

Technische Universität München
Physik-Department E17

**Charakterisierung des Kupferbindungsplatzes des Prion-Proteins mit Hilfe von
EPR- und ENDOR-Spektroskopie**

Matthias Mentler

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Peter Vogl.

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Fritz. G. Parak
2. Univ.-Prof. Dr. Josef Friedrich

Die Dissertation wurde am 09.06.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 06.07.2004 angenommen.

Für meine Großmutter Olga Saurer
und meine Mutter Margit Mentler-Saurer

Zusammenfassung	III
Symbole und Abkürzungen	V
1 Einleitung	1
2 Theoretische Grundlagen	10
2.1 EPR.....	10
2.1.1 Grundlagen	10
2.1.2 Hyperfeinwechselwirkung	12
2.1.3 Spektren gefrorener Lösungen – Winkelmitelung	15
2.1.4 Auswertung von EPR Spektren.....	18
2.2 ENDOR	18
2.2.1 Kern-Zeeman Effekt.....	18
2.2.2 Dipol-Dipol Wechselwirkung	19
2.2.3 Isotrope Hyperfeinwechselwirkung	21
2.2.4 Der ENDOR Effekt	23
2.2.5 Winkelsektion mit ENDOR-Spektroskopie	25
2.2.6 Anzahl und Lage von Protonresonanzen.....	27
2.3 Gepulste EPR-Spektroskopie	29
2.3.1 Spin–Spin und Spin–Gitter Relaxationszeit.....	32
2.3.2 Spin Echo	35
2.3.3 Inversion Recovery	36
2.3.4 ESEEM.....	36
2.4 EXAFS-Spektroskopie	38
3 Experimenteller Aufbau	42
3.1 Auf EPR basierende Methoden.....	42
3.2 EXAFS	43
4 Probenpräparation.....	45
4.1 Prion-Protein Mono- und Tetra-Octarepeat Peptide	45
4.2 Das rekombinante menschliche Prion-Protein	45
5 Prion-Protein Octarepeat-Fragmente.....	49
5.1 EPR-Spektroskopie	49
5.1.1 Der Einfluß des Lösungsmittels auf den Octarepeat-Komplex.....	49
5.1.2 Der Tetraoctarepeat-Komplex.....	56
5.2 ENDOR- und ESEEM-Spektroskopie	57
5.3 EXAFS-Spektroskopie	65
6 Das humane Prion-Protein.....	67
6.1 EPR-Spektroskopie	67
6.2 ENDOR-Spektroskopie.....	71
6.3 EXAFS-Spektroskopie.....	73
7 Iterative Verfeinerung der Struktur des Prion-Protein-Octarepeats.....	74
7.1 Entwicklung eines Basismodells.....	75
7.2 Generierung aller möglichen Konfigurationen	77
7.3 Auswahl der mit den Messungen kompatiblen Konfigurationen.....	84
8 Diskussion	89
8.1 Strukturbestimmung des Prion-Protein-Octarepeats in NEM.....	89

8.2	Vergleich mit Modellen aus der Literatur	91
8.3	Struktur des Octarepeats in DPC-Micellen	97
8.4	Der Einfluß der Umgebung	99
8.5	Der Kupfer-Bindungsplatz im humanen Prion-Protein.....	101
	Literaturverzeichnis	104
	Anhang A: Maple Skript zur Berechnung von Spinmatrizen	108
	Anhang B: Xepr-Skript zur Steuerung von Langzeit-ENDOR-Messungen	109
	Anhang C: Vergleich der g- und A-Tensorwerte gefitteter EPR Spektren.....	111
	Anhang D: Aufschlüsselung einer Auswahl von Proben nach Peisach-Blumberg-Korrelationen.....	112
	Anhang E: Tabelle der den Peisach-Blumberg-Korrelationen zugrundeliegenden Komplexe	113
	Anhang F: ENDOR-Spektren der Probe 102.1	114
	Anhang G: ENDOR-Spektren der Probe 117.2	115
	Anhang H: ENDOR-Spektren der Probe 111.1/115.1	116
	Anhang I: ENDOR-Spektren der Probe 202.2.....	117
	Anhang J: Koordinaten des Octarepeat/Cu-Komplexes im PDB Format.....	118
	Anhang K: Abbildungsverzeichnis	120
	Anhang L: Tabellenverzeichnis	125

Zusammenfassung

Es gilt als gesichert, dass Prionen Auslöser einer Reihe neurodegenerativer Krankheiten beim Menschen (Creutzfeldt-Jakob-Krankheit) und Tieren (BSE) sind. Die Krankheitserreger, Prionen, entstehen aus dem nativen, membrangebundenen Prion-Protein (PrP^c) durch eine Änderung der Sekundär- und Tertiärstruktur. Es ist bekannt, dass Prion-Proteine spezifisch Kupfer binden. Eine Proteinstruktur des N-terminalen Teils existiert nicht. Paramagnetisches Cu behindert den Einsatz etablierter Methoden zur Strukturaufklärung auf Basis der NMR-Spektroskopie. Lediglich die Struktur des C-terminalen Teils (Residuen 121-231) wurde mittels NMR-Spektroskopie gelöst.

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Untersuchung des Kupferbindungsplatzes im N-terminalen Teil des Proteins. Dieser besteht aus vier Wiederholungen einer Sequenz aus acht Aminosäuren, der Octarepeat-Sequenz. Untersuchungen wurden sowohl an synthetisierten Octapeptiden in unterschiedlichen Puffersystemen als auch an vollständigen humanen Prion-Proteinen durchgeführt.

Die Qualität der Peptid-Cu-Komplexe in verschiedenen Umgebungen wurde zunächst mit EPR-Spektroskopie untersucht. Es zeigen sich erhebliche Unterschiede bei den Puffersystemen, sowohl in der Löslichkeit der Peptide, als auch in der Komplexbildung selbst. Es ist wahrscheinlich, dass freie Elektronenpaare des Puffermediums (beispielsweise NEM) die Komplexgeometrie stabilisieren. Um die natürliche Umgebung des Prion-Proteins besser zu simulieren wurde ein neues Puffersystem entwickelt, das DPC-Micellen enthält. Es stabilisiert den Komplex in ähnlicher Weise wie ein NEM-haltiges Lösungsmittel.

Versuche, die Struktur des Cu-Bindungsplatzes mit NMR-Strukturaufklärung zu bestimmen, liegen bisher nicht vor. Daher wurde eine alternative Methode zur Strukturbestimmung entwickelt. Aus der EXAFS-Spektroskopie lagen Informationen über den Abstand der ersten Liganden zum Cu-Zentrum vor. Er beträgt etwa 1.95\AA . Außerdem wurde das Ligandieren eines His-Imidazolrings nachgewiesen. Der Bindungswinkel des His- N_δ wurde auf $\text{Cu-N}_\delta\text{-C}_\gamma=133^\circ$ bestimmt. Die Vorliegende Arbeit konzentrierte sich auf EPR- und ENDOR-Spektroskopie. Mit EPR wurde die axiale Symmetrie des Komplexes und die ligandierenden Atomarten, 3 Stickstoffatome und 1 Sauerstoffatom, bestimmt. Der Abstand von Protonen und deren Lage bezüglich der Molekül-Symmetrieachse ist durch ENDOR-Spektroskopie

bestimmbar. Charakteristische Linien zeigen beispielsweise His- $H_{\epsilon 1}$ und die H_{α} -Protonen der Glycine. Die Lage von weit entfernten Stickstoffatomen wird mit ESEEM-Spektroskopie bestimmt. Die Koordination eines Imidazolrings, die aufgrund charakteristischer EXAFS-Spektren bereits vermutet wurde, konnte so bestätigt werden. Außerdem stehen für die Peptidkette stereochemische Informationen wie Bindungswinkel, Bindungslängen oder die Planarität der Peptidbindung zur Verfügung. Die unterschiedliche Natur der Abstandsinformationen verglichen mit der NMR-Spektroskopie machte eine neuartige Strategie für die Simulated-Annealing-Computeroptimierung nötig. Sie wurde in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für BioMolekulare Optik, LMU München, entwickelt. Bei diesem Rechenverfahren wurde ein kombinatorischer Ansatz verfolgt. Computermodelle von insgesamt 189 verschiedenen Komplexkonfigurationen wurden generiert, von jeder dieser Konfigurationen wurden 1200 Peptidkonformationen errechnet. Nach einer Plausibilitätsprüfung dieser insgesamt 226800 Konformationen und nach Überprüfung ihrer Kompatibilität mit allen gemessenen Daten ergibt sich eine axialsymmetrische Struktur. Bei ihr ligandieren das N_{δ} des Imidazolrings, die Rückgratstickstoffe von Gly3 und Gly4, und der Carbonylsauerstoff des Gly4 in einer Ebene. In der axialen Position koordiniert ein Wassermolekül.

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen der Octarepeat-Cu-Komplexe sind nicht ohne weiteres auf kupferbeladene Prion-Proteine übertragbar. Da sich die EPR-Spektren der Prion-Proteine von denen der Peptide unterscheiden, kann die Komplexierung des Cu mit 4 Stickstoffatomen nicht ausgeschlossen werden. Die ähnliche Lage der ENDOR-Resonanzen belegt eine ähnliche planare Koordination der Stickstoffe wie bei den Octapeptiden. Die Untersuchungen an vollständigen humanen Prion-Proteinen ergeben außerdem eine starke Abhängigkeit der gebildeten Komplexe vom pH-Wert. Bei zunehmendem pH-Wert werden weitere Cu-Bindungsstellen deprotoniert. Bis jetzt sind 5 Cu-Bindungsplätze mit hoher Affinität dokumentiert. Während bei Octapeptid/Cu-Komplexen die Bildung von Doppelkomplexstrukturen zuverlässig ausgeschlossen werden kann, ist das bei vollständigen Prion-Protein-Proben wesentlich aufwendiger. Die notwendigen EPR-Titrationsexperimente sind noch nicht abgeschlossen.

Symbole und Abkürzungen

Abkürzung	
BSE	B ovine S pongiform E ncephalopathy
CD	C ircluar d ichroismus
CJD	C reutzfeldt- J akob- D isease
CW	C ontinuous W ave
CWD	C hronic W asting D isease
DDT	D ichlorodiphenyltrichloroethan
DMF	D imethylformamid
DPC	D odecylphosphocholin
EDTA	E thyl e diamin e tetra a cetic acid
ENDOR	E lectron N uclear D ouble R esonance
EPR	E lectron P aramagnetic R esonance
ESEEM	E lectron S pin E cho E nvelope M odulation
ESR	E lectron S pin R esonance
EXAFS	E xtended X -ray A bsorption F ine S tructure
fCJD	F amilial C reutzfeldt- J akob- D isease
FFI	F atal F amilial I nsomnia
Gly	Glycin
GSS	G erstmann- S träussler- S cheinker-Syndrom
HEPES	N -2- H ydroxyethylpiperazine- N' -2-ethanesulfonsäure
HF	H yper f ein
His	H istidin
hPrP	h umanes P rion- P rotein
iCJD	I ntarogen C reutzfeldt- J akob- D isease
IPTG	I sopropyl-beta- D -thiogalactopyranoside
MES	2-(N - M orpholino)-ethanesulfonsäure
MOPS	3-(N - M orpholino)-propanesulfonsäure
MW	M ikrowelle
NEM	N - E thyl- M orpholin
nvCJD	N ew variant C reutzfeldt- J akob- D isease
PrP	P rion- P rotein
PrP ^c	Zelluläres P rion- P rotein
PrP ^{sc}	Scrapie P rion P rotein (=Prion)
RF	R adio F requenz
RNA	R ibonucleic acid
SAF	Scrapie A ssociated F ibrils
sCJD	S poradic C reutzfeldt- J akob- D isease
TFA	T rifluor-acetic acid
TME	T ransmissible M ink E ncephalopathy
TRIS	T ris(hydroxymethyl)aminomethan

Symbol

$\tilde{\mathbf{A}}$	Hyperfein-Wechselwirkungstensor
A_{eff}	Effektiver Hyperfein-Wechselwirkungsfaktor
$A_x, A_y, A_z,$	Komponenten des Hyperfein-Wechselwirkungstensors (Hauptachsendarstellung)
A_0	Isotrope Komponente des Hyperfeinwechselwirkungstensors
$A_{\text{Dipol } X}$	Anteil der Dipol-Dipol-Wechselwirkung am Hyperfein-Wechselwirkungstensor des Atoms X
$A_{\text{Fermi } X}$	Anteil der Fermi-Kontakt-Wechselwirkung am Hyperfein-Wechselwirkungstensor des Atoms X
$A_{\text{Quadrupol } X}$	Anteil der Quadrupol-Wechselwirkung am Hyperfein-Wechselwirkungstensor des Atoms X
$A_{\text{Kern-Zeeman } X}$	Anteil des Kern-Zeeman-Effekts am Hyperfein-Wechselwirkungstensor des Atoms X
\vec{B}_1, B_1	Komponente des Magnetfelds eines MW-Pulses, die mit ν_0 rotiert, bzw. dessen Betrag
$\vec{B}_{\text{eff}}, B_{\text{eff}}$	Effektives gesamtes Magnetfeld im Koordinatensystem x', y', z' bzw. dessen Betrag
$\vec{B}_{\text{ext eff}}, B_{\text{ext eff}}$	Effektives externes Magnetfeld im Koordinatensystem x', y', z' bzw. dessen Betrag
$\vec{B}_{\text{ext}}, B_{\text{ext}}$	Externs Magnetfeld bzw. dessen Betrag
\vec{B}_{Dipol}	Magnetfeld eines magnetischen Dipols
C	Variable in der Parametrisierung der Fermi-Kontakt-Wechselwirkung
δ	Dihedraler Winkel im Proteinrückgrat
δ_0	Variable in der Parametrisierung der Fermi-Kontakt-Wechselwirkung
δ_{ij}	Kronecker-Symbol
E_+, E_-	Energie des oberen bzw. unteren EPR-Energieniveaus
ΔE	Energieunterschied zwischen oberem und unterem EPR-Energieniveau
\vec{g}	g-Tensor des Elektrons
g_{eff}	Effektiver g-Faktor des Elektrons
g_N	g-Faktor eines Kerns
g_x, g_y, g_z	Komponenten des g-Tensors des Elektrons (Hauptachsendarstellung)
γ	Gyromagnetisches Verhältnis des Elektrons
h	Plancksches Wirkungsquantum
\hat{H}_S	Spin-Hamiltonian (Operator)
$\hat{H}_{\text{Dipol } X}$	Hamiltonoperator der Dipol-Dipol-Wechselwirkung für Atom X
$\hat{H}_{\text{Fermi } X}$	Hamiltonoperator der Fermi-Kontakt- bzw. der isotropen Wechselwirkung für Atom X
$\hat{H}_{\text{HF } X}$	Hamiltonoperator der Hyperfein-Wechselwirkung für Atom X
$\hat{H}_{\text{Quadrupol } X}$	Hamiltonoperator der Quadrupol-Wechselwirkung für Atom X
$\hat{H}_{\text{Kern-Zeeman } X}$	Hamiltonoperator des Kern-Zeeman-Effekts für Atoms X
Θ	Winkel zwischen Molekül-Symmetrieachse und \vec{B}_{ext} (Abb. 11)
Θ_N	Winkel zwischen Symmetrieachse des Moleküls und \vec{I}_X (Abb. 11)
Θ_D	Winkel zwischen \vec{B}_{ext} und \vec{r} (Abb. 11)
Φ	Gierwinkel von \vec{B}_{ext} im molekülfesten Koordinatensystem, (Abb. 11)
Φ_N	Gierwinkel des Vektors \vec{r} (Abb. 11)
\hat{I}	Kernspinoperator
\hat{I}_z	z-Komponente des Kernspins (Operator)
\hat{I}_+, \hat{I}_-	Aufsteiger/Absteiger des Kernspins (Operator)
k_B	Boltzmannfaktor

μ_B	Bohrsches Magneton
μ_N	Kern-Magneton
$\mu_{N X}$	Magnetisches Moment des Kerns X
\bar{M}	Makroskopisches magnetisches Moment
$M_{I X}$	Magnetquantenzahl des Kerns X (^{14}N oder ^1H)
$M_{I \text{Cu}}$	Magnetquantenzahl des Cu-Kerns
m_s	Magnetquantenzahl des Elektrons
N_+, N_-	Besetzungszahl des oberen bzw. unteren EPR Energieniveaus
N	Gesamtbesetzungszahl beider Energieniveaus
ν_0	Larmorfrequenz
\vec{r}	Abstandsvektor Cu \rightarrow Atom X
$ \vec{r} = r$	Abstand des Atoms X vom Cu-Kern
\hat{S}	Elektronen-Spinoperator
\hat{S}_z	z-Komponente des Elektronenspins (Operator)
\hat{S}_+, \hat{S}_-	Aufsteiger bzw. Absteiger des Elektronenspins (Operator)
T	Temperatur
T_1	Spin-Gitter-Relaxationszeit
T_2	Spin-Spin-Relaxationszeit
τ	Pulslänge oder Pulsabstand eines Mikrowellenpulses
V_{tot}	Probenvolumen
WS	Raumwinkelsegment
x, y, z	Achsenbezeichnungen des Laborkoordinatensystems
x', y', z'	Achsenbezeichnungen des mit ν_0 rotierenden Koordinatensystems
X	Atom in der Nähe des Cu ($<5\text{\AA}$), entweder ^1H oder ^{14}N

1 Einleitung

Obwohl die Prionkrankheiten zu den Infektionskrankheiten gerechnet werden, sind dennoch nicht all ihre Unterarten auf natürlichem Weg übertragbar (Kretzschmar 2002a, 2002b). Einige von ihnen können spontan entstehen (Creutzfeldt-Jakob-Disease, CJD), andere sogar erblich bedingt sein (Fatal Familial Insomnia FFI; Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom GSS). Eine experimentelle Übertragbarkeit ist für alle Prionkrankheiten nachgewiesen worden. Bereits seit den fünfziger Jahren wird deshalb ein ungewöhnlicher Erreger vermutet (Pattison 1966). Das Unvermögen, in dem infektiösen Agens Spuren von Nukleinsäuren nachzuweisen, führt 1982 zur Formulierung der Prionhypothese (Prusiner 1982), welche ein „**Protein Infectious**“ Agens postuliert. Aus dem Kunstwort „Proin“ wird aufgrund der besseren Sprechbarkeit Prion. Es weist hin auf die Molekülklasse, in welcher der Erreger vermutet wird, nämlich auf die der Proteine. Aufgrund der, zumindest experimentellen, Übertragbarkeit und deren Folgen einer schwammartigen Gehirndegeneration (Kovács und Budka 2002), wird auch der Begriff „**Transmissible Spongiforme Enzephalopathie**“ (TSE) synonym zum Begriff Prionkrankheit verwendet. Diese sind von allen bisher bekannten Infektionskrankheiten abzugrenzen, da sie nicht von Viren, Protozoen, Bakterien oder Pilzen verursacht werden. Alle klassischen bekannten Infektionskrankheiten beruhen auf Nukleinsäuren als Informationsträger. Für Prionkrankheiten hingegen kann gezeigt werden, dass ein wesentlicher Schritt der Infektion aus einer Strukturumwandlung eines Proteins, des sogenannten Prion-Proteins, besteht. Es kommt in großer Konzentration vor allem im intersynaptischen Spalt vor, also hauptsächlich in Gehirn und Rückenmark. Die normale und damit harmlose Form des Proteins, bezeichnet mit PrP^c, unterscheidet sich von der infektiösen „scrapie“-Form, PrP^{sc}, lediglich durch seine Sekundär- und Tertiärstruktur. Durch das Eindringen des infektiösen Agens, im Experiment meist bestehend aus Gehirnhomogenat, wird im Wirt eine Umfaltung des nativen PrP^c in das pathogene PrP^{sc} induziert. Aufgrund der Resistenz des PrP^{sc} gegen Proteinasen können diese fehlgefalteten Proteinfragmente nicht abgebaut werden, es entstehen amyloide Strukturen (Prion-Rods oder Scrapie Associated Fibrils, SAF). Dadurch bilden sich Vakuolen, die zum Zelltod führen. Tab. 1 zeigt einen Überblick über die bekannten Unterarten der TSE.

