova, 2005).

Somit waren sich die Sekundärstrukturen der in der vorliegenden Arbeit hergestellten kritischen Oligomere und der von Baskakov und Bocharova (2005) in vitro erzeugten Fibrillen zwar sehr ähnlich, gegenüber dem isolierten PrP<sup>res</sup> weisen sie aber signifikante Unterschiede auf. Diese Unterschiede lassen auf eine grundsätzlich differente molekulare Organisation der In-vitro-Aggregate und des PrP<sup>res</sup> schließen. Es bleibt daher fraglich, ob die bislang in vitro erzeugten Produkte überhaupt Infektiosität tragen können (vgl. Legname *et al.*, 2004) oder ob bei der Umfaltung weitere, bislang unbekannt Parameter oder Kofaktoren notwendig sind.

#### 4.4.4.2 Mögliche alternative Sekundärstrukturen

Neben den „klassischen“  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen wurden in der Literatur für das PrP<sup>Sc</sup> noch weitere denkbare Sekundärstrukturen diskutiert, die sich möglicherweise auch auf das kritische Oligomer des SHaPrP<sup>90-232</sup> übertragen lassen könnten. So wurde beispielsweise anhand von Experimenten mittels Elektronenmikroskopie an isomorphen zweidimensionalen PrP<sup>Sc</sup>-Kristallen eine  $\beta$ -Helix-Struktur vorgeschlagen (Wille *et al.*, 2002). Aus Sequenzvergleichen mit bekannten  $\beta$ -Helix-Proteinen und Molecular-Modelling-Studien am Prionprotein konnte gezeigt werden, dass das Prionprotein sich prinzipiell als linkshändige  $\beta$ -Helix falten könnte (Govaerts *et al.*, 2004). Ein solchermaßen gefaltetes Protein ließ sich auch in elektronenmikroskopische Aufnahmen von zweidimensionalen PrP<sup>Sc</sup>-Kristallen einpassen (Govaerts *et al.*, 2004).

Aus vergleichenden FTIR-Untersuchungen mehrerer Proteine, von denen bekannt war, dass sie eine  $\beta$ -helikale Sekundärstruktur aufweisen, wurde ermittelt, dass die  $\beta$ -Helix keine eindeutig diagnostische Absorption im IR-Spektrum zeigt, sondern vielmehr Banden verursacht, die in den Bereichen auftreten, in denen auch die „klassischen“  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen absorbieren (Khurana und Fink, 2000). Eine

solche Absorptionseigenschaft konnte man auch erwarten, da es sich bei der  $\beta$ -Helix ja um eine aus  $\beta$ -Strängen gebildete Struktur handelt, die dem  $\beta$ -Faltblatt sehr ähnlich ist. Bei den  $\beta$ -Helix-Proteinen wurden u. a. Banden bei  $1\,638\text{ cm}^{-1}$  und bei  $1\,690\text{--}1\,694\text{ cm}^{-1}$  beobachtet (Khurana und Fink, 2000). Aus dem Vergleich dieser IR-Daten mit den in der vorliegenden Arbeit aufgenommenen Spektren des kritischen Oligomers kann man klar ableiten, dass das Oligomer des SHaPrP<sup>90-232</sup> keine  $\beta$ -helikale Struktur haben kann.

Für mehrere amyloidogene Proteine, u. a. auch für das Prionprotein, wurde anhand von Molecular-Modelling-Studien mit dem  $\alpha$ -Faltblatt<sup>6</sup> eine weitere mögliche Sekundärstruktur vorgeschlagen (Armen *et al.*, 2004b). Ein solches  $\alpha$ -Faltblatt könnte aus einer  $\alpha$ -Helix entstehen und das strukturbestimmende Motiv von Intermediaten der Amyloidogenese sein.<sup>7</sup> Im weiteren Verlauf des Aggregationsprozesses sollte sich dann aus dem  $\alpha$ -Faltblatt ein  $\beta$ -Faltblatt bilden (Armen *et al.*, 2004b). Da sich sowohl der meridionale Wiederholungsabstand als auch die durchschnittliche Länge der Wasserstoffbrücken zwischen  $\alpha$ -Faltblatt und  $\beta$ -Faltblatt nicht unterscheiden, ist ihre Differenzierung mittels NMR-Spektroskopie schwierig. Armen *et al.* (2004a) äußerten daher die Vermutung, dass bei NMR-spektroskopischen Untersuchungen in der Vergangenheit die Sekundärstruktur von Proteinen evtl. fälschlicherweise als  $\beta$ -Faltblatt klassifiziert wurde, obwohl es sich tatsächlich um eine  $\alpha$ -Faltblatt-Struktur handelte.

