

5 Zusammenfassung

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

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

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

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

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

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

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

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

Um die Bildung der kritischen Oligomere von der Entstehung temperaturinduzierter Aggregate des SHaPrP^{90–232} abgrenzen zu können, wurde die thermische Denaturierung des Proteins FTIR-spektroskopisch untersucht. Die durch Inkubation oberhalb der Denaturierungstemperatur entstandenen β -Faltblatt-Strukturen riefen Absorptionsbanden hervor, die von denen der kritischen Oligomere klar unterschieden werden konnten. So zeigten die bei der thermischen Denaturierung beobachteten β -Faltblatt-spezifischen Amid-I-Differenzbanden bei 1690 und 1624 cm^{-1} zwar auch eine antiparallele, intermolekulare β -Faltblatt-Struktur an, doch waren deren Wasserstoffbrücken deutlich schwächer als die des β -Faltblatts in den kritischen Oligomeren.

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