Name der Krankheit	Kurzbezeichnung	Vorkommen
Creutzfeldt-Jakob-Disease	CJD	Mensch
Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom	GSS	Mensch
Kuru		Mensch
Fatal Familiar Insomnia	FFI	Mensch
Scrapie (Traberkrankheit)		Schaf
Transmissible Mink Encephalopathy	TME	Nerz
Chronic Wasting Disease	CWD	Rotwild
Bovine Spongiform Encephalopathy	BSE	Rinderartige Wiederkäuer
Feline Spongiform Encephalopathy	FSE	Katzen

Tab. 1: Überblick über die Formen der Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien (TSE)

Die Traberkrankheit bei Schafen (Scrapie) und auch die Tatsache, dass es sich dabei um eine ansteckende Krankheit handelt, sind schon seit Mitte des 18. Jahrhunderts bekannt. Erst im 20. Jahrhundert wird die Ursache, eine langsame, degenerative Hirnveränderung, beschrieben und Scrapie damit der Familie der Prionkrankheiten zugeordnet.

Während des gesamten 20. Jahrhunderts lässt sich eine Epidemie im Volk der Fore, der Ureinwohner der Hochländer Papua-Neuguineas, beobachten. Die von starkem Schütteln und Muskelzittern begleitete Krankheit wird von der einheimischen Bevölkerung mit einem böartigen „Kuru“-Zauber erklärt. Erst 1966 gelingt es durch den Nachweis der Übertragbarkeit der Krankheit auf Schimpansen (Gajdusek et al. 1966), die Seuche eindeutig den Prionkrankheiten zuzuordnen. Der rituelle Verzehr von Menschen gilt heute als Ursache der Kuru-Krankheit (Gajdusek et al. 1966).

Große klinische Ähnlichkeiten mit Kuru zeigt das seit 1912 bekannte Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom. Es handelt sich dabei allerdings nicht um eine erworbene, sondern um eine erblich bedingte Erkrankung des zentralen Nervensystems. Aus neun Generationen einer bestimmten betroffenen Familie sind im Laufe des letzten Jahrhunderts 20 von insgesamt 221 Personen an GSS erkrankt. Mit modernen molekulargenetischen Methoden ist als Ursache die Mutation P102L des Prion-Proteins (Abb. 2) identifiziert worden (Doh-ura et al. 1989; Hsiao et al. 1989).

Einer breiten Öffentlichkeit bekannt ist ohne Zweifel die Rinderseuche BSE. Der erste bestätigte Fall ereignet sich 1985 in Südengland. 2100 weitere Fälle folgen in den nächsten 3 Jahren, bis 1988 die Verfütterung von Tiermehl von der britischen Regierung verboten wird. Anfang der neunziger Jahre treten in Deutschland, ebenso wie in fast ganz Europa, BSE Fälle auf. Tab. 2 zeigt die Anzahl der BSE Fälle in Deutschland, aufgeschlüsselt nach Bundesländern.

Bundesland	Anzahl				Gesamt
	2000	2001	2002	2003	
Baden-Württemberg	-	12	11	9	32
Bayern	5	59	27	21	112
Berlin	-	-	-	-	-
Brandenburg	-	3	4	3	10
Bremen	-	-	-	-	-
Hamburg	-	-	-	-	-
Hessen	-	3	2	2	7
Mecklenburg-Vorpommern	-	2	4	-	6
Niedersachsen	1	17	27	7	52
Nordrhein-Westfalen	-	2	2	4	8
Rheinland-Pfalz	-	4	6	-	10
Saarland	-	1	-	-	1
Sachsen	-	4	4	3	11
Sachsen-Anhalt	-	4	4	1	9
Schleswig-Holstein	1	12	14	1	28
Thüringen	-	2	1	3	6
Bundesrepublik Deutschland	7	125	106	54	292

Tab. 2: Anzahl der BSE-Fälle in Deutschland nach Bundesländern

Mitte der neunziger Jahre wird an ersten Patienten in Großbritannien CJD diagnostiziert, die EU verhängt ein Importverbot für britisches Rindfleisch. Erst nach signifikantem Rückgang der BSE Fälle in Großbritannien und neuen Erkenntnissen über die Übertragungswege der Krankheit wird dieses Importverbot wieder aufgehoben. Heute gilt als Hauptursache der Übertragung von BSE in Großbritannien die Verfütterung von prion-kontaminiertem Tiermehl. Ursache für die Verseuchung des Futters sind tiefgreifende Änderungen in der britischen Tierkörperverwertung in den siebziger und Anfang der achtziger Jahre (Umstellung von Chargen auf kontinuierlichen Betrieb, Verzicht auf Fettextraktion, Senkung der Erhitzungstemperatur und Verringerung der Erhitzungsdauer). Die Inaktivierung von Prionen wird dadurch reduziert. In Deutschland werden für die Verbreitung der Seuche die

sogenannten Milchaustauscher verantwortlich gemacht. Aus epidemiologischen Untersuchungen folgt, dass für ein tatsächliches Erkranken der Tiere zusätzlich noch ein oder mehrere Cofaktoren gegeben sein müssen. Diese sind bis heute unbekannt (Aguzzi und Polymenidou 2004).

Außer bei Rindern und Menschen kommen Prionkrankheiten noch bei Pelztieren (TME bei Nerzen), Katzenartigen (FSE bei Katzen, auch Großkatzen in Zoos) und bei bestimmten Hirscharten in Nordamerika (CWD) vor. Sowohl bei TME, als auch bei FSE ist die Quelle der Infektion in der Verfütterung von Schlachtabfällen zu suchen (Hartsough und Burger 1965). Bei TME kommt es häufig darüber hinaus noch zu einer zusätzlichen internen Infektion durch Beißereien zwischen den in sehr engen Käfigen gehaltenen Tieren, was die teilweise extrem hohen Infektionsraten in den betroffenen Farmen (bis zu 100%) erklärt (Hartsough und Burger 1965).

Die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) tritt in 4 verschiedenen Formen auf. Tab. 3 zeigt eine Übersicht.

Krankheitsform	Kurzbezeichnung	Ursachen
Neue Variante der CJD	nvCJD	Erworben, wahrscheinlich durch Aufnahme von großen Mengen mit Prionen kontaminierter Nahrungsmittel (BSE)
Intarogene CJD	iCJD	Erworben durch medizinische Unfälle
Sporadische CJD	sCJD	Spontan auftretend, Ursache unbekannt
Familiäre CJD	fCJD	Vererbt

Tab. 3: Die verschiedenen Formen der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit. Aufgrund ihrer ähnlichen Pathologie sind sie schwierig voneinander abzugrenzen (Budka 2003; Kretzschmar 2003).

Während einige der in Tab. 1 aufgeführten Krankheiten vererbt werden, oder auch spontan auftreten, tritt ein anderer Teil nur dann auf, wenn Organismen große Mengen mit Prionen kontaminierter Nahrungsmittel zu sich nehmen (nvCJD). Dies kann beispielsweise geschehen durch Kannibalismus beim Menschen (Kuru) oder Tieren im weiteren Sinne (Pelztierfarmen, Verfütterung von falsch verarbeitetem Tiermehl). Wird bei dieser Nahrungsaufnahme die Artgrenze überschritten, zum Beispiel beim Verzehr von Prionen-belastetem Rindfleisch oder bei Tierversuchen, so kommt es zu einer deutlichen Verlängerung der Inkubationszeit. Trotz

der großen Sequenzhomologie des Proteins bei Säugetieren existiert also eine Spezies-Barriere. Auf Tierversuchen, deren Ziel es ist, diese Spezies-Barriere unter definierten Bedingungen zu überschreiten, beruhen die Abschätzungen der Inkubationszeit der nvCJD bei Menschen. Außerdem kann festgestellt werden, dass Menschen, die homozygot bezüglich des Codons der Aminosäure 129 des Prion-Proteins sind, häufiger an nvCJD erkranken und dass die Krankheit bei diesen Patienten auch schneller fortschreitet.

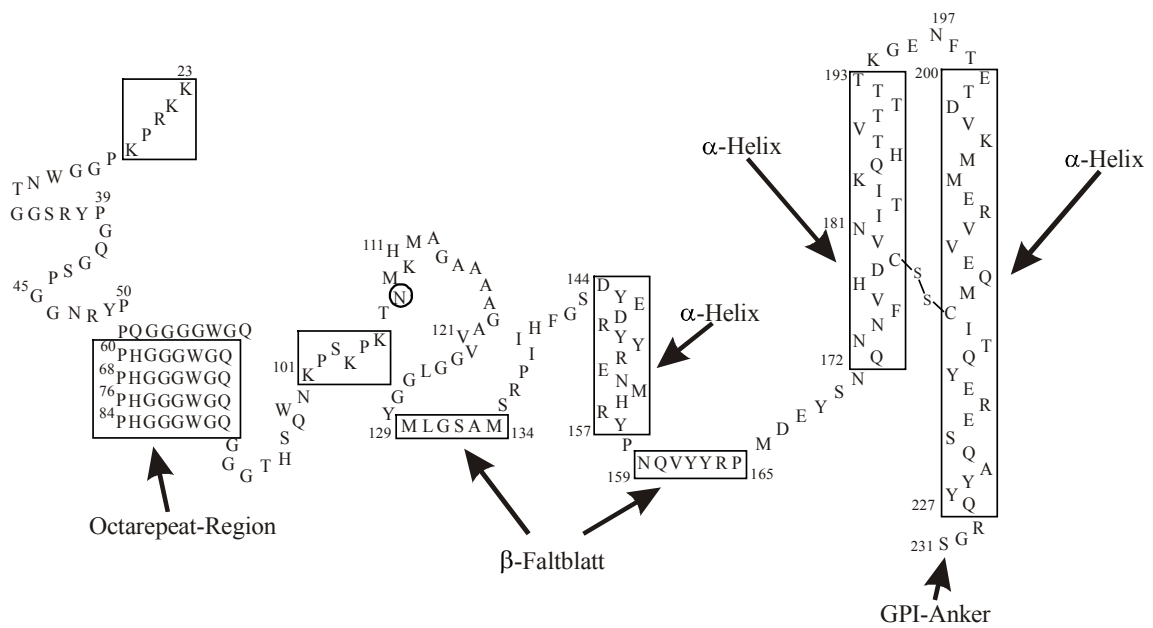
Im Tierversuch sind alle Prionenkrankheiten übertragbar, egal welchen Ursprungs. Der Mechanismus der Übertragung von Prionenkrankheiten ist unbekannt, es existieren allerdings mehrere Modelle für diesen Vorgang.

Bei der Virus-Hypothese werden scrapie-spezifische Nukleinsäuren angenommen (Diringer et al. 1994). Die Resistenz der Erreger gegenüber physikalischen und chemischen Einflüssen wird durch eine Ummantelung dieser Nukleinsäuren erklärt. Prion-Rods werden als sekundäre Effekte der Krankheiten interpretiert. Versuche, scrapie-spezifische Nukleinsäuren zu isolieren, sind ergebnislos verlaufen.

Die Protein-Only-Hypothese besagt, dass das Prion-Protein in seiner Scrapie-Konfiguration allein das infektiöse Agens darstellt. Gestützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, daß es bis heute nicht möglich war, im erwiesenermaßen infektiösen Agens Spuren von Nukleinsäuren nachzuweisen. Allerdings ist es bis heute ebenfalls noch nicht gelungen, Infektiösität im Reagenzglas zu erzeugen. Ein Positivbeweis für die Richtigkeit der Protein-Only-Hypothese ist also nie erbracht worden.

Heute gilt aufgrund weit fortgeschrittener Inaktivierungsstudien (Bellinger-Kawahar et al. 1987; Bellinger-Kawahar et al. 1988) das Prion als der wahrscheinliche Überträger von Prionenkrankheiten (Kretzschmar et al. 1997; Kovács et al. 2002). Alle Modelle in Abb. 1 sagen voraus, dass In-vitro-Amplifikation möglich ist. Es existieren noch weitere, komplexere Modelle, welche berücksichtigen, dass eben diese Möglichkeit der In-vitro-Amplifikation nicht existiert. Darauf soll an dieser Stelle aber nicht weiter eingegangen werden.

A:



B:

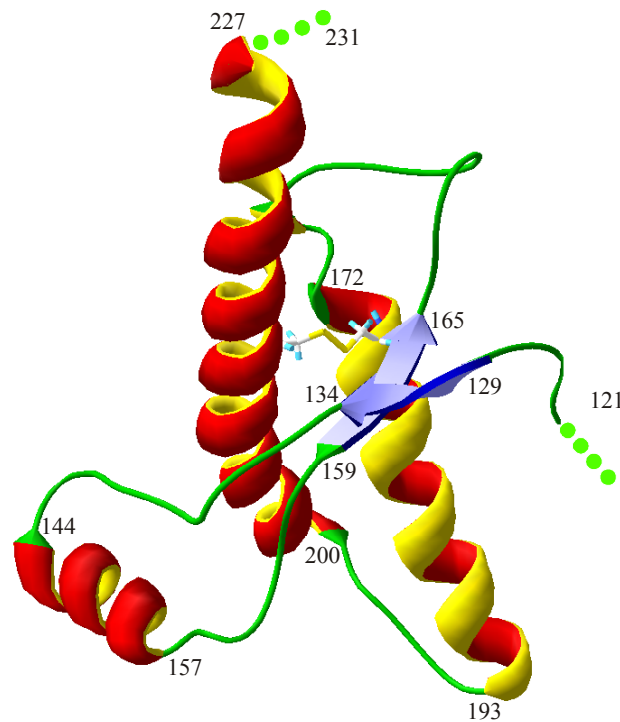


Abb. 2: A: Schematischer Aufbau des Prion-Proteins; B: : NMR Struktur der C-terminalen Domäne des humanen Prion-Proteins

Über die Sekundärstruktur des PrP^{Sc} ist wenig bekannt. Aus Circular dichroismus und Infrarotspektroskopie ist bekannt, dass der Prozentsatz der Aminosäuren, die in β -Faltblatt-Strukturen angeordnet sind, bei PrP^{Sc} signifikant höher ist, als bei PrP^C (Palmer et al. 1991;

Pan et al. 1993; Safar et al. 1993). Eine detaillierte Struktur dieser Konformation ist nicht bekannt. Mutationen vererbbarer Prionenkrankheiten (FFI, fCJD, GSS) können im Bereich der bekannten Struktur lokalisiert werden. Die Krankheiten können nicht direkt mit einer Destabilisierung der C-terminalen Domäne des PrP^c in Verbindung gebracht werden.

Die Struktur der N-terminalen Domäne des Prion-Proteins ist unbekannt, es existieren aber Hinweise darauf, dass dieser Teil des Proteins in Gegenwart einer Membran eine definierte Struktur zeigt (Zahn 2003). Die Domäne enthält üblicherweise 4 Sequenzen von jeweils 8 aufeinanderfolgenden Aminosäuren, den sogenannten Octarepeats. Diese Region ist in der Lage, spezifisch Cu²⁺-Ionen zu binden (Hornshaw et al. 1995; Miura et al. 1996b; Brown et al. 1997a). Es wird angenommen, dass diese Octarepeats eine für die Funktion des Proteins wichtige Rolle spielen, da die Sequenz innerhalb der Säugetiere hoch konserviert ist (Schätzl et al. 1995).

Die Funktion des Prion-Proteins ist nicht bekannt. Es ist aber bekannt, dass das Protein Kupfer in biologisch relevanten Konzentrationen binden kann (Kramer et al. 2001). Sogenannte Prion-knockout-Mäuse zeigen bis auf einen veränderten Schlaf-Wach-Rhythmus keine auffälligen Verhaltensmuster (Tobler et al. 1996; Tobler et al. 1997). Sie können jedoch nicht mit neurotoxischem PrP (PrP^{Sc}) infiziert werden (Brown et al. 1994) und zeigen eine veränderte Elektrophysiologie am intersynaptischen Spalt (Collinge et al. 1994; Manson et al. 1995; Whittington et al. 1995; Lledo et al. 1996; Herms et al. 1997). Dort treten Prion-Proteine auch in hoher Konzentration auf (Harris et al. 1991; Fournier et al. 1995). Im Vergleich zu wildtyp Mäusen ist bei Prion-knockout-Mäusen die Kupferkonzentration in der intersynaptischen Membranfraktion herabgesetzt, während sie in Gehirnhomogenat gleich bleibt. Es kommt also zu einer Kupferfehlverteilung im Gehirn (Fournier et al. 1995; Herms et al. 1997; Herms et al. 2000). Da Prion-knockout Mäuse auch eine höhere Sensibilität auf extrazellulär appliziertes Kupfer haben (Herms et al. 2001; Hopt et al. 2003), kann man auf eine Funktion des Prion-Proteins im Kupferhaushalt schließen. Welcher Art diese Rolle allerdings genau ist, ist unklar. Es ist denkbar, dass Prion-Proteine als Kupfer-Transport-Proteine arbeiten und Cu vom synaptischen Spalt ins Zellinnere transportieren. Aber auch eine Cu-Pufferfunktion im synaptischen Spalt ist denkbar (Kretschmar et al. 2000), ebenso wie ein Mechanismus, der oxidativem Stress entgegenwirkt (Brown et al. 1997b; Lehmann 2002). Vier von fünf hochaffinen Cu-Bindungsstellen des Prion-Proteins befinden sich in der Octarepeat-Region. Diese scheint außerdem bei der Umfaltung von zellulärem PrP^c in die

pathologische Form PrP^{sc} eine wichtige Rolle zu spielen. Menschen mit weniger oder mehr als der üblichen 4 Octarepeats erkranken sehr häufig und bereits im frühen Alter an CJD. Außerdem ist es möglich, spezifisch Antikörper an die Octapeptid-Region zu binden, und zwar sowohl in der zellulären Form des PrP^c als auch in der pathologischen Form PrP^{sc}. Kenntnis über Struktur der N-terminalen Domäne und damit vor allem auch der Octarepeat-Region ist also für das Verständnis der Funktion des Proteins und auch für das Verständnis der Prionkrankheiten wesentlich.

Bezüglich der experimentellen Methoden stützt sich die hier vorliegende Arbeit hauptsächlich auf die ESR- (Elektronen Spin Resonanz oder auch EPR- Elektronen Paramagnetische Resonanz) beziehungsweise auf die darauf aufbauenden Methoden der ENDOR- (Electron Nuclear Double Resonance) und ESEEM- (Electron Spin Echo Envelope Modulation) Spektroskopie. Zusätzlich wird auch EXAFS-Spektroskopie (Extended X-ray Absorption Fine Structure Spectroscopy) eingesetzt. Alle in dieser Arbeit vorgestellten experimentellen Methoden (EPR, ENDOR ESEEM, EXAFS) zur Untersuchung des Kupferbindungsplatzes sind spektroskopischer Natur. Bildgebende Verfahren zur Strukturaufklärung wurden aufgrund der besonderen Beschaffenheit der Proben nur mit mäßigem Erfolg angewendet. So existiert bis heute weder eine NMR- noch eine Röntgenstruktur des vollständigen Kupferbindungsplatzes des Prion-Proteins.