Da sich die räumliche Ausrichtung der Carbonyl- und der Aminogruppe von wechselwirkenden Peptidgruppen jedoch zwischen  $\alpha$ -Faltblatt und  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen unterscheidet, wäre möglicherweise eine Differenzierung mittels FTIR-Spektroskopie möglich. Allerdings liegen noch keine theoretischen FTIR-Daten für die Absorptionsbanden eines  $\alpha$ -Faltblatts vor, so dass eine Differenzierung zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Faltblatt mittels FTIR-Spektroskopie zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vorgenommen werden kann. Dennoch sollte man die Möglichkeit, dass das kritische Oligomer des SHaPrP<sup>90-232</sup> eine  $\alpha$ -Faltblatt-Struktur besitzt, nicht außer Acht lassen.

---

<sup>6</sup>Bei einem  $\alpha$ -Faltblatt liegen die einzelnen Aminosäurereste in alternierender  $\alpha_L$ - und  $\alpha_R$ -Konformation vor, so dass sich alle Carbonylgruppen auf der einen und alle Aminogruppen auf der anderen Seite der einzelnen Stränge des Faltblatts befinden. Ein  $\alpha$ -Faltblatt wird deswegen auch als polares Faltblatt bezeichnet. Die Wasserstoffbrücken zwischen den Carbonyl- und den Aminogruppen können im  $\alpha$ -Faltblatt gegabelt sein (Armen *et al.*, 2004a).

<sup>7</sup>Der in dieser Arbeit verwendete Begriff der  $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltung beschreibt jedoch stets die Abnahme von  $\alpha$ -helikalen Sekundärstrukturanteilen zugunsten von  $\beta$ -Faltblatt-Struktur, ohne eine mögliche Bildung von  $\alpha$ -Faltblatt-Struktur zu implizieren.

Die generelle Möglichkeit für Aggregate des Prionproteins, auch andere als die bislang etablierten Sekundärstrukturen annehmen zu können, eröffnet ggf. die Erklärung für die beobachteten besonderen funktionellen Charakteristika dieser Isoformen.

#### 4.4.4.3 Morphologische Charakterisierung

Die Stokesradien und die Massen von monomeren SHaPrP<sup>90-232</sup>-Molekülen sowie von Aggregaten des SHaPrP<sup>90-232</sup> wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit unabhängig voneinander mittels DLS und SLS bestimmt (Sokolowski *et al.*, 2003). Aus dem Massenskalengesetz

$$R = a \cdot M^{\frac{1}{d}} \quad (4.1)$$

mit dem Stokesradius  $R$ , einer Konstante  $a$ , der molekularen Masse  $M$  und der Dimensionalität  $d$  konnte so für die Bildung der kritischen Oligomere eine Dimensionalität von  $d = 2,9$  geschätzt werden (Sokolowski *et al.*, 2003). Das deutet darauf hin, dass die kritischen Oligomere durch dichtes Aneinanderpacken ihrer entsprechenden Grundbausteine in einem nahezu dreidimensionalen Wachstumsprozess entstanden sein könnten und eine annähernd kugelförmige Gestalt aufwiesen. Eine solche Gestalt würde allerdings den beobachteten ringförmigen Strukturen der Oligomere widersprechen.

Demgegenüber konnte aus den Messungen mittels AFM eine Höhe der kritischen Oligomere bestimmt werden, die nur rund einem Viertel ihrer lateralen Ausdehnung entsprach. Der scheinbare Widerspruch zwischen den Messungen mittels Lichtstreuung und AFM ließe sich dadurch erklären, dass die Oligomere tatsächlich eher eine scheibenförmige Struktur aufwiesen, diese aber in den DLS-Experimenten durch Mittelung der Streuintensitäten unterschiedlich orientierter Oligomere als kugelförmig erschien.

#### 4.4.4.4 Vergleich mit der Struktur amyloider Fibrillen

Bedingt durch die offensichtlich zahlreichen möglichen unterschiedlichen Konformationen amyloidogener Proteine sind die morphologischen Eigenschaften und die molekulare Struktur von amyloiden Fibrillen durchaus divers (Tycko, 2004). So konnten bei Fibrillen des A $\beta$  je nach Länge des zur In-vitro-Erzeugung der Fibrillen untersuchten Peptids sowohl parallele als auch antiparallele  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen identifiziert werden (Cleary *et al.*, 2005). Charakteristisch ist jedoch die (definitions-

gemäß) grundsätzliche Anordnung der  $\beta$ -Faltblätter bei amyloiden Fibrillen in einem sog. *cross- $\beta$* -Motiv: Die einzelnen  $\beta$ -Stränge laufen dabei nahezu rechtwinklig zur Achse der Fibrille (siehe beispielsweise Tycko, 2004). Dieses *cross- $\beta$* -Motiv ist natürlich auch unter Annahme der Ausbildung von  $\alpha$ -Faltblättern als *cross- $\alpha$* -Motiv denkbar. Ebenso ist die Ausbildung von  $\beta$ -Helices mit dem *cross- $\beta$* -Motiv vereinbar.