Um aus der großen Anzahl und Bandbreite der in dieser Arbeit angewandten Methoden ein einheitliches Bild über den zu untersuchenden Komplex zu gewinnen, ist es notwendig, eine neuartige Strategie für die Datenauswertung zu entwickeln. Obwohl es mit jeder dieser oben genannten Methoden möglich ist, in Teilaspekten detaillierte Informationen über Struktur und Symmetrie des vorliegenden Komplexes zu erhalten, ist es dennoch nicht möglich, die Gesamtstruktur direkt zu gewinnen, da keine dieser Methoden eine eindeutige Zuordnung von Spektren und Geometrie erlaubt. Stattdessen wird mit Hilfe von Moleküldynamiksimulationen, eine große Anzahl plausibler, das heißt sterisch richtiger und energetisch wahrscheinlicher Konfigurationen und Konformationen im Computer erzeugt und diese dann auf Kompatibilität mit den Messergebnissen überprüft. Es ist keine Kristallisation von Proteinen und Komplexen notwendig, es kann mit Lösungen gearbeitet werden. Mit diesem Verfahren ist es möglich, Strukturen im Nahbereich um paramagnetische Zentren aufzuklären.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 EPR

2.1.1 Grundlagen

Befindet sich ein Elektron ($S=1/2$) in einem Magnetfeld \vec{B}_{ext} , so wird die Entartung der Energieniveaus bezüglich des Spins aufgehoben.

$$\hat{H}_S = g_{\text{eff}} \mu_B B_{\text{ext}} \hat{S}_z \quad (1)$$

\hat{H}_S bezeichnet den Spin-Hamiltonian des Elektrons, g_{eff} den effektiven g-Faktor, μ_B das Bohrsche Magneton und B_{ext} den Betrag des externen magnetischen Feldes. \hat{S}_z ist die z-Komponente des Elektronenspinoperators. Für die Berechnung der Energieniveaus wird der Spin-Hamiltonian auf die Spin-Eigenzustände des Elektrons angewendet, hier zum Beispiel für $S=1/2$:

$$\hat{H}_S \left| \pm \frac{1}{2} \right\rangle = \pm \frac{1}{2} g_{\text{eff}} \mu_B B_{\text{ext}} \left| \pm \frac{1}{2} \right\rangle = E_{\pm} \left| \pm \frac{1}{2} \right\rangle \quad (2)$$

Mit

$$E_{\pm} = \pm \frac{1}{2} g_{\text{eff}} \mu_B B_{\text{ext}} \quad (3)$$

ergibt sich der Energieunterschied der beiden Energieniveaus zu

$$\Delta E = E_+ - E_- = g_{\text{eff}} \mu_B B_{\text{ext}} \quad (4)$$

wobei E_+ die Energie des energiehöheren Energieniveaus bezeichnet, also das bei dem die Elektronenspins parallel zu \vec{B}_{ext} stehen. E_- bezeichnet entsprechend die Energie des energieniedrigeren Niveaus. ΔE ist der Energieunterschied der beiden Niveaus. Abb. 3 veranschaulicht die Energieniveaus und deren Abhängigkeit vom Magnetfeld.

Wenn sich die beiden Energieniveaus im thermischen Gleichgewicht befinden sind sie nach der Boltzmannstatistik populierte.

$$\frac{N_+}{N_-} = e^{\frac{-\Delta E}{k_B T}} = e^{\frac{-g_{\text{eff}} \mu_B B_{\text{ext}}}{k_B T}} \quad (5)$$

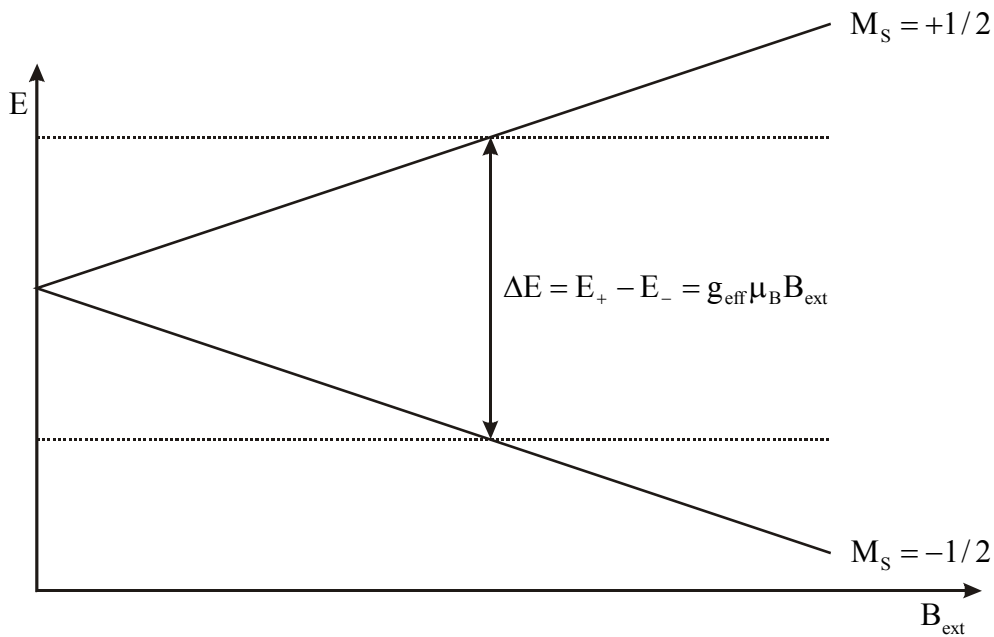


Abb. 3: Aufspaltung zweier EPR-Energieniveaus eines $S=1/2$ Systems im Magnetfeld \vec{B}_{ext}

N_+ und N_- bezeichnen die Besetzungszahlen der beiden Energieniveaus, k_B ist der Boltzmannfaktor und T die Temperatur. Sehr häufig verwendet man folgende Näherung:

$$\frac{N_+}{N_-} \approx 1 - \frac{g_{\text{eff}} \mu_B B_{\text{ext}}}{k_B T} \quad (6)$$

Somit ergibt sich der Besetzungsunterschied der beiden Energieniveaus zu:

$$N_- - N_+ = N_- \left[1 - \left(1 - \frac{g_{\text{eff}} \mu_B B_{\text{ext}}}{k_B T} \right) \right] \approx \frac{N g_{\text{eff}} \mu_B B_{\text{ext}}}{2k_B T} \quad (7)$$

mit:

$$N = N_+ + N_- \quad (8)$$

N ist die Gesamtbesetzungszahl des betrachteten Systems. Abweichungen des g -Faktors von 2.0023 können durch höhere Elektronenspins oder durch bestimmte Symmetrien in den betreffenden Molekülen entstehen, indem das freie Elektron mit den magnetischen Momenten von Liganden koppelt. Da diese Abweichungen auch von der Orientierung des Moleküls relativ zum äußeren Magnetfeld B_{ext} abhängen, ist der g -Faktor im allgemeinen keine Zahl, sondern ein Tensor. Mit dem Spektrometer lässt sich immer nur die Komponente des Tensors, die gerade parallel zum externen Magnetfeld B_{ext} ist, beobachten.

2.1.2 Hyperfeinwechselwirkung

Befinden sich in der Nähe des Elektronenspins ein oder mehrere Kernspins, so können diese mit dem ungepaarten Elektron wechselwirken. Die Wechselwirkung von Hüllenelektronen und Atomkernen bezeichnet man allgemein als Hyperfeinwechselwirkung. Hier wird die Hyperfeinwechselwirkung beschrieben, die zwischen Hüllenelektron und dem Atomkern desselben Cu-Atoms stattfindet. Sie ist oft so groß, dass sie im EPR Spektrum direkt sichtbar ist, und kann für den Spezialfall des Cu-Kerns durch einen zusätzlichen Term im Spin-Hamiltonian beschrieben werden.

$$\hat{H}_S = \tilde{g}\mu_B \vec{B}_{\text{ext}} \hat{S}_z + \hat{I}_{\text{Cu}} \vec{A}_{\text{Cu}} \hat{S} \quad (9)$$

\tilde{g} und \vec{A}_{Cu} sind der g- bzw. der A-Tensor des Elektrons. \hat{S}_z bezeichnet die z-Komponente des Elektronen-Spin-Operators \hat{S} , \hat{I}_{Cu} ist der Spin-Operator des Cu-Kerns. Die Kern-Zeeman Wechselwirkung ist üblicherweise so klein, dass sie für die EPR-Spektroskopie keine Rolle spielt, sie wird daher hier vernachlässigt. Für die ENDOR-Spektroskopie hingegen spielt sie eine wesentliche Rolle. Formal kann die Hyperfeinwechselwirkung als Interaktion zwischen zwei Operatoren, \hat{I} und \hat{S} , beschrieben werden, daher wird sie im Allgemeinen durch einen Tensor dargestellt. Die Spin-Wellenfunktionen werden durch 2 Quantenzahlen beschrieben, M_S und M_I . Unter Verwendung von Auf- und Absteiger-Operatoren und unter der Annahme eines isotropen Hyperfeinwechselwirkungstensors

$$\vec{A}_{\text{Cu}} = \begin{pmatrix} A_{0\text{Cu}} & 0 & 0 \\ 0 & A_{0\text{Cu}} & 0 \\ 0 & 0 & A_{0\text{Cu}} \end{pmatrix} \quad (10)$$

ergibt sich aus Gl. (9):

$$H_S = \tilde{g}\mu_B \vec{B}_{\text{ext}} \hat{S}_z + A_{0\text{Cu}} \left(\hat{S}_z \hat{I}_z + \frac{1}{2} (\hat{I}_+ \hat{S}_- + \hat{I}_- \hat{S}_+) \right) \quad (11)$$

\hat{S}_+ und \hat{S}_- bzw. \hat{I}_+ und \hat{I}_- sind die Auf- und Absteigeroperatoren des Elektronen- bzw. des Cu-Kernspins.

Diese Energieniveaus sind in Abb. 4 dargestellt:

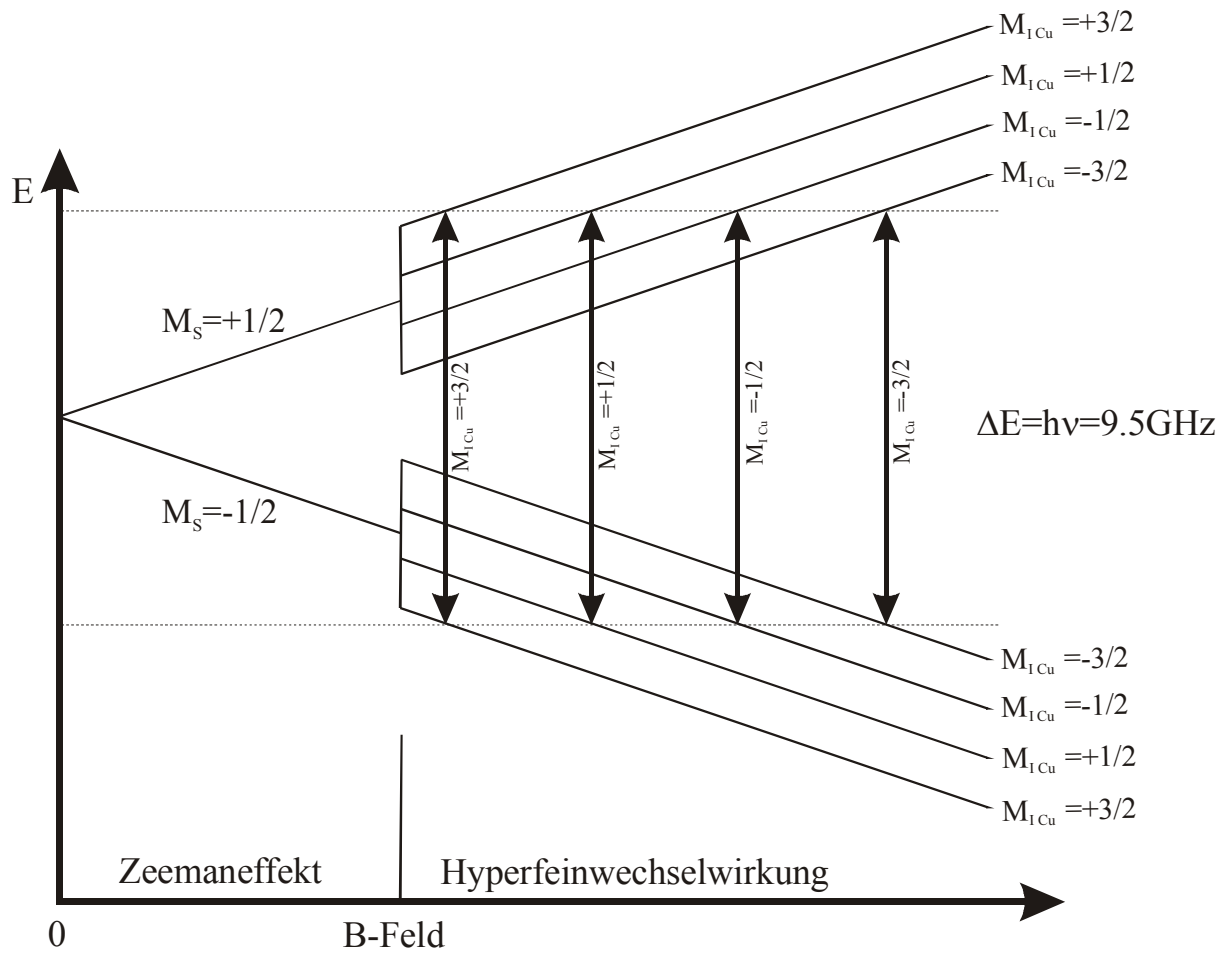


Abb. 4: Energieniveaus des Zeemaneffektes und der Hyperfeinaufspaltung in Abhängigkeit des Magnetfeldes. Für den Spezialfall $S=1/2$, $I=3/2$ ergeben sich 4 hyperfein-aufgespaltene Linien. $M_{I,Cu}$ bezeichnet die Magnetquantenzahl des Cu-Kernspins.

Für große A_0 muß die Matrix aus Gl. (12) diagonalisiert werden. Für das Berechnen allgemeinerer Fälle ($\vec{A}_{Cu} \neq A_{0,Cu}$, $\vec{g} \neq g_0$) sei auf das Maple-Skript in Anhang A verwiesen.

2.1.3 Spektren gefrorener Lösungen – Winkelmittelung

Es muss beachtet werden, dass bei Spektren gefrorener Lösungen alle möglichen Orientierungen der Moleküle relativ zum externen Magnetfeld B_{ext} vorkommen. Bei der Berechnung des EPR-Spektrums, muß über alle möglichen Positionen des Hamiltonians im Raumwinkel 4π gemittelt werden. Beispielsweise zeigt das Spektrum eines Moleküls mit axialsymmetrischem Hamiltonian der Form

$$H_S = \begin{bmatrix} g_{\perp} & & \\ & g_{\perp} & \\ & & g_{\parallel} \end{bmatrix} \mu_B B \hat{S}_z + \begin{bmatrix} A_{\perp\text{Cu}} & & \\ & A_{\perp\text{Cu}} & \\ & & A_{\parallel\text{Cu}} \end{bmatrix} \left(\hat{S}_z \hat{I}_z + \frac{1}{2} (\hat{I}_+ \hat{S}_- + \hat{I}_- \hat{S}_+) \right) \quad (14)$$

die Werte g_{\perp} und A_{\perp} , wenn das Molekül normal zum B-Feld steht, und g_{\parallel} und A_{\parallel} , wenn es parallel zu diesem steht. Da in einer gefrorenen Lösung Gleichverteilung bezüglich der Ausrichtung der Moleküle herrscht, zeigen in einen Raumwinkelausschnitt gleicher Größe immer gleich viele Moleküle. Die Ausrichtung eines Moleküls relativ zum externen Magnetfeld \vec{B}_{ext} kann mit Polarkoordinaten beschrieben werden. Sie wird mit den beiden Winkeln Θ und Φ (Abb. 5) definiert. Wenn die EPR Parameter g und A nicht isotrop sind, etwa wie in Gl. (14), dann sind sie Funktionen von Θ und Φ nur konstant über ein beliebig kleines Winkelintervall $\Delta\Theta$ und $\Delta\Phi$. Die Größe des Raumwinkelements WS hängt ab von Θ , wie an dem Flächenelement erkennbar ist das in Abb. 5 für die zwei Winkel $\Theta_1=10^\circ$ und $\Theta_2=90^\circ$ eingezeichnet ist. Bei Θ_1 , nahe 0° , ist es sehr klein, bei Θ_2 , nahe 90° , dagegen maximal.

$$WS = \Delta\Theta \cdot \Delta\Phi \propto \sin \Theta \quad (15)$$

Daher nimmt ein axialsymmetrisches Protein nicht alle Positionen relativ zum externen magnetischen Feld mit derselben Wahrscheinlichkeit ein. Positionen, bei denen das Protein mit seiner ausgezeichneten Achse normal zum externen Magnetfeld steht, sind statistisch häufiger als Positionen, bei denen diese Achse parallel zu diesem steht. Abb. 5 soll das illustrieren.

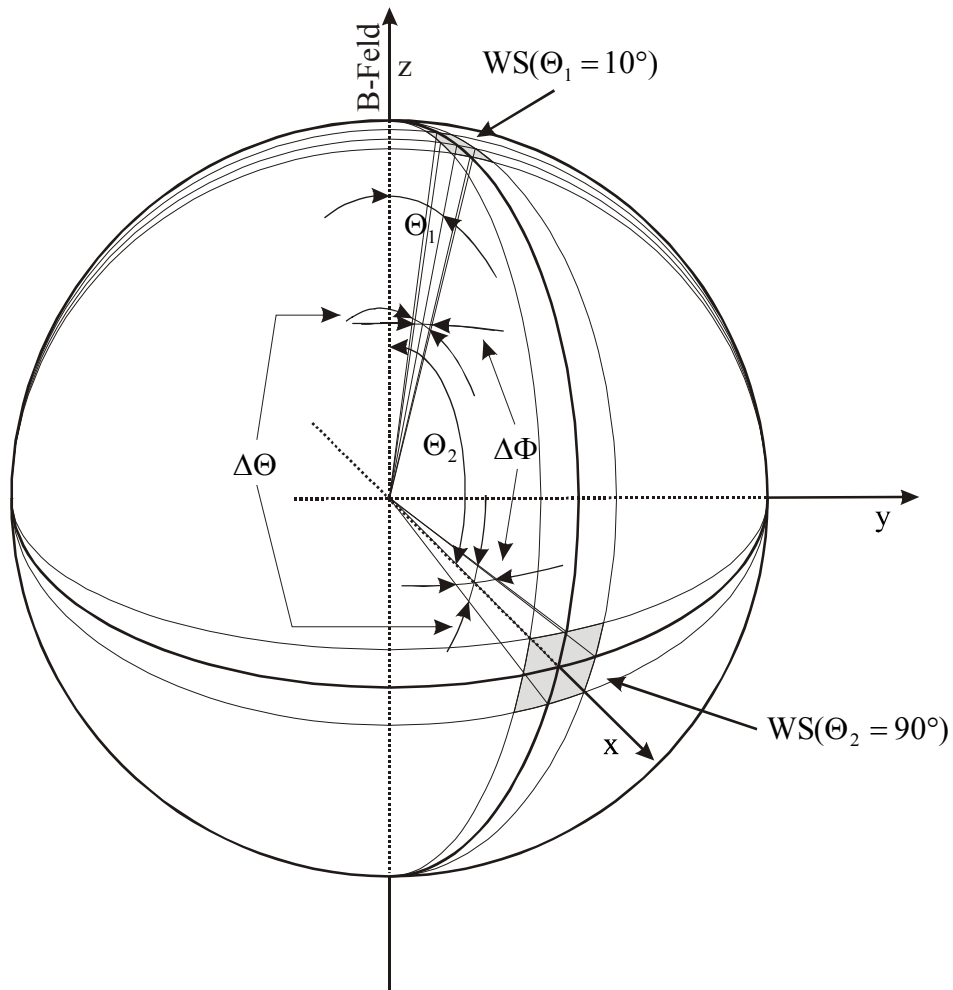


Abb. 5: Die Wahrscheinlichkeit, dass das Protein mit seiner ausgezeichneten Achse normal zum externen Magnetfeld steht, ist wesentlich größer als die Wahrscheinlichkeit, dass es parallel steht.

Der Faktor in Gl. (15) muß bei Winkelmittlung berücksichtigt werden. Die Teile des Spektrums, die zu $\Theta = \pi/2$ gehören (Abb. 6 A), treten daher mit erheblich größerer Wahrscheinlichkeit auf als die Teile des Spektrums, die zu $\Theta = 0$ gehören (Abb. 6 C). Sie tragen daher im gemittelten Spektrum (Abb. 6 D) mit erheblich höherer Intensität bei.