Die beim A $\beta$  beobachtete strukturelle Variabilität der Fibrillen könnte eine gute Erklärung für die verschiedenen sog. Stämme<sup>8</sup> des Prionproteins sein. Bei den einzelnen Prionstämmen konnten bereits jeweils unterschiedliche  $\beta$ -Faltblatt-Konformationen des PrP<sup>res</sup> identifiziert werden (Caughey *et al.*, 1998). Aufbauend auf diesen Versuchen hat sich die FTIR-Spektroskopie als effektive Methode zur Stammdifferenzierung bewährt (Thomzig *et al.*, 2004). Zwar werden auch stets Unterschiede in den Glykosylierungsmustern als stammspezifische Eigenschaft des Prionproteins diskutiert (Atkinson, 2004), doch könnte die molekulare Ursache für die Existenz verschiedener Stämme plausibel aus einer Konformationsdiversität der fibrillären  $\beta$ -Faltblatt-Struktur des PrP<sup>Sc</sup> abgeleitet werden (Caughey *et al.*, 1998; Tycko, 2004).

Es sei an dieser Stelle noch einmal erwähnt, dass die während der In-vitro-Amyloidogenese unterschiedlicher Proteine aufgetretenen oligomeren Intermediate im Gegensatz zu den Fibrillen eine offensichtlich einheitliche Sekundärstruktur aufwiesen (Kayed *et al.*, 2003). Zusammen mit der Konformationsdiversität der amyloiden Fibrillen ist das ein weiterer Hinweis auf möglicherweise getrennte Faltungswege vom nativen Protein zu Oligomeren bzw. zu Fibrillen.

## 4.5 Temperaturinduzierte Denaturierung/Aggregation

Wie für einen multimolekularen Prozess erwartet, war die in der vorliegenden Arbeit bestimmte Denaturierungstemperatur des SHaPrP<sup>90-232</sup> von der Proteinkonzentration abhängig. Bei der thermischen Denaturierung aggregierte das SHaPrP<sup>90-232</sup> unspezifisch und irreversibel. Die Wahl des Lösungsmittels (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O bzw. 20 mM NaD<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in D<sub>2</sub>O) hatte dabei keinen Einfluss auf die Denaturierungstemperatur und die Aggregation des SHaPrP<sup>90-232</sup>. Eine Konzentrations-

---

<sup>8</sup>Es sind unterschiedliche PrP<sup>Sc</sup>-Typen bekannt, die in erkrankten Individuen divergierende histopathologische Schädigungen hervorrufen (siehe beispielsweise Bruce, 2003). Diese verschiedenen PrP<sup>Sc</sup>-Typen werden durch die Existenz von verschiedenen Stämmen des Prionproteins erklärt.

abhängigkeit der Denaturierungstemperatur konnte zuvor auch schon für rekombinantes menschliches Prionprotein beobachtet werden (Jackson *et al.*, 1999a).

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werte von rund 43 °C (bei einer SHaPrP<sup>90-232</sup>-Konzentration von 4 mg · ml<sup>-1</sup>) und rund 41 °C (bei 8 mg · ml<sup>-1</sup>) fielen allerdings niedriger aus als die für rekombinantes Hamster-Prionprotein publizierten Werte der Denaturierungstemperatur von 52,2 °C (bei einer Proteinkonzentration von 2,4 mg · ml<sup>-1</sup>; Zhang *et al.*, 1997) und 57,8 °C (bei 0,5 mg · ml<sup>-1</sup>; Torrent *et al.*, 2003). Trotz der ermittelten Konzentrationsabhängigkeit der Denaturierungstemperatur und unter Berücksichtigung der in den genannten Untersuchungen verwendeten Prionproteinkonstrukte, die in ihrer Primärstruktur leicht differierten (vgl. hierzu Abschnitt 2.1.1.1; Kozin *et al.*, 2001; Alvarez-Martinez *et al.*, 2003), sowie der unterschiedlichen Untersuchungsmethoden können die beobachteten Unterschiede bislang nicht zufriedenstellend erklärt werden.

Aus den in dieser Arbeit ermittelten FTIR-Daten konnte jedoch die unterschiedliche Stärke der Wasserstoffbrücken in den temperaturinduzierten Aggregaten und den kritischen Oligomeren zweifelsfrei abgeleitet werden, die auf eine unterschiedliche molekulare Struktur beider Aggregationsformen des SHaPrP<sup>90-232</sup> hindeutet.

In der Literatur wurde berichtet, dass sich beim Erwärmen des rekombinanten Prionproteins des Schafs (ovPrP<sup>23-234</sup>) auf 45 °C bei pH 3,4 zwei distinkte  $\beta$ -Faltblatt-reiche oligomere Aggregate bildeten (Rezaei *et al.*, 2005). Die  $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltung des ovPrP<sup>23-234</sup> erfolgte dabei wahrscheinlich über ein transientes ungefaltetes Intermediat (Rezaei *et al.*, 2005). Diese Daten geben einen weiteren Hinweis darauf, dass der temperaturinduzierten Aggregation des Prionproteins andere molekulare Vorgänge zugrunde liegen als der Bildung kritischer Oligomere.

## 4.6 Wechselwirkung des SHaPrP<sup>90-232</sup> mit Membranen

### 4.6.1 Molekulare Ursachen der Wechselwirkung

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Wechselwirkung des SHaPrP<sup>90-232</sup> mit Membranen hatte sich gezeigt, dass das kritische Oligomer nicht stärker als das Monomer mit Membranen interagiert, sondern in Abhängigkeit des pH-Werts schwächer oder maximal vergleichbar stark. Die gegenüber dem Monomer schwächere Wechselwirkung des kritischen Oligomers bei pH 7,0 lässt sich

möglicherweise durch die bereits erwähnte verminderte Stabilität bzw. erhöhte Präzipitationsneigung des kritischen Oligomers bei neutralem pH-Wert erklären: Wenn ein Teil der Oligomere beim Kontakt mit dem Puffer unspezifisch präzipitierte, würde die effektive Oligomerkonzentration im Vergleich mit der Konzentration des bei pH 7,0 stabilen Monomers verringert werden, so dass man eine scheinbar verminderte Wechselwirkung detektieren würde. Die eingesetzte Proteinkonzentration war allerdings zu niedrig, um eine mögliche Präzipitation der Oligomere direkt beobachten zu können.

Sowohl die Monomere als auch die Oligomere zeigten deutliche Wechselwirkungen mit dem negativ geladenen Phosphatidylserin (PS), aber keine Wechselwirkung mit dem neutralen Phosphatidylcholin (PC). Eine solche Modulation der SHaPrP<sup>90-231</sup>-Membran-Interaktion in Abhängigkeit von der Ladung der verwendeten Lipide wurde auf Basis von Daten aus weniger spezifischen Experimenten bereits beschrieben (Sanghera und Pinheiro, 2002).

Im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit aus FRET-Messungen gewonnenen Daten, die zeigten, dass monomeres SHaPrP<sup>90-232</sup> an vesikuläre Membranen aus PS bei pH 7,0 stärker als bei pH 4,2 bindet, wurde von Sanghera und Pinheiro (2002) bei pH 7,0 eine schwächere Bindung von SHaPrP<sup>90-231</sup> an vesikuläre Membranen aus Palmitoyl-oleoylphosphatidylglycerin (POPG) als bei pH 5,0 beobachtet. Letzteres Ergebnis wurde dahin gehend interpretiert, dass die elektrostatischen Anziehungskräfte zwischen Protein und Lipid bei pH 5,0 größer sind als bei pH 7,0.

Dieser scheinbare Widerspruch zwischen den hier erhaltenen Daten und den Literaturwerten lässt sich durch die unterschiedlichen Rahmenbedingungen der jeweiligen Experimente erklären: Aus den pK<sub>a</sub>-Werten der Phosphodiester-Phosphatgruppen von PS und POPG von jeweils 1–2 (Safar *et al.*, 2005) sowie einem pK<sub>a</sub>-Wert von 3,6 für die Carboxylatgruppe des PS (Tsui *et al.*, 1986) resultiert, dass beide Lipide bei pH 4,2 bzw. 5,0 noch negativ geladen sind. Die negative Gesamtladung des POPG ist bei pH 5,0 jedoch größer als die des PS bei pH 4,2. Umgekehrt trägt das SHaPrP<sup>90-232</sup> mittlere positive Nettoladungen von 3,4 (bei pH 7,0), 9,8 (bei pH 5,0) und 14,7 (bei pH 4,2).<sup>9</sup> Die hohe positive Ladung des SHaPrP<sup>90-232</sup> bei pH 4,2 kann die verringerte negative Ladung des PS offensichtlich nicht mehr ausgleichen – die für die elektrostatische Interaktion notwendige effektive Ladungs-

---

<sup>9</sup>Berechnet nach [http://www.iut-arles.up.univ-mrs.fr/w3bb/d\\_abim/compo-p.html](http://www.iut-arles.up.univ-mrs.fr/w3bb/d_abim/compo-p.html).

differenz<sup>10</sup> zwischen SHaPrP<sup>90-232</sup> und PS ist bei pH 7,0 augenscheinlich größer als bei pH 4,2.