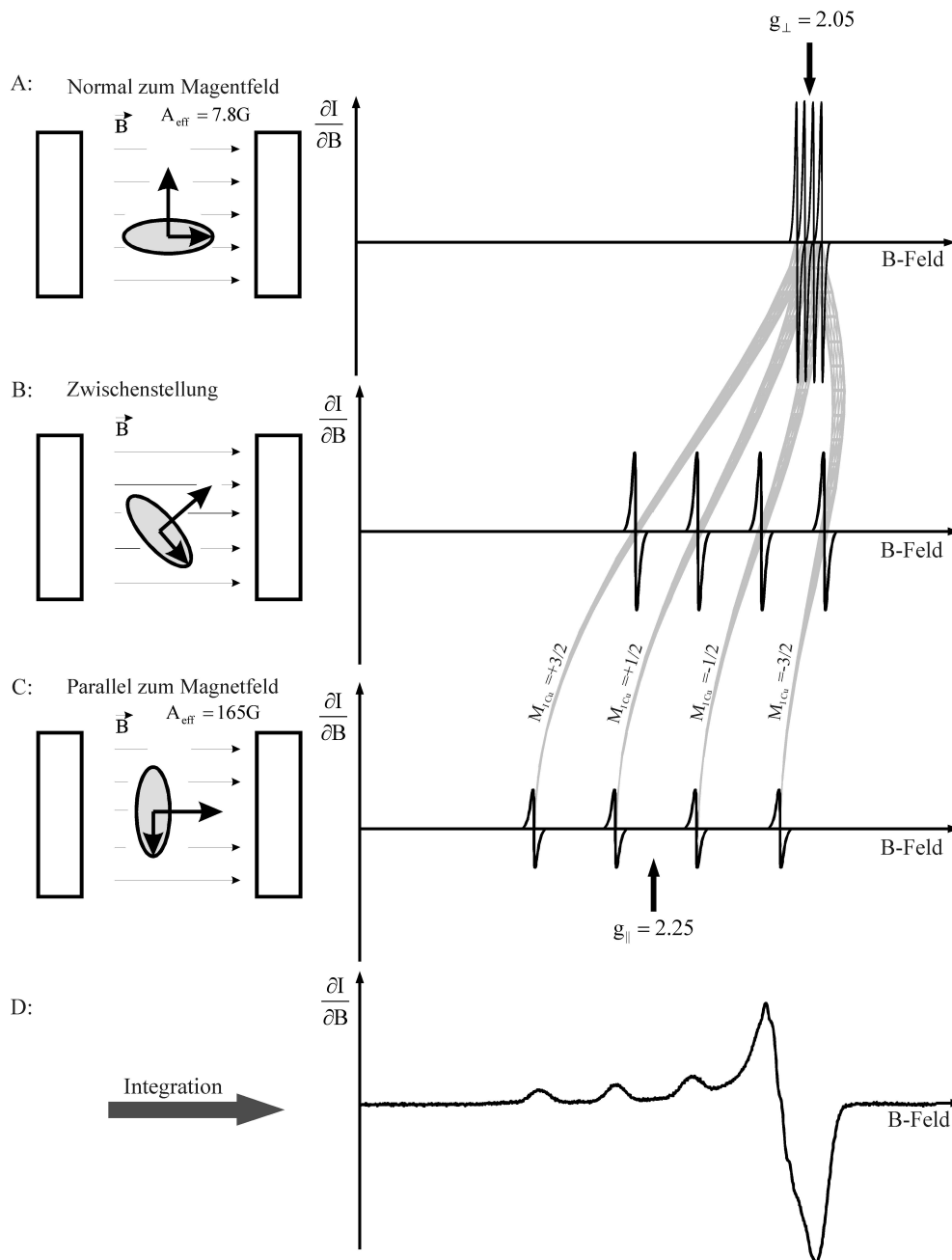


Abb. 6: Das Zustandekommen eines EPR-Spektrums einer Probe in wässriger Lösung. Über alle Positionen der Moleküle relativ zum äußeren magnetischen Feld muß gemittelt werden. Durch Bildung der Ableitung des Spektrums treten die extremalen Positionen der untersuchten Komplexe (parallel und normal zum magnetischen Feld) deutlicher hervor.

Die Anisotropie von EPR Resonanzen orientiert sich in ihrer Linienform an der Symmetrie der Liganden im untersuchten Komplex. Umgekehrt kann aus der Linienform einer anisotrop verbreiterten Linie auf die Symmetrie des Komplexes geschlossen werden.

2.1.4 Auswertung von EPR Spektren

Für den Fall von Cu^{2+} existiert in der Literatur eine große Menge von bereits gemessenen Spektren bzw. g- und A-Tensoren. Ist die Struktur von solchen Komplexen ebenfalls bekannt, beispielsweise aus der Röntgenstrukturanalyse, so kann diesen Parametern auch ein Ligandierungsmuster zugeordnet werden (Peisach und Blumberg 1974). Die Zuordnungen sind nicht immer eindeutig, können aber unter Zuhilfenahme von Zusatzinformationen, wie etwa Ergebnissen aus der Ramanspektroskopie, die Art der Ligandierung in der 1. Koordinationsschale geben.

2.2 ENDOR

Zusätzlich zu der in Kapitel 2.1.2 behandelten Hyperfeinwechselwirkung, die zwischen Hüllenelektron und dem Atomkern desselben Atoms stattfindet, können noch andere Atomkerne mit dem Elektron wechselwirken. In Frage kommen vor allem Stickstoffatome ($X=^{14}\text{N}$) und Wasserstoffatome ($X=^1\text{H}$). Da diese Atomkerne aber räumlich vom Elektron weiter entfernt sind, sind diese Energieaufspaltungen erheblich kleiner und daher nur mittels ENDOR-Spektroskopie sichtbar, nicht aber mit EPR. Die Wechselwirkung mit diesen entfernten Atomkernen, bezeichnet mit $\hat{H}_{\text{HF}X}$, setzt sich zusammen aus der Kern-Zeeman- ($\hat{H}_{\text{Kern-Zeeman}X}$), der Dipol-Dipol- ($\hat{H}_{\text{Dipol}X}$), der isotropen Hyperfein- ($\hat{H}_{\text{Fermi}X}$), und der Quadrupol-Wechselwirkung ($\hat{H}_{\text{Quadrupol}X}$):

$$\hat{H}_{\text{HF}X} = \hat{H}_{\text{Kern-Zeeman}X} + \hat{H}_{\text{Dipol}X} + \hat{H}_{\text{Fermi}X} + \hat{H}_{\text{Quadrupol}X} \quad (16)$$

Im Folgenden werden diese Anteile kurz erläutert.

2.2.1 Kern-Zeeman Effekt

Die Entartung der Kernspin-Energieniveaus wird in einem externen Magnetfeld aufgehoben, analog zum Elektronenspin (vgl. Kapitel 2.1.1). Ebenso analog zum Elektronenspin wird ein quantenmechanischer Zustand eines Atomkerns X durch den Kernspin I und die magnetische Kernspinquantenzahl M_{IX} beschrieben. Der Hamiltonoperator für den Kern- Zeeman-Effekt ist dem der Elektronen (Gl. (1)) sehr ähnlich:

$$\hat{H}_{\text{Kern-Zeeman}X} = g_{\text{NX}} \mu_{\text{NX}} \vec{B}_{\text{ext}} \hat{I}_X \quad (17)$$

Der g-Faktor g_{NX} eines Atomkerns X ist ein Skalar. μ_{NX} bezeichnet das Kernmagneton, \hat{I}_X ist der Kernspin-Operator eines Atomkerns jeweils vom Typ X. Die Größe der Energien hängt stark vom Atomtyp ab, da unterschiedliche Atome stark unterschiedliche kernmagnetische Momente besitzen. Für Protonen bildet der Kern-Zeeman-Term den dominanten Energieterm. Andere Energiebeiträge bewirken lediglich eine Linienaufspaltung. Für Stickstoffkerne hingegen ist dieser Term klein, dort liefert die Quadrupolaufspaltung den größten Energiebeitrag.

2.2.2 Dipol-Dipol Wechselwirkung

Die Dipol-Dipol-Wechselwirkung beschreibt eine magnetische Kopplung von Elektronenspin und Kernspin.

$$\hat{H}_{\text{Dipol}X} = \hat{I}_X \tilde{A}_{\text{Dipol}X} \hat{S} \quad (18)$$

Sie findet auch zwischen Atomen statt, die nicht gebunden, aber dennoch räumlich benachbart sind. Abhängig vom Abstand des benachbarten Atoms ist das externe Magnetfeld \vec{B}_{ext} groß im Vergleich zu den magnetischen Feldern der Dipole. Die Quantisierungsachse ist daher durch das äußere Magnetfeld \vec{B}_{ext} gegeben, und Elektronenspins und Kernspins sind entkoppelt.

Ein System von 2 parallelen magnetischen Momenten (Abb. 7 A) besitzt den A-Tensor:

$$A_{ij\text{Dipol}X} = \frac{-\mu_B g_{NX} \mu_{NX}}{h |\vec{r}|^5} g_i (3r_i r_j - \delta_{ij}) \quad (19)$$

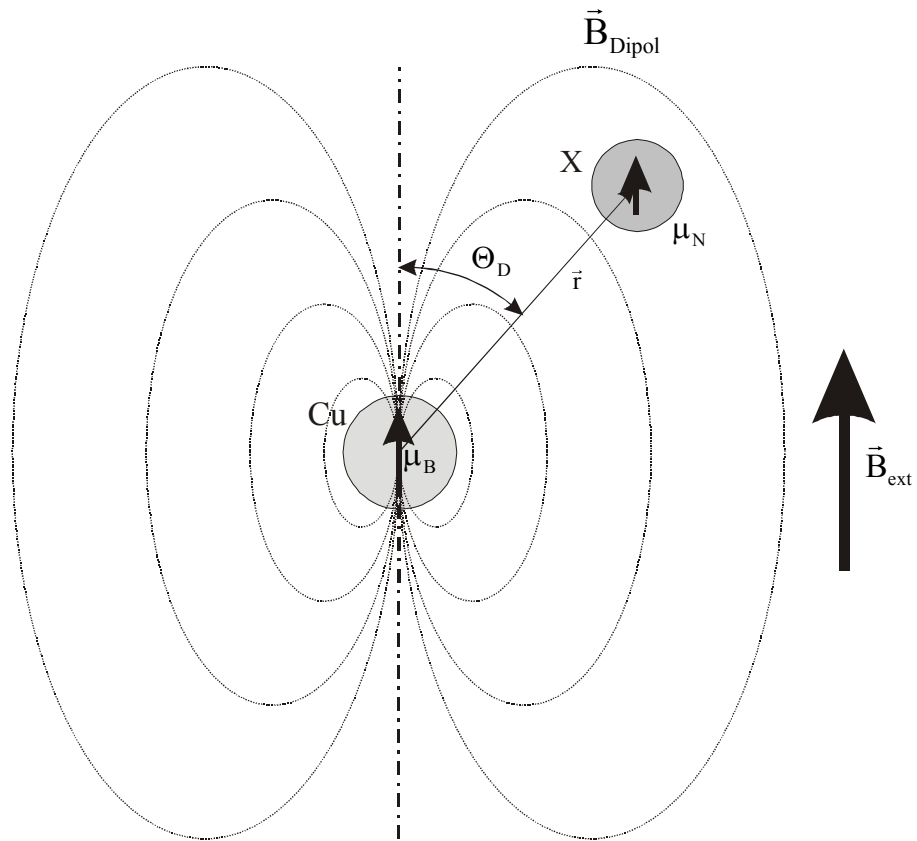
\vec{r} ist der Vektor vom Cu-Atom zum Atom X. In (Abb. 7 B) ist die Energie für einen A-Tensor der Form

$$\tilde{A}_{\text{HF}X} = \tilde{A}_{\text{Kern-Zeeman}X} + \tilde{A}_{\text{Dipol}X} \quad (20)$$

über den Winkel θ_D , dem Winkel zwischen \vec{r} und \vec{B}_{ext} , aufgetragen. Für das Beispiel wurde ein benachbartes Proton $X=^1\text{H}$ gewählt.

Gl. (19) beschreibt eine starke Abstandsabhängigkeit ($\frac{1}{r^3}$), die Winkelabhängigkeit der Wechselwirkung ist in Abb. 7 B dargestellt. Zu beachten ist eine waagrechte Tangente bei $\theta_D=180^\circ$.

A:



B:

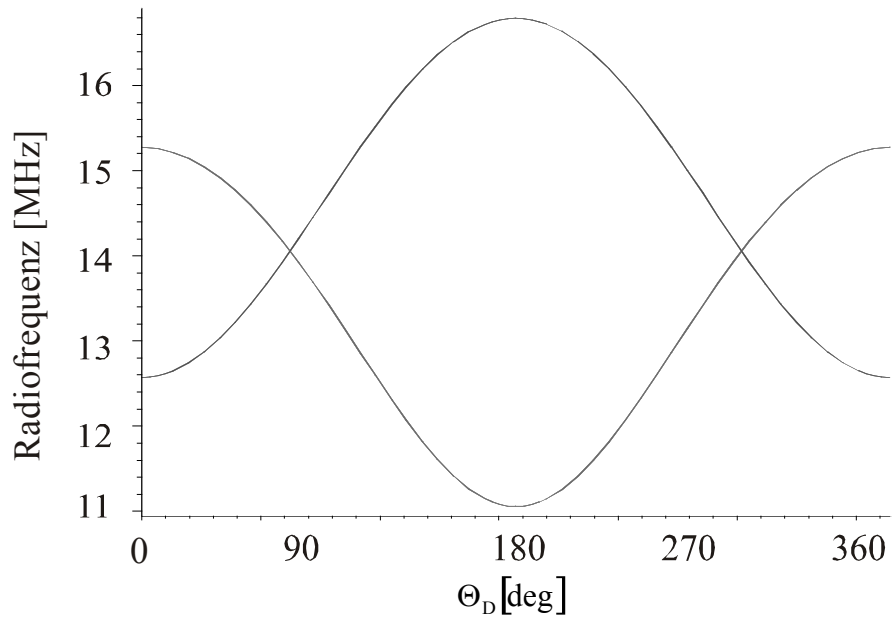


Abb. 7: A: Die Dipol-Dipol-Wechselwirkung und ihre relevanten Parameter; B: Die Übergangsenergien für einen A-Tensor der Form $A_{\text{HF } ^1\text{H}} = A_{\text{Kern-Zeeman } ^1\text{H}} + A_{\text{Dipol } ^1\text{H}}$. Das Zahlenbeispiel gilt für ein benachbartes Proton $X=^1\text{H}$ im Abstand von 3\AA .

2.2.3 Isotrope Hyperfeinwechselwirkung

Die isotrope Hyperfeinwechselwirkung wird auch Fermi-Kontakt-Wechselwirkung genannt. Ursache für diese Wechselwirkung ist eine endliche Aufenthaltswahrscheinlichkeit von ungepaarten Elektronen am Ort eines Atomkerns. Ungepaarte Elektronendichte am eigenen Atomkern entsteht durch Polarisierung tief liegender s-Orbitale. Speziell bei Metallkomplexen ist der Grad der Delokalisierung von Elektronen oft sehr hoch, daher kann ungepaarte Elektronendichte auch an Kernen von Liganden auftreten.

Die an σ -Bindungen beteiligten sp^2 - und sp^3 -Hybridorbitale von Liganden tragen teilweise s-Orbital-Charakter. Da im Wesentlichen nur s-Orbitale von Null verschiedene Aufenthaltswahrscheinlichkeit am Kernort besitzen, kann auf diese Weise ungepaarte Elektronendichte an den Kernort eines direkten Liganden übertragen werden. Eine über mehrere σ -Bindungen übertragene Fermi-Kontakt-Wechselwirkung fällt in ihrem Betrag von Bindung zu Bindung stark ab und wechselt aufgrund der Spin-Polarisation dabei das Vorzeichen. π -Bindungen übertragen nicht direkt ungepaarte Elektronendichte an den Ligandenkern, diese kann aber durch Spin-Polarisation von s-Orbitalen der Liganden hervorgerufen werden. Das Vorzeichen einer über π -Bindungen durch Polarisierung übertragenen Fermi-Kontakt-Wechselwirkung folgt keiner festen Regel, die Größenordnung des Betrags bleibt über alle Atome, beispielsweise über die eines aromatischen Rings, konstant.

Gute und konsistente Literaturdaten sind für den Fall von Histidin-ligandiertem Kupfer vorhanden. Tab. 4 fasst diese Daten zusammen.

Name	Isotrope HF-Wechselwirkung [MHz]	Quelle	Referenz
HisH α	0.3	Paramagnetische NMR	Bertini et al. (2001)
HisH α	0.3	Paramagnetische NMR	Bertini et al. (1999)
HisH ϵ 1	1.1	NMR	Bertini et al (2001)
HisH ϵ 1	1.14	NMR	Bertini et al. (1999)
HisH β 1	-0.2	NMR	Bertini et al. (2001)
HisH β 1	-0.11	NMR	Bertini et al. (1999)

Tab. 4: Literaturwerte für die isotrope Hyperfeinwechselwirkung von Histidin-ligandiertem Cu

Da für die Abschätzung der Dipol-Dipol-Wechselwirkungsenergie und damit der relativen Lage von Protonen (siehe Kapitel 2.2.2) die Kenntnis der isotropen Hyperfeinwechselwirkung zwingend erforderlich ist, sind quantenmechanische Molekülorbitalrechnungen (Weiss 2005) zusätzlich zur Recherche von Literaturdaten durchgeführt worden.

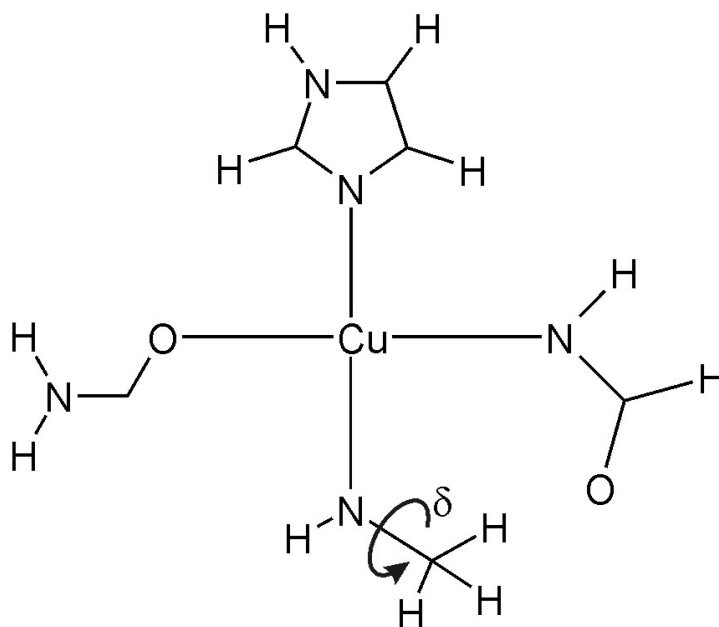


Abb. 8: Modell des Systems, für das die isotrope Hyperfeinwechselwirkung mittels Molekülorbitalrechnungen (Weiss 2005) ermittelt worden ist. δ bezeichnet den dihedralen Winkel, von dem A_{Fermi} abhängt, für den Fall, dass diese durch ein σ -Bindungssystem übertragen wird.