Wichtige Bedeutung für die beobachteten Prionprotein-Membran-Interaktionen könnten auch die Mikroumgebungen der Wasserstoffbrücken im Prionprotein haben. So wurde gezeigt, dass Proteine, deren Wasserstoffbrücken nicht effektiv gegen äußere Wechselwirkungspartner abgeschirmt sind, dazu neigen, sowohl intermolekulare Wasserstoffbrücken auszubilden als auch verstärkt mit Membranen zu interagieren (Fernández und Berry, 2003). Durch die Bestimmung des Ausmaßes der Wasserstoffbrücken-Abschirmung konnten rund 2800 Proteine als „normal löslich“ oder aber „amyloidogen“ klassifiziert werden (Fernández und Berry, 2003). Die Prionproteine verschiedener Spezies wiesen dabei eine derart niedrige Wasserstoffbrücken-Abschirmung auf, wie sie sonst nur bei Toxinen oder Membranproteinen beobachtet werden konnte. Im Vergleich mit anderen bekanntermaßen amyloidogenen Proteinen hatten die Prionproteine verschiedener Spezies zudem den höchsten Anteil an ungeschützten Wasserstoffbrücken (Fernández und Berry, 2003).

Diese strukturelle Besonderheit der Prionproteine könnte erklären, warum die in dieser Arbeit beobachteten Membranwechselwirkungen der kritischen Oligomere des SHaPrP<sup>90-232</sup> nicht stärker als die der SHaPrP<sup>90-232</sup>-Monomere waren: Ein Teil der in den Monomeren ungeschützten Wasserstoffbrücken ist in den Oligomeren durch intermolekulare Kontakte wahrscheinlich besser geschützt.

#### 4.6.2 Auswirkungen der Interaktion auf die Membranen

Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen an rekonstituierten planaren Membranen konnte keine Porenbildung durch die SHaPrP<sup>90-232</sup>-Oligomere beobachtet werden. Da eine Porenbildung bei der verwendeten Technik nur durch einen etwaigen ladungsträgervermittelten Stromfluss detektiert werden konnte, mussten die entsprechenden Subphasen eine Ionenstärke aufweisen, die für eine gute Leitfähigkeit ausreichend hoch war. So wurde mit NaCl-Konzentrationen von 80 und 200 mM gearbeitet. Im Fall der in der Literatur beschriebenen Wechselwirkung von SHaPrP<sup>90-231</sup> mit POPG bei pH 5 verursachten allerdings schon NaCl-Konzentrationen von 20 mM eine Erniedrigung der Prionprotein-Lipid-Assoziation um 50 % (Critchley *et al.*, 2004). Offensichtlich findet eine Konkurrenz zwischen

---

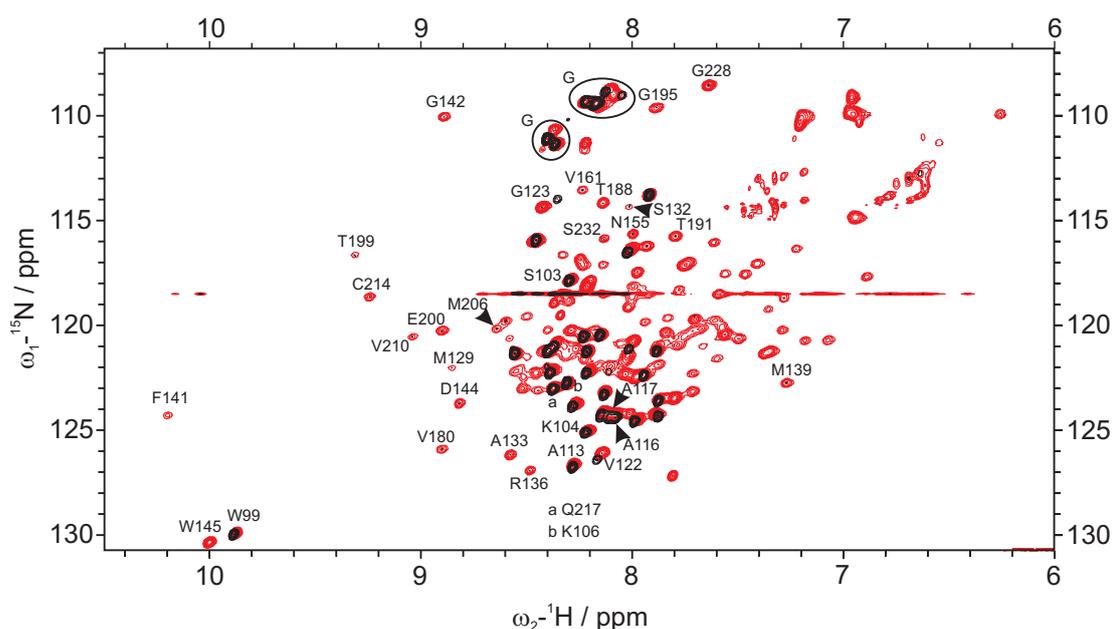
<sup>10</sup>Die effektive Ladungsdifferenz kann nicht direkt bestimmt werden, da noch nicht bekannt ist, welche Bereiche des Proteins für die Interaktion mit dem Lipid eine Rolle spielen und die Ladung nicht gleichmäßig über das Protein verteilt ist.