Bedeutend für die Datenauswertung in dieser Arbeit sind vor allem die Werte der isotropen Hyperfeinwechselwirkung an den Protonen, die an die Glycin- C_{α} -Atome gebunden sind, unter der Annahme, dass das zum Protein-Rückgrat gehörige Stickstoffatom an das Kupfer bindet. Der Vergleich von Werten der isotropen Hyperfeinwechselwirkung mit Literaturdaten für diese Art von Protonen ist nur eingeschränkt möglich, weil zum einen nur wenige Untersuchungen direkt an Cu-Komplexen durchgeführt worden sind und weil zum anderen die Stärke der Wechselwirkung stark von dem in Abb. 8 gezeigten dihedralen Winkel δ abhängt. Aus diesem Grund sind Molekülorbitalrechnungen ausgeführt worden. Diese liefern korrekte Aussagen bezüglich Vorzeichen und Größenordnung. Das Modell, an dem diese Berechnungen durchgeführt worden sind, ist in Abb. 8 dargestellt. Für Details zu diesen Berechnungen sei auf (Weiss 2005) verwiesen. 3N und 10O ligandieren das Cu-Zentrum. An einem Stickstoffliganden wurde eine dem Protein-Rückgrat ähnliche Struktur angefügt. Um die Abhängigkeit der Wechselwirkungskonstanten von dem dihedralen Winkel zu bestimmen,

ist dieser mit einem Intervall von 10° -Schritten gedreht und das Potential später parametrisiert worden. Abb. 9 zeigt die Abhängigkeit der isotropen Hyperfeinwechselwirkung vom dihedralen Winkel.

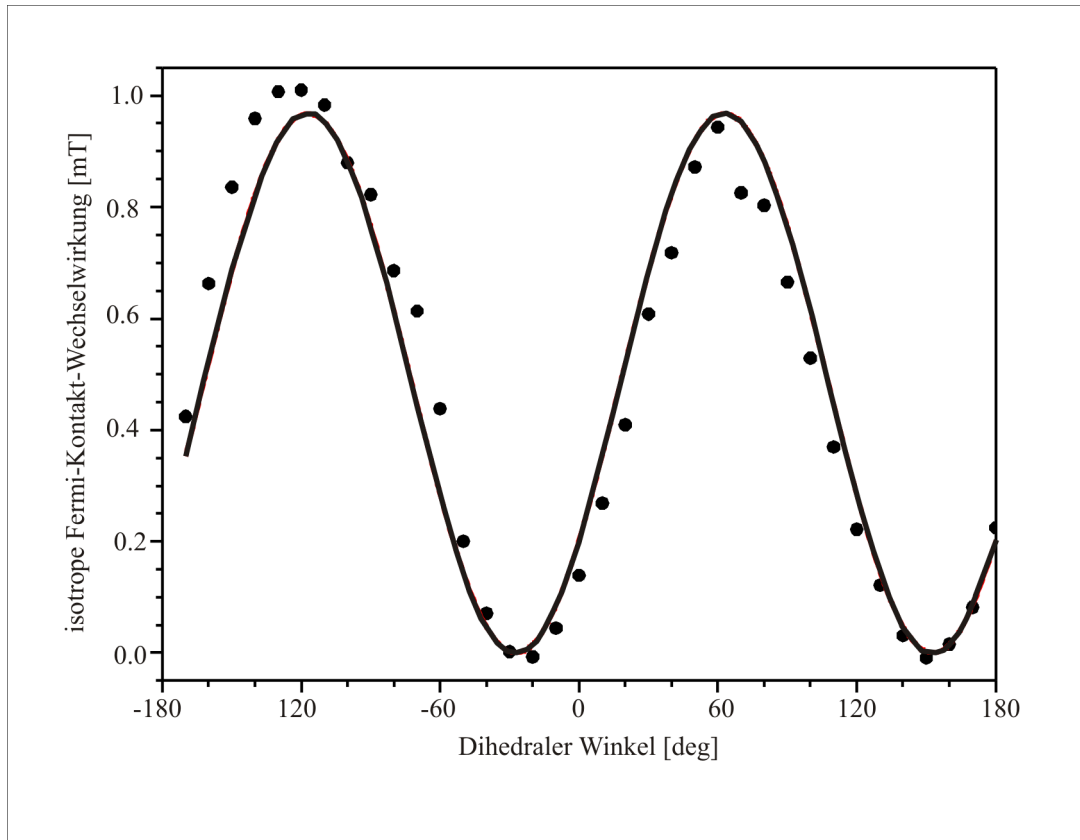


Abb. 9: Abhängigkeit der isotropen Hyperfeinwechselwirkung von dem dihedralen Winkel δ (Abb. 8). Die Kurve kann parametrisiert werden mit $A_{\text{Fermi}} = C \sin^2(\delta - \delta_0)$ und den Variablen $C=0.97$, $\delta_0=-27^\circ$

2.2.4 Der ENDOR Effekt

ENDOR bezeichnet die Abkürzung für **E**lectron **N**uclear **D**ouble **R**esonance. Für den Fall $I_{\text{Cu}}=3/2$, $S=1/2$ ergibt sich das Termschema in Abb. 10 A. Mit Hilfe der ENDOR-Spektroskopie ist es möglich, die Energieniveaus der Hyperfeinwechselwirkung mit erheblich höherer Präzision zu beobachten.

A: ENDOR Termschema

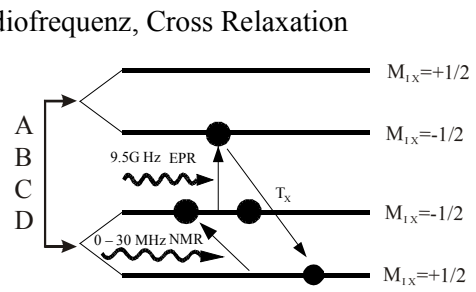
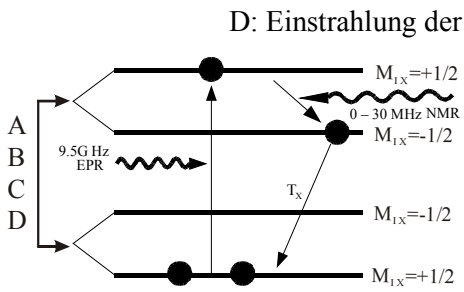
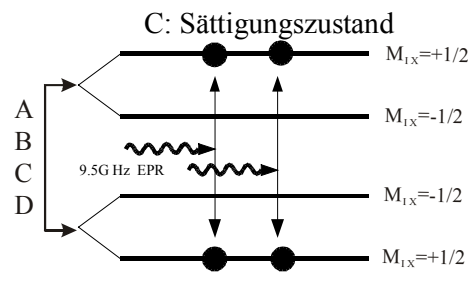
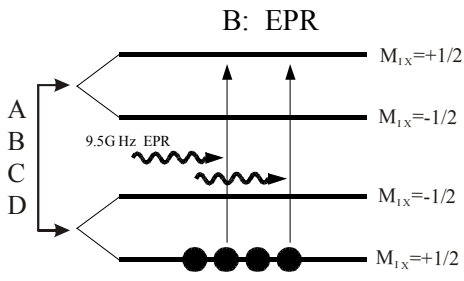
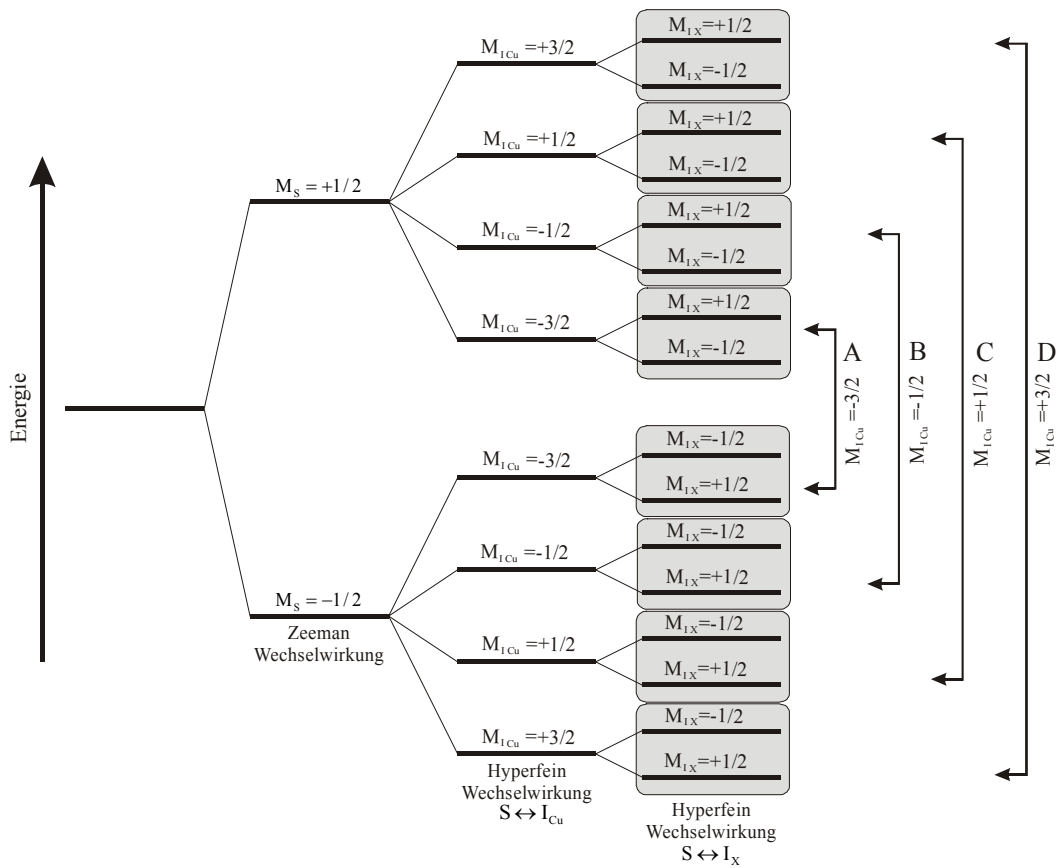


Abb. 10: Darstellung der EPR- und NMR-Übergänge bei ENDOR-Spektroskopie, zusätzlich sind die beiden „Cross-Relaxations“ Kanäle eingezeichnet, die durch Einstrahlung von Radiowellen „aktiviert“ werden können. Mit A, B, C und D sind jeweils die Übergänge für $M_{ICu} = 3/2, 1/2, -1/2$ und $-3/2$ bezeichnet.

Bei diesem Messprinzip wird mit der Einstrahlung einer großen Mikrowellenleistung das System gesättigt, und die Nettoabsorption und damit das zu detektierende Signal verschwinden (Abb. 10 B). Auf beiden EPR-Energieniveaus herrscht dann Gleichbesetzung (Abb. 10 C). Mittels elektromagnetischer Energie im MHz – Bereich (Radiofrequenzbereich) ist es möglich, jeweils einen der beiden mit NMR bezeichneten Übergänge anzuregen (Abb. 10 D). Ist die Cross-Relaxationszeit T_x klein, öffnet sich dadurch ein neuer, effektiver Relaxationspfad, das obere EPR-Energieniveau kann depopuliert werden. Dadurch kann wieder Nettoabsorption von EPR-Strahlung (9.5 GHz) stattfinden. Ohne Radiofrequenz ist der T_x - Übergang ineffektiv, weil der langsame NMR – Übergang mit ihm in Serie geschaltet ist.

Damit diese Art von Experiment funktioniert, muß oft bei tiefen Temperaturen gearbeitet werden ($T=17K$), weil nur unter diesen Bedingungen EPR- ($\Delta M_s = \pm 1$) und NMR- ($\Delta M_I = \pm 1$) Übergänge ähnliche Tansferraten erreichen.

2.2.5 Winkelselektion mit ENDOR-Spektroskopie

Für die weiteren Betrachtungen ist es zweckmäßig, das in Abb. 11 dargestellte Koordinatensystem einzuführen (Hurst et al. 1985). Das molekülfeste Koordinatensystem ist relativ zum externen B-Feld B_{ext} um Θ und Φ gedreht. Protonenlagen werden relativ zum molekülfesten Koordinatensystem durch den Abstand r und die beiden Winkel Θ_N und Φ_N definiert.

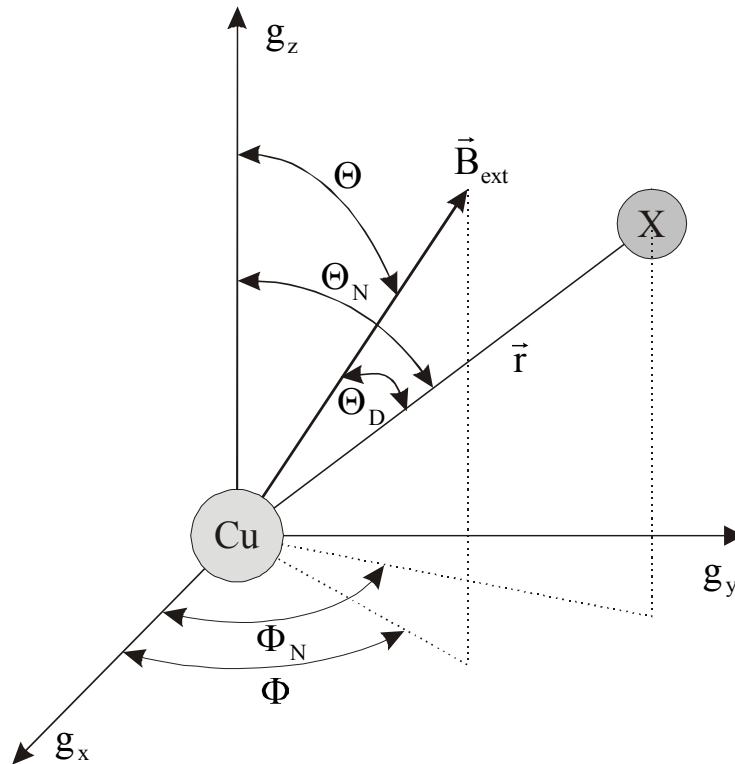


Abb. 11: Molekülfestes Koordinatensystem, Definition der Polaren Winkel Θ , Θ_N , Φ und Φ_N . X bezeichnet ein Atom, entweder ^{15}N oder ^1H

Wie bereits in Abb. 6 dargestellt, ändern sich die EPR Parameter g_{eff} und A_{eff} je nach relativer Position des Moleküls zum externen Magnetfeld B_{ext} . Für den Fall eines Cu-ligandierten Octapeptids ist dies in Abb. 12 dargestellt. Die Aufspaltung der Trajektorien (Abb. 12 B) gibt die Größe der Hyperfeinwechselwirkung der Elektronen mit dem Cu-Kern an. Sie ändert sich mit Θ , ebenso wie der Schwerpunkt der Linien, die durch den g-Faktor gegeben ist. Die Änderungen der Parameter mit dem Winkel Φ sind klein aufgrund der axialen Symmetrie des Systems, sie fallen mit $\Theta = \pi/2$ aber immer stärker ins Gewicht. Daher verbreitern sich die Trajektorien für $\Theta = \pi/2$.

Nach einer derartigen Analyse des Spektrums ist es auch umgekehrt möglich, den oder die Winkel Θ der Atome zu bestimmen, die bei einem bestimmten B-Feld in Resonanz sind (Hurst et al. 1985). Bei dem in Abb. 12 hervorgehobenen Feld von 280.0 mT ist das nur ein einziger Winkel von etwa 30° . Da bei axialer Symmetrie nach dem Winkel Φ nicht aufgelöst werden kann, werden alle Atome mit $\Theta=30^\circ$ angeregt.

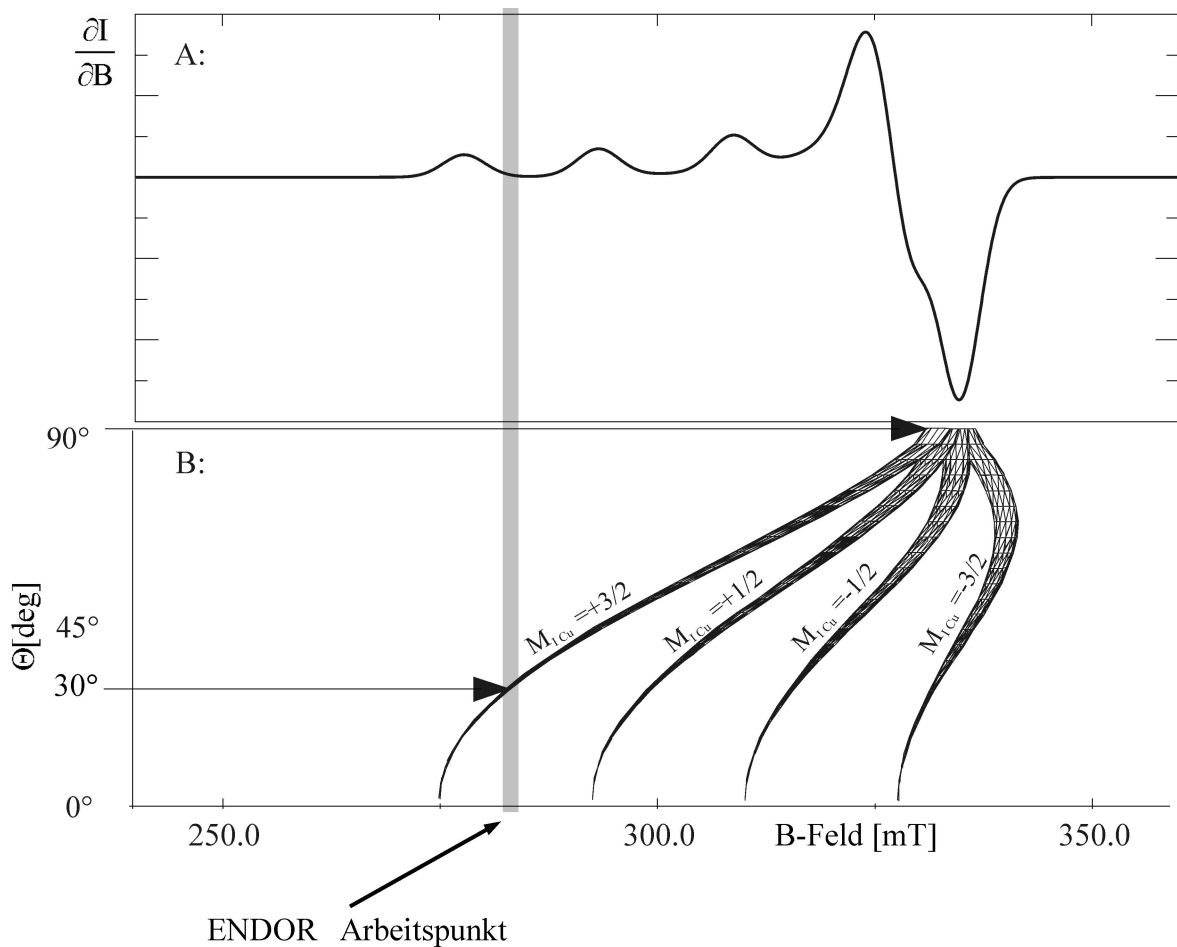


Abb. 12: A: Beispiel eines EPR Spektrums eines Cu-Komplexes (theoretisch berechnet). B. : Abhängigkeit der Resonanzposition vom Winkel θ . Sowohl der Schwerpunkt der Resonanzen als auch die Größe der Linienaufspaltung ändern sich mit dem Winkel θ . Bei einer kleinen Störung der axialen Symmetrie vergrößert sich auch die Linienbreite mit zunehmendem θ .

2.2.6 Anzahl und Lage von Protonresonanzen

Um Anzahl und Lage von Protonresonanzen zu bestimmen, müssen Abstand r_N und Winkel Θ_N (siehe Abb. 11) des Protons bekannt sein, ebenso die Parameter des EPR Spektrums und dessen Symmetrie. Winkelzuordnungen, so wie in Abb. 12, müssen gezielt möglich sein. Da bei konstantem Magnetfeld immer ein Ensemble von Molekülen in Resonanz ist, welches mit dem Magnetfeld B_{ext} einen Winkel Θ einschließt, muß eine Mittelung des ENDOR-Spektrums über Φ vorgenommen werden, denn unterschiedliche Winkel Φ bei konstantem Winkel Θ bewirken unterschiedliche Winkel Θ_D (siehe Abb. 11) und damit unterschiedliche Dipol-Dipol-Wechselwirkungen. Konstantes Θ und beliebiges Φ beschreiben Moleküle, deren Symmetrieachse einen Konus mit Öffnungswinkel Θ beschreibt. Bei Transformation

auf ein molekulfestes Koordinatensystem beschreibt das B-Feld dann einen Konus mit Öffnungswinkel Θ , siehe Abb. 13 A.