den freien Ionen und den Ladungen des Lipids statt, die das Modell der ladungsvermittelten Interaktion zwischen Prionprotein und Lipid unterstützt. Man muss daher berücksichtigen, dass die Wechselwirkungen, die bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen an rekonstituierten planaren Membranen beobachtet wurden, ggf. schwächer waren, als sie in einem Puffer mit sehr niedriger Ionenstärke gewesen wären. Aber da bei NaCl-Konzentrationen gearbeitet wurde, die in der Größenordnung der physiologischen Konzentration (154 mM) lagen, können die Daten dieser Arbeit prinzipiell besser mit den Vorgängen *in vivo* verglichen werden als entsprechende Daten aus Untersuchungen bei sehr niedriger Ionenstärke.

Kürzlich konnte an Zellkulturen gezeigt werden, dass Prionprotein-Oligomere wie auch die Oligomere anderer krankheitsassoziiierter Proteine *in vitro* eine Destabilisierung von zellulären Membranen verursachen, die sowohl zum Calcium-Einstrom in die Zellen als auch zu einem Ausstrom von polyanionischen Fluoreszenzfarbstoffen aus den Zellen führte (Demuro *et al.*, 2005). Diese Versuche sind ein deutliches Indiz dafür, dass durch die jeweiligen Oligomere keine spezifischen (Kationen-)Kanäle gebildet werden, sondern die Protein-Membran-Interaktionen vielmehr zu einer allgemeinen Membranstörung führen. Da diese Effekte bei allen der untersuchten krankheitsassoziierten Proteine beobachtet wurden, wird für die dargestellten Membranwechselwirkungen ein genereller oligomerspezifischer Prozess vermutet, der nicht durch die Aminosäuresequenz des jeweiligen Proteins, sondern vielmehr durch die spezielle Oligomerstruktur vermittelt werden soll (Demuro *et al.*, 2005). Dies ist ein weiterer Hinweis auf die oben erwähnte gemeinsame Struktur der Oligomere amyloidogener Proteine. Zudem bestätigen die Daten der porenunabhängigen Membrandestabilisierung die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse der Protein-Membran-Interaktion zwischen dem SHaPrP<sup>90-232</sup> und den untersuchten Modellmembranen.

## 4.7 Ausblick

Wie in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt werden konnte, spielen die kritischen Oligomere des SHaPrP<sup>90-232</sup> eine wichtige Rolle bei der Aggregation des rekombinanten Prionproteins. Ihre Bildung, ihre morphologischen Eigenschaften und ihre Wechselwirkungen mit Membranen wurden in dieser Arbeit eingehend charakterisiert. Um die *In-vitro*- bzw. *In-vivo*-Funktion der kritischen Oligomere besser verstehen zu können, wäre es darüber hinaus von großem Vorteil, ihre Raumstruktur



**Abbildung 4.3:** TROSY-Spektren vom Monomer (rote Signale) und vom kritischen Oligomer (schwarze Signale) des  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ -SHaPrP $^{90-232}$ . Die Zuordnung der Signale erfolgte auf der Grundlage von MUSIC- und Tripelresonanzexperimenten sowie durch den Vergleich mit den von Liu *et al.* (1999) publizierten Daten. Die durch schwarze Ellipsen markierten Signale konnten bereits Glycinresten zugeordnet werden, allerdings ist eine genaue sequenzspezifische Identifikation der einzelnen Signale derzeit noch nicht möglich.

aufzuklären bzw. ihre Sekundärstruktur hochaufgelöst zu bestimmen. Ausgehend von solchen Daten könnte man ein Modell der intermolekularen Kontakte zwischen den einzelnen Monomereinheiten entwickeln, um so die Oligomerisierung und Protofibrillogenese sowie daraus resultierende funktionelle Charakteristika des Proteins auf molekularer Ebene besser zu verstehen.