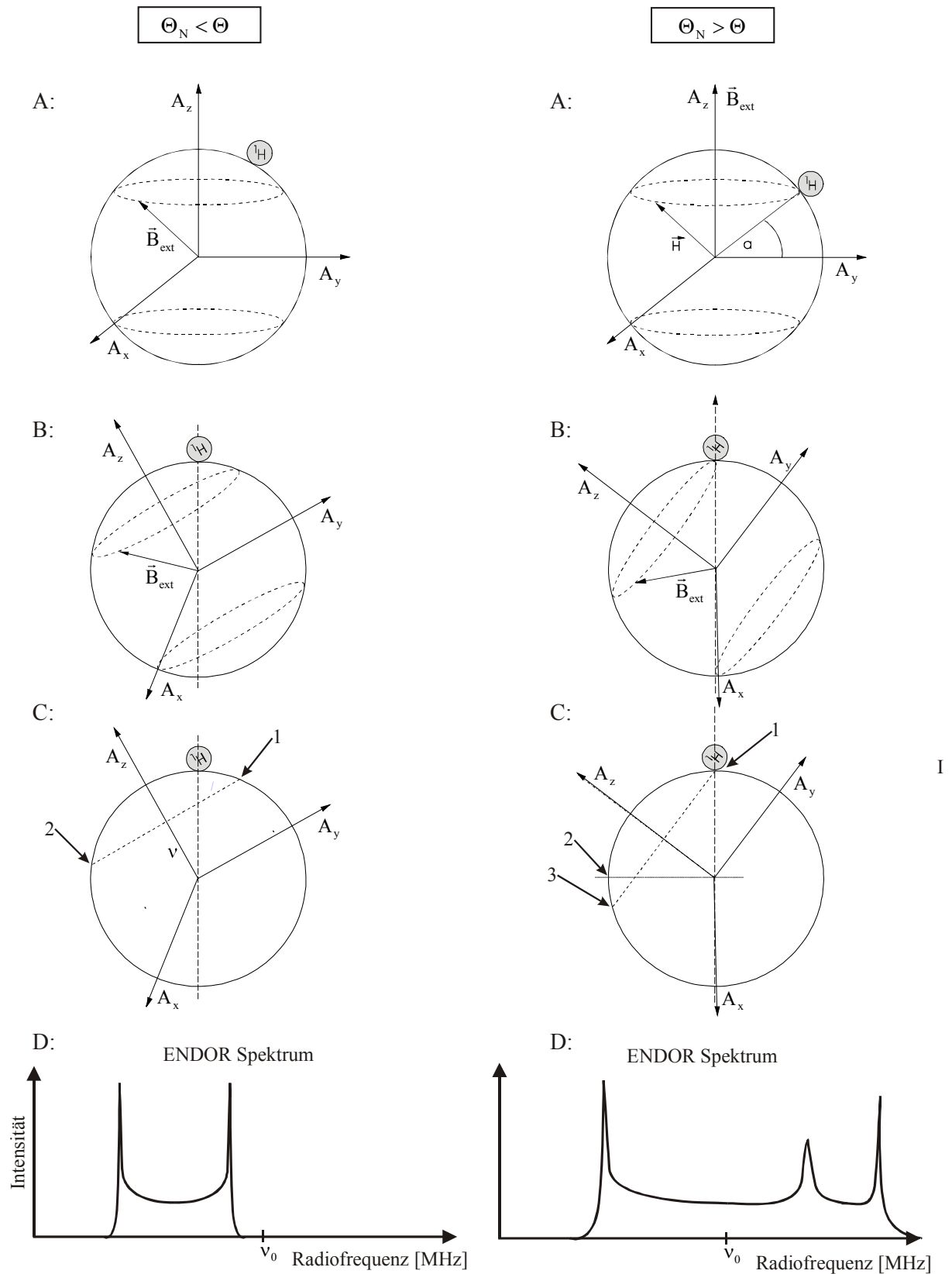


Abb. 13: ENDOR-Protonresonanzen jeweils für $\Theta_N < \Theta$ (linke Spalte), und $\Theta_N > \Theta$ (rechte Spalte). Die Erklärung befindet sich im Text (Kap.2.2.6)

Um den Winkel Θ_D gut sichtbar zu machen, ist es sinnvoll, ein zweites Mal auf ein Koordinatensystem zu transformieren, das um den Winkel Θ_D gedreht ist, so dass das zu untersuchende Proton auf der z-Achse zu liegen kommt, gezeigt in Abb. 13 B. Das B-Feld beschreibt nun einen gekippten Konus, der Winkel, den es mit der z-Achse einschließt, entspricht genau dem Winkel Θ_D (Hurst et al. 1985).

Für $\Theta_N < \Theta$ haben die möglichen Winkel Θ_D 2 Häufungspunkte, bezeichnet mit 1 und 2 in Abb. 13 C, linke Spalte. Entsprechend dieser Häufungspunkte ergeben sich im integralen ENDOR-Spektrum 2 Peaks (Abb. 13 D linke Spalte). Das gemessene Spektrum ist die 1. Ableitung dieses integralen Spektrums.

Für alle Winkel $\Theta_N > \Theta$ ergeben sich bei analogen Überlegungen 3 Häufungspunkte, da die Dipol-Dipol-Wechselwirkung selbst für $\Theta_D = \pi/2$ (Punkt 2 in Abb. 13 C rechts) einen Extrempunkt besitzt. Entsprechend ergeben sich im integralen ENDOR-Spektrum 3 Peaks statt 2. Dargestellt ist dies in Abb. 13 C und D, rechte Spalte.

2.3 Gepulste EPR-Spektroskopie

Während die Probe bei CW-Spektroskopie einer kontinuierlichen Mikrowellenstrahlung ausgesetzt ist und Energieübergänge durch Absorption dieser Strahlung gemessen werden, setzt man bei gepulster EPR-Spektroskopie die Probe kurzen, energiereichen Mikrowellenpulsen aus.

Im einfachsten Fall für $S=1/2$ spalten die beiden bei $B_{\text{ext}} = 0$ entarteten Energieniveaus auf, so wie in Gl. (3) und (4) und in Abb. 3 beschrieben. Die beiden Energieniveaus werden nach der Boltzmannstatistik, Gl. (5), populiert. Die Einzelspins der Elektronen präzedieren mit der Larmorfrequenz ν_0 um das externe Magnetische Feld \vec{B}_{ext} :

$$\nu_0 = \gamma B_{\text{ext}} \quad (21)$$

γ ist das gyromagnetische Verhältnis des Elektrons. Setzt man dieses Spinsystem einem Mikrowellenpuls aus, so ergeben sich zwei Effekte: Einmal klappen einzelne Spins aus dem energiearmen, antiparallelen, Niveau in das energiereiche, parallele, und zum anderen findet eine Phasenfokussierung der Einzelspins bezüglich der Larmorpräzession statt. Beide Effekte

sind in Abb. 14 dargestellt. Abb. 14 A zeigt das Spinsystem vor dem Puls, Abb. 14 B zeigt es danach.

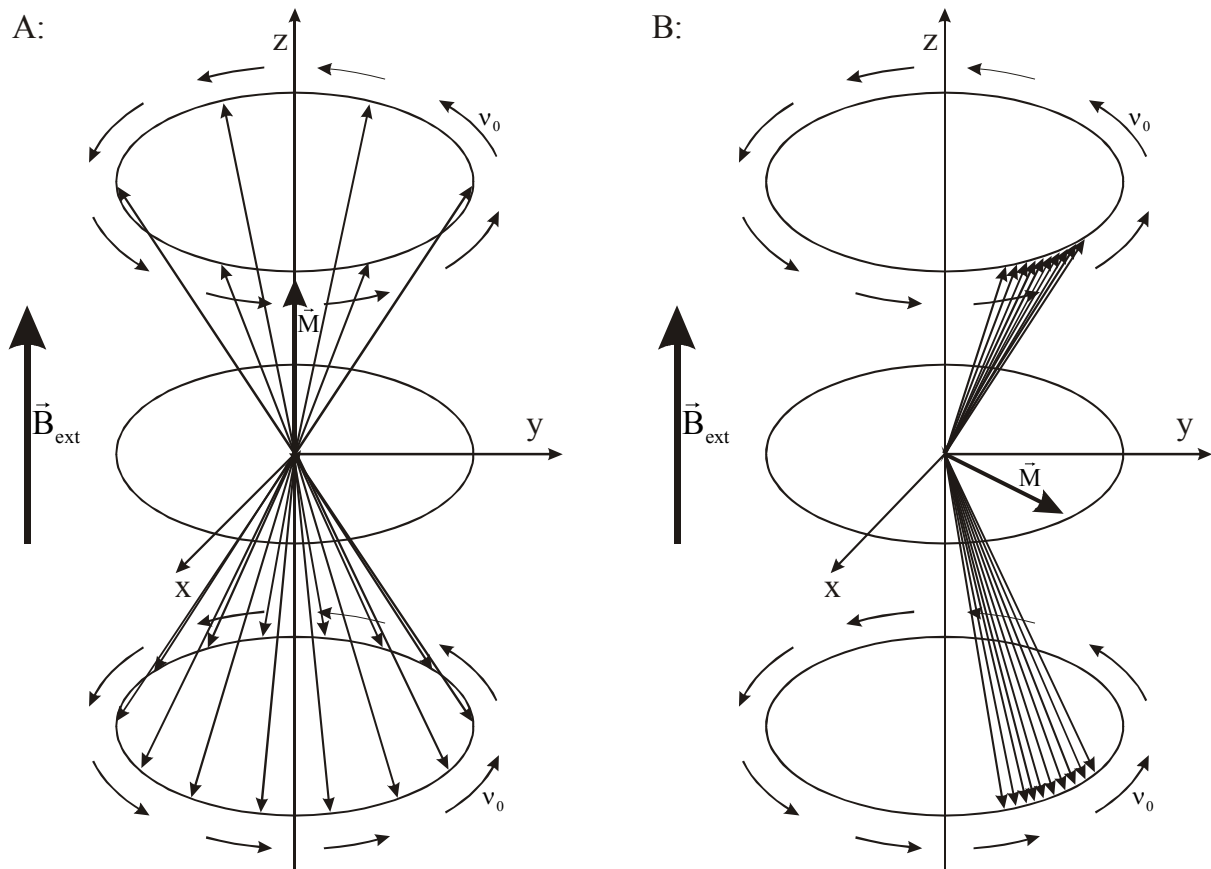


Abb. 14: Effekt eines Mikrowellenpulses auf ein Spinsystem: Klappen von Einzelspins in das energiereiche Niveau und gleichzeitige Phasenfokussierung von Einzelspins bezüglich der Präzessionsbewegung.

Aufgrund der Phasenfokussierung kommt es zu einer transversalen Magnetisierung, welche mit Larmorfrequenz um die B_{ext} -Achse rotiert. Der beschleunigte, magnetische Dipol emittiert elektromagnetische Strahlung, die detektiert wird. An dieser Stelle wird, um die nachfolgende Diskussion zu vereinfachen, ein rotierendes Koordinatensystem x' , y' , z' eingeführt. Es rotiert mit der Larmorfrequenz ν_0 um das externe Magnetfeld B_{ext} , wie in Abb. 15 dargestellt.

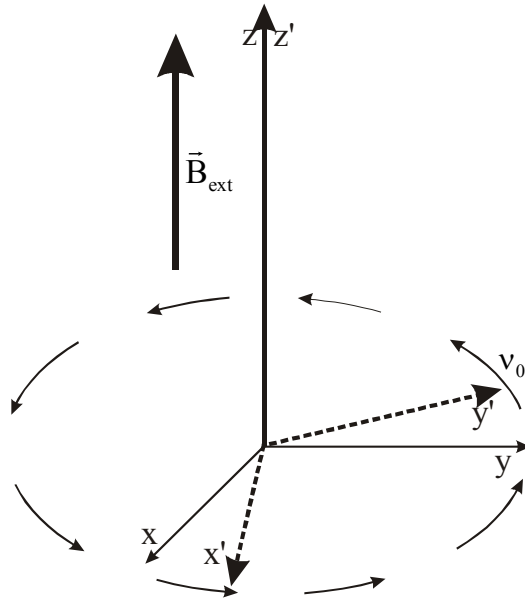


Abb. 15: mit Larmorfrequenz rotierendes Koordinatensystem (gestrichelt)

Alle mit der Larmorfrequenz ν_0 rotierenden Spins und Momente ruhen dort. Im rotierenden Koordinatensystem wird das Magnetfeld \vec{B}_{ext} also wegtransformiert ($\vec{B}_{\text{ext}} = 0$). Um das Spinsystem zu beschreiben, führt man die makroskopische Größe \vec{M} , das magnetische Moment der Probe, ein.

$$\vec{M} = \sum_i \mu_{B_i} \quad (22)$$

μ_{B_i} bezeichnet das Bohrsche Magneton eines einzelnen Elektrons i . Diese Vorgehensweise vereinfacht die Beschreibung enorm, behandelt quantenmechanische Effekte allerdings nicht exakt. Die Magnetisierung \vec{M} der Probe ist in Abwesenheit weiterer Magnetfelder antiparallel zu \vec{B}_{ext} . Das Einstrahlen einer resonanten, linearpolarisierten elektromagnetischen Welle in dieses System wird beschrieben, indem diese als Summe zweier zirkularpolarisierter Wellen im rotierenden Koordinatensystem x', y', z' dargestellt wird. Das B-Feld der einen linearpolarisierten Wellen ruht im rotierenden Koordinatensystem, ihr Magnetfeld liegt in der x', y' -Ebene und wird mit \vec{B}_1 bezeichnet. Das Magnetfeld der anderen zirkularpolarisierten Welle rotiert mit der Frequenz $-2\nu_0$. Die Präzession der Magnetisierung gehorcht beiden Magnetfeldern, es ist aber kein integraler Effekt des mit $-2\nu_0$ rotierenden Feldes vorhanden, daher wird dieser Anteil im Folgenden weggelassen. Wie in Abb. 16 A dargestellt rotiert die Magnetisierung aus der z/z' -Richtung um die Achse B_1 . Der Drehwinkel ist umso größer, je größer das B_1 -Feld bzw. die Energie des Pulses ist und je länger die Pulsdauer ist.

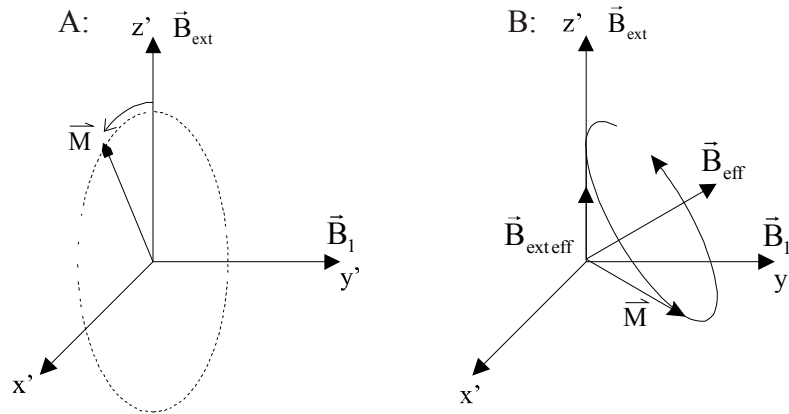


Abb. 16: Klappen der Magnetisierung. A: mittels eines resonanten Mikrowellenpulses B: mittels eines nichtresonanten Mikrowellenpulses

Die Magnetisierung \vec{M} wird bei einer Pulsdauer von τ mit der Frequenz $\omega = \gamma_e B_1$ um den Winkel ϕ gedreht:

$$\phi = \gamma_e B_1 \tau \quad (23)$$

Bei einem Puls, der die Magnetisierung um $\phi = 90^\circ$ dreht, spricht man von einem $\pi/2$ -Puls, entsprechend von einem π -Puls bei Drehung um $\phi = 180^\circ$. Bei einem nicht-resonant eingestrahlten elektromagnetischen Puls rotiert das x', y', z' -Koordinatensystem, in dem die zirkularpolarisierte Welle B_1 ruht, nicht exakt mit der Larmorfrequenz ν_0 . Als Folge davon wird das externe Magnetfeld B_{ext} nicht zur Gänze wegtransformiert, lediglich sein Betrag wird kleiner ($\vec{B}_{\text{eff ext}}$) (siehe Abb. 16 B). Die Rotationsbewegung der Magnetisierung findet daher nicht um eine Achse \vec{B}_1 statt, die in der x', y' -Ebene liegt, sondern um ein effektives Magnetfeld \vec{B}_{eff} welches aus der Summe aus $\vec{B}_{\text{eff ext}}$ und B_1 gebildet wird (siehe Abb. 16 B). Präzises Klappen der Magnetisierung ist dann nicht mehr möglich.

2.3.1 Spin–Spin und Spin–Gitter Relaxationszeit

Setzt man die Probe einem oder mehreren Mikrowellenpulsen aus, so verläßt deren Magnetisierung \vec{M} die Lage des thermischen Gleichgewichts \vec{M}_0 antiparallel zu \vec{B}_{ext} . \vec{M} beginnt mit der Larmorfrequenz (Gl. (21)) um \vec{B}_{ext} zu präzedieren, weil \vec{B}_{ext} auf \vec{M} nach der Bewegungsgleichung

$$\frac{\partial \vec{M}}{\partial t} = \gamma \vec{B}_{\text{ext}} \times \vec{M} \quad (24)$$

mit

$$\gamma = \frac{2\pi g \mu_B}{h} \quad (25)$$

ein Moment ausübt.

Die Relaxation des Moments \vec{M} zum Gleichgewichtszustand \vec{M}_0 wird durch zwei charakteristische Relaxationszeiten beschrieben. Die Spin-Gitter-Relaxationszeit T_1 beschreibt die Relaxation der z-Komponente der Magnetisierung M_z . Es gilt:

$$\frac{dM_z}{dt} = -\frac{M_z - M_{0z}}{T_1} \quad (26)$$

Und entsprechend mit der Randbedingung für einen 180° Puls $M_z(t=0) = -M_{0z}$:

$$M_z(t) = M_{0z} - 2M_{0z} \exp\left(-\frac{t}{T_1}\right) \quad (27)$$

Im quantenmechanischen Bild ist T_1 die charakteristische Zeitkonstante, mit der die Elektronenspins aus dem Zustand $S_z = +\frac{1}{2}$ in den Zustand $S_z = -\frac{1}{2}$ zurückklappen, so wie in Abb. 17 A dargestellt. Ihre Energie wird dabei an die Umgebung, das „Gitter“, als Wärme abgegeben. Sie wird daher als Spin-Gitter Relaxationszeit oder auch longitudinale Relaxationszeit bezeichnet.

Die Spin-Spin oder transversale Relaxationszeit T_2 ist die charakteristische Zeit, mit der die durch einen Mikrowellenpuls hervorgerufene Phasenfokussierung relaxiert. Entsprechend nimmt auch das transversale magnetische Moment ab. Der Vorgang ist in Abb. 17 B dargestellt. Er ist im allgemeinen wesentlich schneller als die Spin-Gitter-Relaxation.