Zu diesem Zweck wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit erste NMR-spektroskopische Untersuchungen am monomeren und am oligomeren  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ -SHaPrP $^{90-232}$  durchgeführt. Die HSQC-Spektren des monomeren SHaPrP $^{90-232}$  wiesen – abgesehen von einigen Differenzen, die auf unterschiedliche experimentelle pH-Werte zurückgeführt werden konnten – eine weitgehende Übereinstimmung mit den von Liu *et al.* (1999) publizierten Daten auf.

Aber auch die TROSY-Spektren des Monomers und des kritischen Oligomers sind sich erstaunlich ähnlich (Abb. 4.3). Es ist allerdings auffällig, dass im Oligomerspektrum mit rund 35 Signalen nur ein kleiner Teil der Signale des Monomerspektrums detektiert werden konnte. Da im Prinzip jedes  $^{15}\text{N}$ -Atom ein Signal im TROSY-Spektrum hervorruft, würde man allein 147 Signale der Stickstoffatome des Proteinrückgrats erwarten.

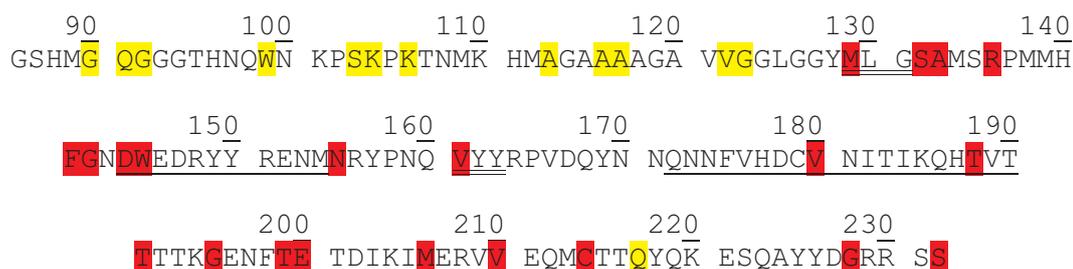
Aus der großen Ähnlichkeit der im Monomer- und im Oligomerspektrum beobachteten Signale kann man schließen, dass es in den entsprechenden Teilbereichen des SHaPrP<sup>90-232</sup> infolge der  $\alpha \rightarrow \beta$ -Umfaltung zu keinen strukturellen Änderungen kommt. Eine Umwandlung der Proteinstruktur geht nämlich mit einer Änderung der elektronischen Umgebung für jedes N–H-Atompaar einher, die sich direkt in veränderten chemischen Verschiebungen niederschlägt.

Durch Aufnahme von HSQC-Spektren nach dem MUSIC-Kohärenztransfer-schema konnten bereits einige der Signale im TROSY-Spektrum des Oligomers einem bestimmten Aminosäuretyp zugeordnet werden. Durch Tripelresonanzexperimente bzw. durch den Vergleich mit den von Liu *et al.* (1999) publizierten und zugeordneten HSQC-Signalen konnten ferner erste TROSY-Signale einzelnen Aminosäureresten des SHaPrP<sup>90-232</sup>-Oligomers zugeordnet werden. Schließlich ließen sich durch Vergleich der Signale des SHaPrP<sup>90-232</sup>-Monomers mit denen des kritischen Oligomers schon einige Aminosäurereste eindeutig identifizieren, deren Signale zwar im Monomerspektrum, nicht aber im Oligomerspektrum detektiert wurden.

Diese Auswertungen ergaben, dass die im TROSY-Spektrum beobachteten Signale des kritischen Oligomers hauptsächlich von Aminosäureresten im N-Terminus des Proteins stammten (Abb. 4.4). Dieser Bereich ist im SHaPrP<sup>90-232</sup>-Monomer unstrukturiert und flexibel. Da die entsprechenden NMR-Signale des Monomers und die des kritischen Oligomers, wie erwähnt, sehr gut überlagert werden konnten, sind die zugehörigen Aminosäurereste mit hoher Wahrscheinlichkeit auch im Oligomer Bestandteil eines unstrukturierten Proteinabschnitts.

Demgegenüber konnten bislang praktisch noch keine Signale aus dem Oligomerspektrum eindeutig solchen Aminosäuren, die in Abschnitten geordneter Sekundärstruktur des nativen Monomers liegen, zugeordnet werden. Die einzige Ausnahme stellt hier Glutamin-217 dar, das im Monomer in der dritten  $\alpha$ -Helix nahe an der Disulfidbrücke des SHaPrP<sup>90-232</sup> lokalisiert ist.

Die unerwartet geringe Anzahl von Signalen im Oligomerspektrum lässt sich zusammen mit der Tatsache, dass die Signale bislang hauptsächlich Aminosäureresten in strukturell ungeordneten Bereichen des kritischen Oligomers zugeordnet werden konnten, folgendermaßen erklären: Die kritischen Oligomere als besonders große Moleküle reorientieren sich nur sehr langsam in Lösung. Je länger die Reorientierungszeit (auch Korrelationszeit  $\tau_c$  genannt) eines Moleküls ist, desto schneller zerfällt die detektierbare Magnetisierung (sog. freier Induktionszerfall). Damit wird die charakteristische Zeitkonstante, die sog.  $T_2$ -Zeit, in der ein Signal aufgenommen werden



**Abbildung 4.4:** Übersicht über bislang identifizierte Aminosäurereste des  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ -SHaPrP $^{90-232}$ , deren Signale im TROSY-Spektrum des kritischen Oligomers detektiert bzw. nicht detektiert werden konnten. Signale der gelb hinterlegten Aminosäurereste wurden im Oligomerspektrum beobachtet; Signale der rot hinterlegten Aminosäurereste konnten nur im Monomerspektrum beobachtet werden. In der SHaPrP $^{90-232}$ -Sequenz einfach unterstrichene Aminosäurereste bilden im monomeren, nativ gefalteten SHaPrP $^{90-232}$   $\alpha$ -Helices, während die doppelt unterstrichenen Aminosäurereste  $\beta$ -Stränge formen.

kann, kürzer. Da die  $T_2$ -Zeit die Linienbreite eines Signals bestimmt (es erfolgt eine Fourier-Transformation des zeitabhängigen Signals in den Frequenzraum), weisen große Proteine im Experiment Signale mit hoher Linienbreite auf. Bei sehr großen Proteinen ist die  $T_2$ -Zeit schließlich so kurz, dass Signale von strukturierten Bereichen des Moleküls nicht mehr beobachtet werden können, während unstrukturierte Bereiche aufgrund ihrer höheren Flexibilität noch NMR-Signale liefern.

Aus den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen FTIR-Daten ist bekannt, dass die strukturierten Bereiche der kritischen Oligomere  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen bilden. Man kann davon ausgehen, dass die kritischen Oligomere nicht aus einem einzigen linear ausgedehnten  $\beta$ -Faltblatt bestehen, da ihr Durchmesser 10–15 nm beträgt (vgl. Abschnitte 3.2.3 und 3.2.4), das Proteinerückgrat eines jeden Aminosäurerests in einem  $\beta$ -Faltblatt aber bereits 0,35 nm beansprucht (Stryer, 1996). Zwischen den einzelnen  $\beta$ -Strängen liegen folglich aller Wahrscheinlichkeit nach Schleifen oder *turns*.

Für den Fall, dass man mehrere Resonanzsignale Aminosäureresten aus solchen Schleifen- oder *turn*-Strukturen zuordnen kann, hat man die Möglichkeit, mit Hilfe von NOESY-Daten die Struktur der verschiedenen Schleifen oder *turns* und ihre Wechselwirkungen untereinander zu bestimmen. Insbesondere müssten die intra- bzw. intermolekularen Kontakte dieser Bereiche strukturell genau charakterisiert werden. Nimmt man die  $\beta$ -Faltblatt-Struktur der nicht detektierbaren Bereiche auf der Grundlage der FTIR-Daten der vorliegenden Arbeit als gegeben an, kann man schließlich ein Modell für die kritischen Oligomere konstruieren. In den nächsten

Monaten sollen durch zusätzliche Experimente und weitergehende Auswertung der bereits gewonnenen Daten entsprechende Informationen erarbeitet werden.

Ist die Raumstruktur des kritischen Oligomers bekannt, können die molekularen Mechanismen der in der vorliegenden Arbeit beobachteten bzw. in der Literatur beschriebenen Wechselwirkungen des Oligomers mit Membranen und seine wahrscheinlich daraus resultierende Cytotoxizität besser verstanden werden. Die generelle Rolle von Oligomeren auf dem Fehlfaltungsweg des Prionproteins kann dann weitaus sicherer bewertet werden, als es bislang möglich ist.