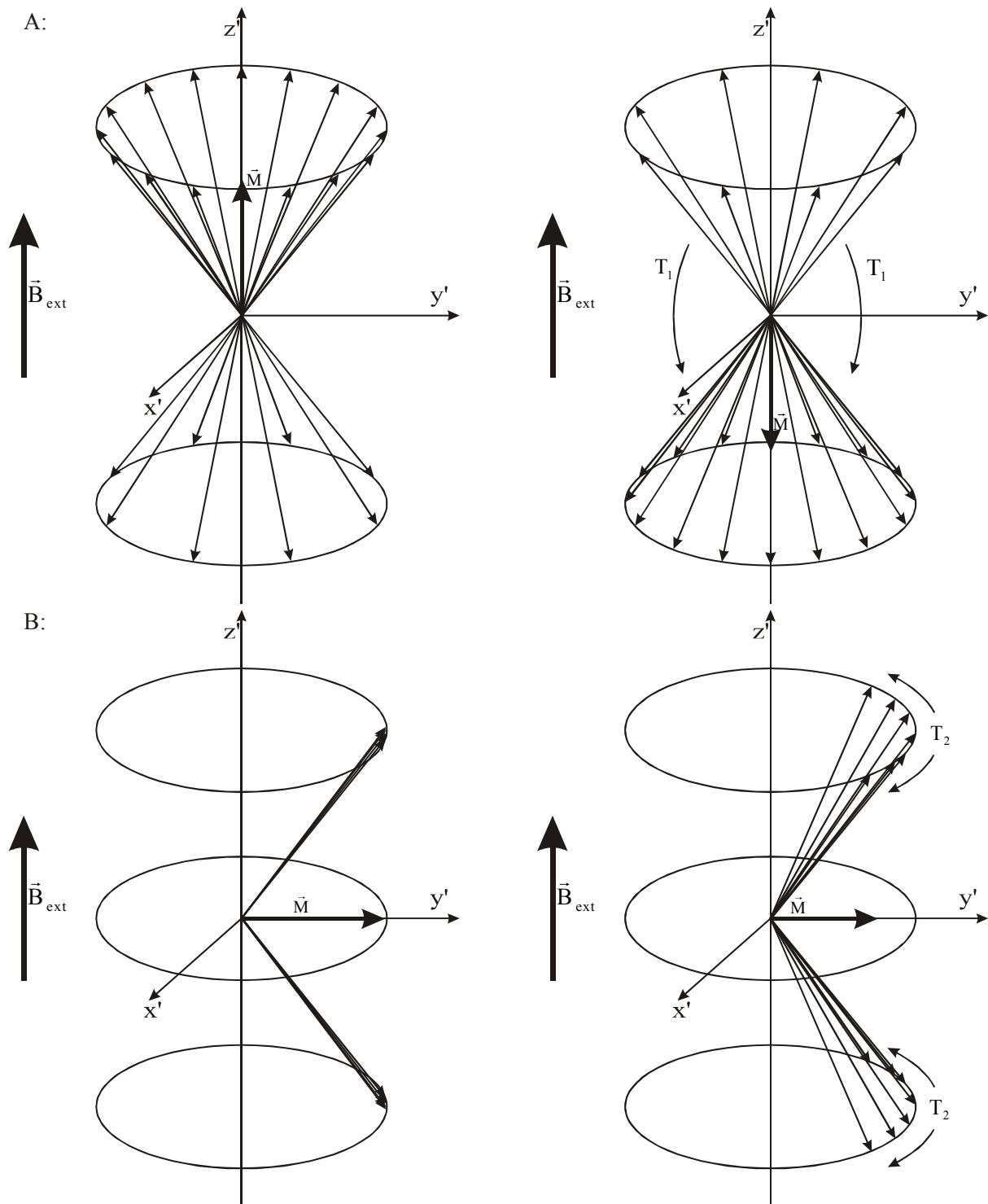


Abb. 17: A: Der Effekt der Spin-Gitter Relaxation: Spins klappen aus dem energiereichen, parallelen Niveau zurück in das energieärmere antiparallele, solange bis das thermische Gleichgewicht, d.h. die Boltzmannpopulation nach Gl. (5) wiederhergestellt ist. B: Der Effekt der Spin-Spin Relaxation: Die durch einen Puls hervorgerufene Phasenfokussierung verschwindet wieder, entsprechend nimmt das transversale magnetische Moment ab.

2.3.2 Spin Echo

Sie ist die einfachste Pulsfolge und wird herangezogen, um die Spin-Spin-Relaxationszeit zu messen. Sie wird aber auch als „Detektorpuls“ verwendet, um die Größe der Magnetisierung der Probe zu einem bestimmten Zeitpunkt sichtbar zu machen. Die Magnetisierung wird zunächst mit einem 90° -Puls in die xy -Ebene geklappt (Abb. 18). Quantenmechanisch kommt dieses „Klappen“ durch eine Gleichverteilung der Elektronenspins auf beide Energieniveaus und eine gleichzeitige Phasenfokussierung der Präzessionsbewegung zustande (Abb. 14). Aufgrund der dann einsetzenden Spin-Spin Relaxation und aufgrund von Feldinhomogenitäten nimmt die Phasenkohärenz und damit die transversale Magnetisierung ab. Mittels eines nach einer Zeit τ eingestrahnten 180° -Pulses werden die langsamer präzedierenden Spins vor die schneller präzedierenden Spins geklappt. Etwaige zeitunabhängige Feldinhomogenitäten werden jetzt in der anderen Richtung durchlaufen und heben sich daher auf. Nach der Zeit 2τ haben die schneller präzedierenden Spins die langsamer präzedierenden Spins wieder eingeholt. Es baut sich wieder transversale Magnetisierung auf. Das entstehende Signal wird als Echo bezeichnet. Es ist aufgrund der Spin-Spin-Relaxation kleiner als die ursprünglich vor dem 180° -Puls vorhandene transversale Magnetisierung. Abb. 18 A beschreibt das Verhalten des Spinsystems im rotierenden Koordinatensystem. Abb. 18 B illustriert die zugehörige Pulsfolge und die Position des Echos. Um den exponentiellen Zerfall der transversalen Magnetisierung direkt sichtbar zu machen, verlängert man die Wartezeit τ zwischen den Pulsen. Das System relaxiert dann länger. Die Intensität des Echos ist ein direktes Maß für die Größe der transversalen Magnetisierung.

Um die zu einem bestimmten Zeitpunkt vorhandene longitudinale Magnetisierung sichtbar zu machen, wird oft an komplexe Pulsfolgen eine Spin-Echo-Sequenz angehängt. Diese erlaubt dann (unter Berücksichtigung der Spin-Spin-Relaxation) eine Bestimmung der longitudinalen Magnetisierung. Bei Messung der Spin-Spin-Relaxationszeit wird die Intensität des Echos über verschiedene Wartezeiten τ aufgetragen. Der exponentielle Abfall der Echo-Intensität erfolgt mit der charakteristischen Spin-Spin-Relaxationszeit.

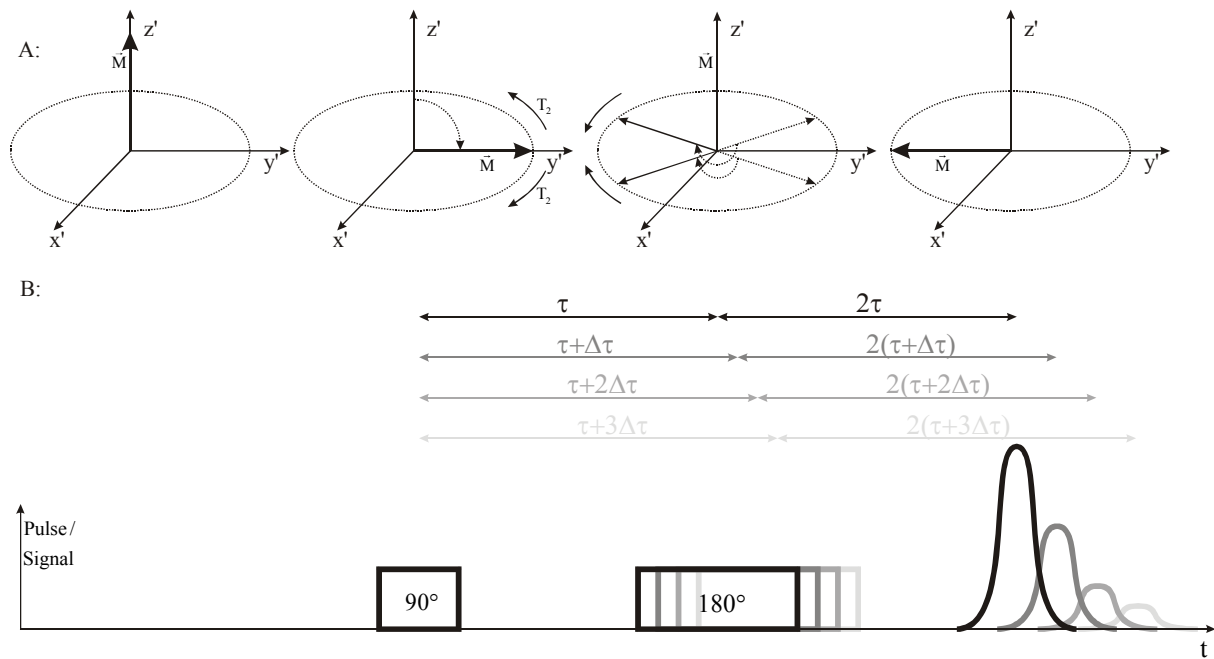


Abb. 18: Die Spin-Echo Pulsfolge: A beschreibt das Verhalten des Spinsystems, B die Pulsfolge, bzw. die Position des Echos auf der Zeitachse. B stellt die exponentielle Abnahme des Echos bei Verlängerung der Zeit τ zwischen den Pulsen dar.

2.3.3 Inversion Recovery

Die Pulsfolge dient zum Bestimmen der longitudinalen oder Spin-Gitter-Relaxationszeit. Mittels eines 180° -Pulses wird die Magnetisierung der Probe invertiert. Das energiereiche Niveau ist dann stärker populierte als das energiearme (Inversion). Während der Relaxationsphase nimmt die invertierte (parallel zu \vec{B}_{ext}) Magnetisierung zunächst immer weiter ab, wechselt dann das Vorzeichen und nimmt danach wieder zu (antiparallel zu \vec{B}_{ext}). Die momentane Größe der longitudinalen Magnetisierung wird mittels einer Spin-Echo-Pulsfolge als Detektorpuls gemessen. Die Intensität des Echos wird über die Wartezeit t aufgetragen. Das Signal fällt mit der charakteristischen Relaxationszeit für die Spin-Gitter-Relaxation ab.

2.3.4 ESEEM

ESEEM bezeichnet die Abkürzung für **E**lectron **S**pin **E**cho **E**nvelope **M**odulation. Unter Ausnutzung dieses Effekts lassen sich sehr kleine Hyperfein-Wechselwirkungskonstanten bestimmen, so wie sie etwa bei der Wechselwirkung zwischen einem ungepaarten Elektron und einem benachbarten, nicht direkt gebundenen Stickstoffatom auftreten. Befinden sich nämlich in der Umgebung des ungepaarten Elektrons weitere magnetische Momente, so

verschiebt deren zusätzlich vorhandenes magnetisches Feld die Larmorfrequenz des Elektrons. So ruft beispielsweise ein benachbartes N (Kernspin $I=1$) 3 leicht unterschiedliche Larmorfrequenzen hervor, jeweils eine für $M_{IN} = 1, 0, -1$. Bei der Durchführung einer Spin-Echo Pulsfolge in so einem System, werden die magnetischen Momente aller 3 Spinensembles in die $x'y'$ -Ebene geklappt. Sie unterliegen gleichermaßen der Spin-Spin-Relaxation, werden auch in derselben Weise wieder refokussiert. Da die integralen magnetischen Momente der 3 einzelnen Ensembles eine leicht unterschiedliche Larmorfrequenz aufweisen, stellt man im Gesamtmoment der Probe eine Schwebung fest, da je nach Wartezeit τ die 3 einzelnen magnetischen Momente anders zu einem gesamten magnetischen Moment addieren. Dem exponentiellen Abfall des Echos aufgrund der Spin-Spin-Relaxation ist daher das Signal einer Schwebung überlagert. Durch Fouriertransformation dieser Schwebung lassen sich ihre einzelnen Frequenzen ermitteln. Daraus wiederum kann auf Art und Abstand des benachbarten magnetischen Moments geschlossen werden.

Die für eine ESEEM Messung durchzuführende Pulsfolge gleicht im Wesentlichen einer Spin-Echo-Pulsfolge. Sie ist in Abb. 19 dargestellt. Lediglich bei der Dimensionierung der Pulslängen ist darauf zu achten, dass diese möglichst kurz gewählt werden. Das soll eine möglichst hohe spektrale Breite gewährleisten, damit auch möglichst starke Hyperfeinwechselwirkungen und damit große Frequenzverschiebungen detektiert werden können.

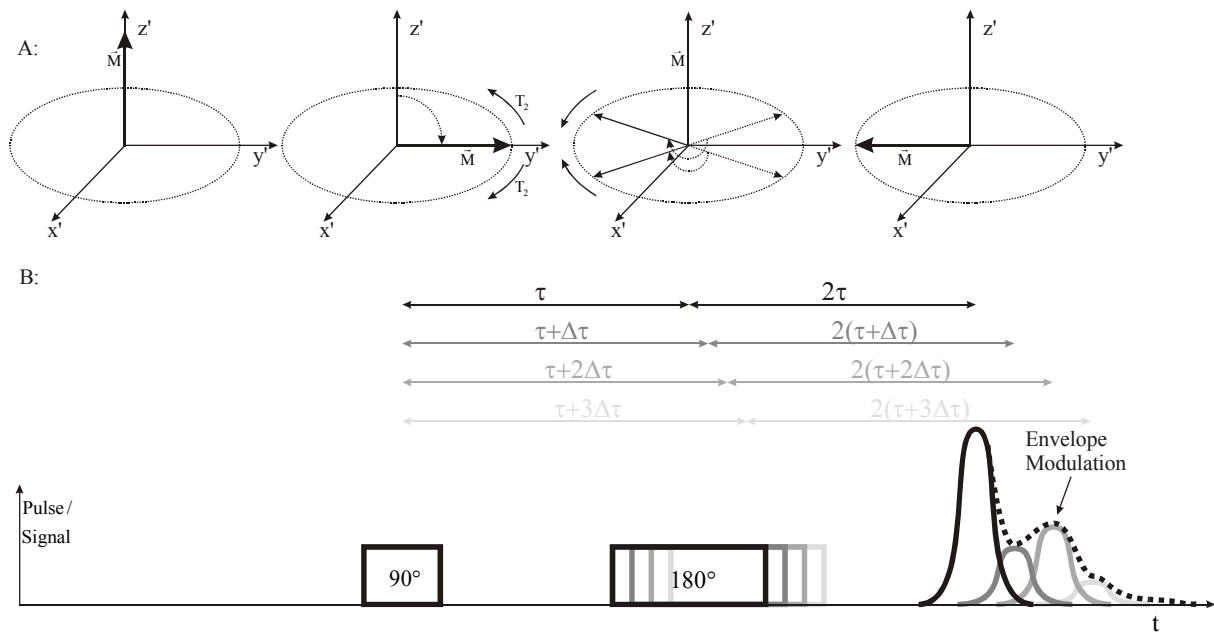


Abb. 19: Die 2-Puls ESEEM-Pulsfolge entspricht im Wesentlichen der Spin-Echo-Pulsfolge, es ist lediglich darauf zu achten, dass eine möglichst große spektrale Breite der Pulse, gewährleistet ist. Die Einhüllende der Pulse ist aufgrund schwacher hyperfeinwechselwirkung moduliert.

2.4 EXAFS-Spektroskopie

Im Zuge dieser Arbeit ist es nicht möglich in der gebotenen Kürze eine umfassende Darstellung der EXAFS-Spektroskopie zu geben. Es wird daher lediglich versucht Wesentliches zum Verständnis dieser Arbeit anhand einiger Bilder anschaulich zu machen. Für eine weitergehende Darstellung sei auf die Doktorarbeit von Klaus Grantner (Grantner 2003) verwiesen.

Bei der Absorption von elektromagnetischer Strahlung kann ein gebundenes Elektron aus einer der Schalen ins Kontinuum angehoben werden. Entsprechend des Aufbaus der Atomhülle beobachtet man für jede dieser Schalen eine Absorptionskante. EXAFS wird in der Regel an der energetisch höchsten Kante, der K-Kante betrieben. Die Absorption an der Cu-Kante ist in Abb. 20 dargestellt.

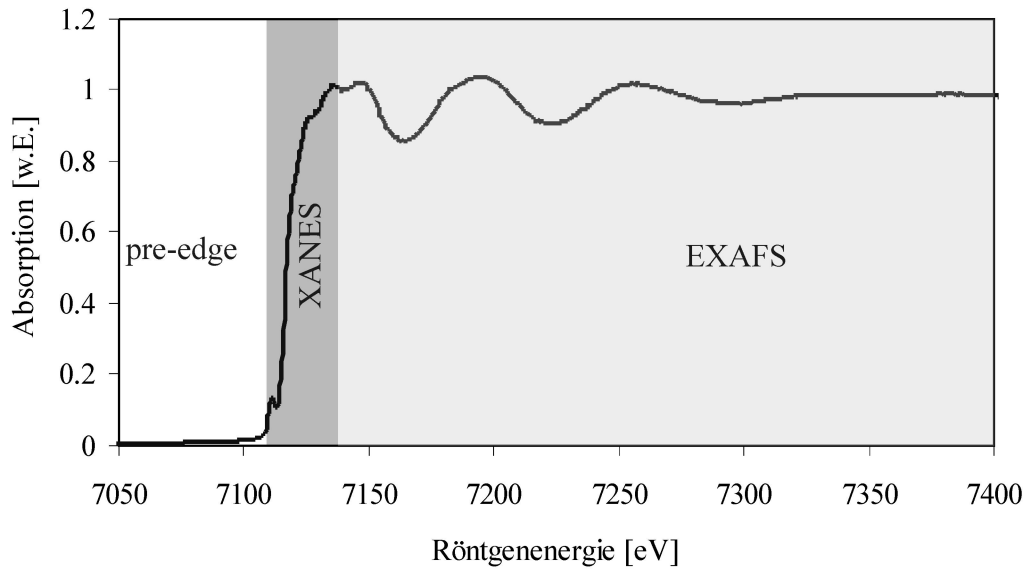


Abb. 20: Struktur von Röntgenabsorptionsspektren im Bereich der K-Kante, in Fluoreszenz gemessen. Quelle: Grantner (2003)

Man unterscheidet den Vorkantenbereich („pre-edge“), die Region des sprunghaften Anstiegs (XANES) und den Bereich oberhalb der Kante, in dem das Spektrum oszillatorisches Verhalten zeigt (EXAFS).

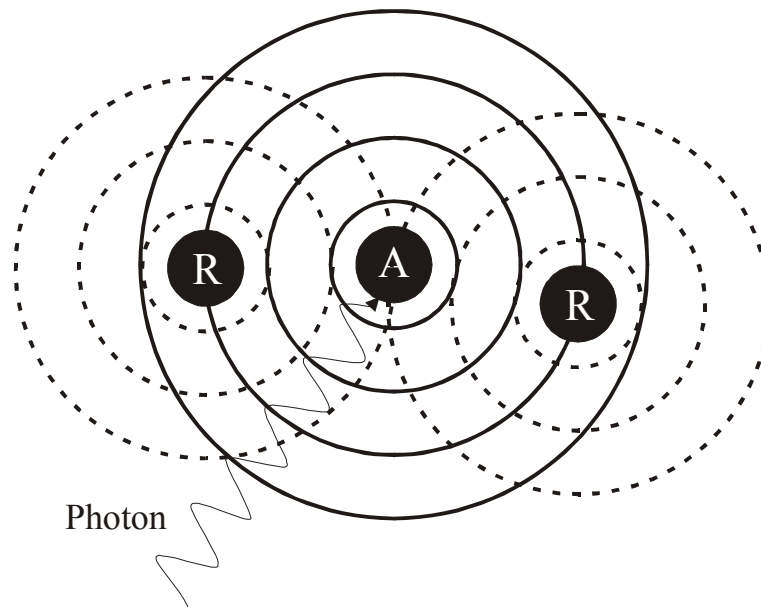


Abb. 21: Schematische Darstellung der Interferenz zwischen ein- und auslaufender Wellenfunktion. Quelle: Grantner (2003)

Die EXAFS-Oszillationen sind ein Interferenzphänomen, das in Abb. 21 schematisch dargestellt ist. Das vom Absorber emittierte Photoelektron kann als Kugelwelle beschrieben

werden. Befinden sich in der Umgebung des Absorbers weitere Atome, so kann die Photoelektronenwelle an diesen gestreut werden und zum Absorber zurücklaufen. Die Interferenz der Primärwelle mit den rückgestreuten Wellen resultiert in einer Modulation der Intensität der detektierten Photoelektronen.

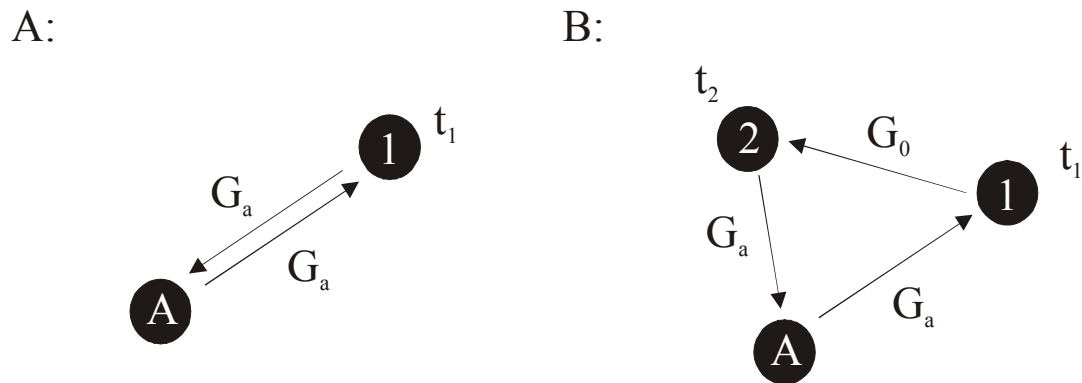


Abb. 22: Schematische Darstellung der Mehrfachstreuung. A: Absorberatom, 1, 2: Streuatome. A: Einfachstreuung; B: Zweifachstreuung. . Quelle: Grantner (2003)

Neben der oben beschriebenen Einfachstreuung (Abb. 22 A) kann es auch zur Mehrfachstreuung kommen, wenn die primäre Photoelektronenwelle erst an Atom 1 dann an Atom 2 gestreut wird und dann erst mit der Primärwelle interferiert (siehe Abb. 22 B). Es lässt sich zeigen, dass dieser sogenannte Mehrfachstreubeitrag für bestimmte Atomgeometrien sehr stark sein kann, zum Beispiel bei kollinearer Anordnung (Abb. 23).

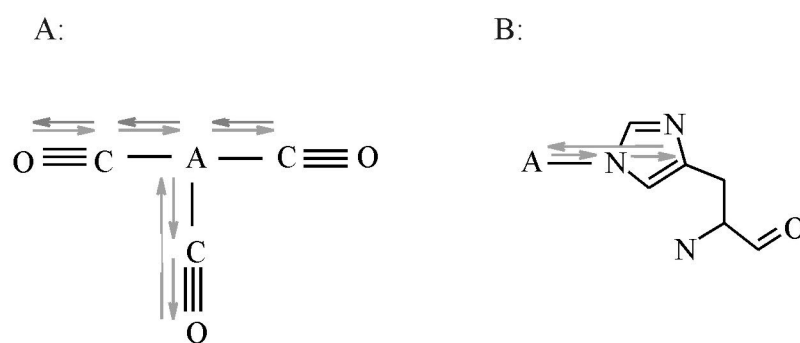


Abb. 23: Vielfachstreubeiträge $\chi(s)$ bei nahezu kollinearer Anordnung. In grau sind einige wichtige Streupfade für A-C-O (A) und Histidin (B) eingezeichnet. Quelle: Grantner (2003)

Bei einer ersten EXAFS-Datenauswertung werden oft lediglich Einfachstreubeiträge berücksichtigt. Der Unterschied zu Spektren, die Mehrfachstreubeiträge mitberücksichtigen, kann aber ganz erheblich sein. Ein Vergleich ist in Abb. 24 dargestellt.

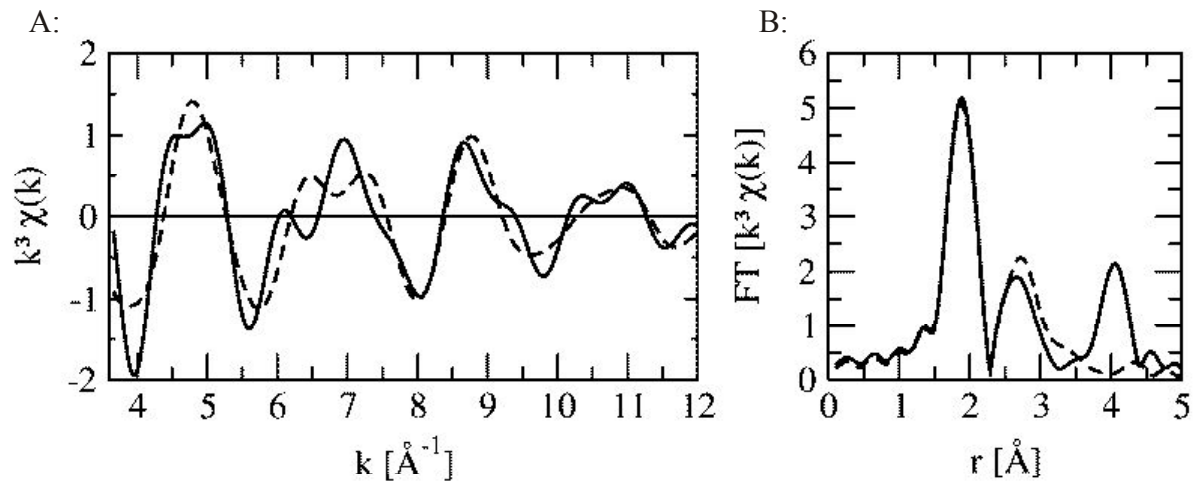


Abb. 24 Aus vorgegebener Geometrie berechnetes theoretisches EXAFS-Spektrum (A) und seine Fourier-Transformierte (B) , wobei zwischen $\text{Cu-N}_\delta\text{-N}_\epsilon$ ein Winkel von 180 Grad besteht und der Abstand Cu-N_δ bei 1.91 \AA liegt. Die durchgezogene Linie zeigt eine Rechnung mit Mehrfachstreuung, die gestrichelte Linie eine Rechnung ohne MehrfachstreuungQuelle: Grantner (2003)

3 Experimenteller Aufbau

3.1 Auf EPR basierende Methoden

Als Meßapparatur wurde ein Bruker elexsys 580 Spektrometer, welches zum Teil auch für gepulste Spektroskopie ausgelegt ist, verwendet. Die Komponenten des Spektrometers sind in Tab. 5 dargestellt.

Bruker ESP 380-1010	Mikrowellenbrücke bis maximal 200 mW, X-Band
Bruker Elexsys	Elektronik
Bruker ER083CS	Trafo für den Betrieb des Magneten
ENI A-500RF Power Amplifier	0.3-35 MHz Radiofrequenzverstärker
Bruker 4102 ST 9717	Standardresonator
Bruker EN 801	ENDOR-Resonator
Bruker ER 4118 SPT-NI	Resonator für gepulste EPR (Spin-Echo, ESEEM)
Oxford CF 935	Kryostat für Bruker ER 4118 SPT-NI
Oxford ESR 910	Kryostat für Bruker 4102 ST 9717 und Bruker EN 801
Silicon Graphics O ₂	Workstation

Tab. 5: Komponenten, die für die EPR-basierten Messungen verwendet wurden.

Für alle CW-EPR Messungen wurde der Standardresonator ST/9717 mit der Mode TE₁₀₂ verwendet. Für die Tieftemperaturexperimente kam ein Kryostat von Oxford Instruments des Typs Oxford ESR 910 zum Einsatz. Alle EPR-Messungen wurden, sofern nicht anders angegeben, bei T=77K aufgenommen.

Auch ENDOR Experimente fanden bei 9.5 GHz (X-Band) statt. Die Radiofrequenz wurde durch eine zusätzliche Spule im Resonator generiert, die Richtung des Radiofrequenzfeldes war normal zum Mikrowellenfeld. Alle ENDOR-Messungen wurden bei T=17K aufgenommen.

Um ENDOR-Messungen viele Stunden ohne manuelle Kontrolle laufen zu lassen, ist eine Programmsteuerung des Spektrometers notwendig. Das verwendete Programm unterstützt automatische Messungen über bestimmte Temperatur-, Leistungs- und Magnetfeldbereiche, es ist in Anhang B angegeben.

Da das Spektrometer keinen TWT-Verstärker besitzt, sind gepulste Messungen ausschließlich im schmalbandigen Bereich möglich, da Aufgrund zu geringer Pulsleistung mit größeren Pulslängen gearbeitet werden muß. ESEEM-Spektren wurden mit dem Resonator Bruker ER 4118 SPT-NI in einem Oxford CF 935-Kryostaten ausgeführt (Tab. 5), die Temperatur betrug dabei $T=5\text{K}$.

3.2 EXAFS

Sämtliche XAS-Messungen sind am Messplatz D2 des European Molecular Biology Laboratory (EMBL) am Deutschen Elektronen Synchrotron (DESY) in Hamburg durchgeführt worden. Die Messungen selbst sind von Klaus Grantner (Grantner 2003) ausgeführt worden.

Abb. 25 zeigt eine schematische Darstellung des apparativen Aufbaus. Der einlaufende Strahl aus dem Synchrotron wird monochromatisiert (Monochromator) und fokussiert bzw. kollimiert (Spiegel und Blenden), bevor er auf die Probe fällt. Vor der Probe wird die einfallende Intensität gemessen (Ionisationskammer I_0). Gemessen wird die Absorption (Ionisationskammer I_1) und die Fluoreszenz (Detektor). Photomultiplier, Szintillator und ein Si[220]-Kristall dienen zur Energiekalibrierung.

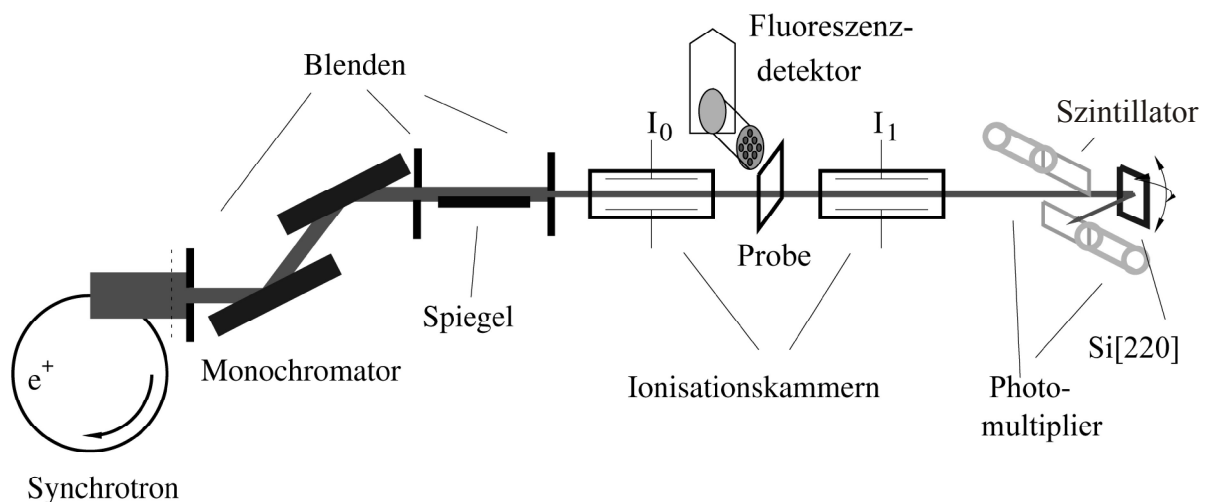


Abb. 25: Schema des Messplatzes an der EMBL EXAFS beam line D2.

Als Synchrotronstrahlungsquelle diente der Positronen-Speicherring DORIS III (Double Ring Store) des HASYLAB (Hamburger Synchrotronstrahlungslabor) am DESY. Die

Beschleunigung der Teilchen an der EMBL EXAFS beam line D2 und damit die Erzeugung der Synchrotronstrahlung erfolgt am Strahlenfächer D des HASYLAB. Aufgrund der hohen Intensität der Synchrotronstrahlung sind besonders hohe Strahlungsschäden zu erwarten. Für die Messung an der Kupfer-Kante wurde ein Si(111)-Doppelkristall-Monochromator verwendet, außerdem kommt ein Kryostat von Oxford Instruments mit geschlossenem Helium-Kreislauf zum Einsatz.

Beim Fluoreszenzdetektor handelt es sich um einen Germaniumdetektor der Firma Canberra. Dieser besteht aus 13 unabhängigen Elementen und deckt einen Raumwinkel von 20% ab. Die Ionisationskammern besitzen ein Gasgemisch aus 70 % Argon und 30 % Kohlendioxid und arbeiten bei einem Gasdruck, bei welchem in etwa ein Drittel der Strahlenintensität absorbiert wird.

4 Probenpräparation

4.1 Prion-Protein Mono- und Tetra-Octarepeat Peptide

Die Peptidproben wurden am Max-Planck-Institut für Biochemie, Bioorganische Chemie, in Martinsried synthetisiert. Sie wurden mit Hilfe der Festphasensynthese auf Harzen und Abspaltung der Schutzgruppen hergestellt (Renner et al. 2004). Die Proben sind N-Terminal acetyliert und C-Terminal amidiert, um geladene Endgruppen zu vermeiden. Damit wird auch eine bessere Imitation der Sequenz im intakten Protein erreicht.

Für die Präparation der Probe 102.1 (Octarepeat in H₂O und NEM) wurden 0.23 mg des Octapeptids (Ac-PHGGGWGQ-NH₂; Proteinsequenz 60-67, MW 835.4 g/mol) in 200 µl Wasser KCl-Lösung aufgelöst (c_{KCl} 100 mM). 0.034 mg ⁶³CuCl₂·2H₂O (MW 170.48 g/mol) wurden zur Peptidlösung zugegeben. Der pH-Wert der resultierenden Lösung wurde mit NaOH (0.1 M) auf 7.15 eingestellt. Die endgültige Konzentration des Komplexes ist 1.0 mM (1:1 Komplex, V_{tot} 200 µl, pH 7.15). Alle in Tab. 6 gelisteten Octapeptidproben wurden auf diese Weise präpariert.

Auch die Tetraoctapeptidproben (Ac-[PHGGGWGQ]₄-NH₂; Proteinsequenz 60-91, MW 1613.6 g/mol) wurden auf diese Weise präpariert.

4.2 Das rekombinante menschliche Prion-Protein

Die menschlichen Prion-Protein Proben wurden am Institut für Neuropathologie der Ludwig-Maximilians-Universität in München hergestellt.

BL21DE3 RIL *E. coli*-Zellen transformiert mit dem Plasmid pET17b-HsPrP23-231WT Klon81 wurden in 4 x 500 ml Rich Medium (20 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 50 mM K₂HPO₄, 10 mM MgCl₂, 1 % Glucose, 100 µg/ml Ampicillin, 34 µg/ml Chloramphenicol) bei 37°C im Schüttelinkubator bis zu einer Zelldichte entsprechend einer optischen Dichte bei 600 nm von 0.5 kultiviert.

Die Prion-Protein Expression wurde induziert durch Zugabe von 1 mM IPTG (Isopropylthiogalactopyranosid). Die Kultur wurde 2 h bei 37°C fortgesetzt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 5000 rpm für 5 min pelletiert. Die Bakterienpellets von 300 ml Kultur wurden in je 6 ml 50mM Tris pH 8, 1mM MgCl₂ resuspendiert und bei -20°C eingefroren.

Aufgetaute Bakterienpellets wurden mit 1,4 mg/ml Lysozym, 0,5 % Triton X-100, 60 U/ml Benzonase und 0,3 mg/ml RNase I für 30 min bei 37°C lysiert. In "inclusion bodies" abgelagertes rekombinantes Prion-Protein (PrP) wurde durch Zentrifugation bei 17000 rpm für 15 min pelletiert. Das Pellet wurde sukzessive dreimal mit je $\frac{3}{4}$ des Lysatvolumens an Puffer 20mM Tris-HCl pH 8.0, 23%(w/v) sucrose, 0.5% (v/v) Triton X-100, 1mM EDTA (Ethylendiamintetraacetyl), 1mM Benzamidin durch Resuspendieren gewaschen und das rekombinante PrP jeweils durch Zentrifugation erneut pelletiert. Das letzte Pellet wird in $\frac{1}{4}$ Lysatvolumen 8 M Harnstoff, 10 mM MOPS (Morpholinopropansulfonsäure) pH 7.0, 1 mM EDTA, 50 mM DDT (Dichlordiphenyltrichlorethan) solubilisiert und durch Zentrifugation bei 35000 rpm für 30 min von unlöslichem Material abgetrennt.

Das Harnstoff solubilisierte, denaturierte PrP wurde auf zwei in Reihe geschaltete und mit Puffer A (8M Harnstoff, 10 mM MOPS pH 7.0) equilibrierte Ionenaustauschersäulen bei einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen. Das auf der Säule gebundene PrP wurde dann durch einen 60 ml linearen Salzgradienten mit 30 - 80 % Puffer B (= Puffer A + 500 mM NaCl) bei 1 ml/min eluiert und in 2 ml Fraktionen aufgefangen.

Die PrP enthaltenden Fraktionen des Eluates wurden durch Ultrafiltration auf ein Volumen von 2,5 ml eingengt und durch Gelfiltration umgepuffert in 8 M Harnstoff, 50 mM Tris, pH 8.5 und mit diesem Puffer auf eine Proteinkonzentration von 0.1 mg/ml verdünnt. Zugabe von 2 μ M CuSO₄ wurde zur katalytischen Oxidation der Disulfidbrücke im PrP benutzt und die Reaktion 3 h bei Raumtemperatur ablaufen gelassen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mM EDTA und pH-Einstellung auf 5 - 6 mit 2 M HCl gestoppt.

Die PrP-Lösung wurde erneut durch Ultrafiltration auf ein Volumen von 2,5 ml eingengt und durch Gelfiltration umgepuffert in 8 M Harnstoff, 10 mM MOPS, pH 7.0, 500 mM NaCl. 0.5 ml einer Nickel-Chelat Sepharose Matrix wurden 3 h bei Raumtemperatur mit der PrP-Lösung durch über Kopf Drehen in einem geschlossenen 15 ml Gefäß gemischt, danach in eine kleine BioRad-Säule gefüllt und der Durchlauf auflaufen gelassen. Die Säulen-Matrix wurde mit 2 x 5 ml 8 M Harnstoff, 10 mM MOPS, pH 7.0, 500 mM NaCl gewaschen. Das PrP wurde von der Säule durch 6 x 5 ml 7,2 M Harnstoff, 10 mM MOPS, pH 7.0, 50 mM Imidazol, 150 mM NaCl eluiert. Die Eluate wurden durch Ultrafiltration auf weniger als 3 ml eingengt.

Je 500 μl des konzentrierten Nickel-Säulen Eluats wurden unter ständigem Rühren tropfenweise langsam in 50 ml 10 mM MES (Morpholinoethansulfonsäure) pH 6.0 verdünnt. Die Lösung wurde 4 - 12 h bei 4°C weiter gerührt und durch Zentrifugation bei 17000 rpm für 30 min von ausgefallenem Protein abgetrennt. Der Überstand wurde dann durch Ultrafiltration auf weniger als 3 ml eingeeengt und durch erneute Zentrifugation bei 16000 g für 30 min und 4°C von ausgefallenem Protein abgetrennt. Der Überstand wurde zweimal für 2 h und schließlich einmal über Nacht gegen den gewünschten Puffer (siehe Tab. 8) dialysiert. Das Dialysat wurde in CD-spektroskopischen Messungen auf korrekte Faltung des PrP und in eindimensionalen NMR-Messungen auf Abwesenheit von niedermolekularen Kontaminationen überprüft.

Zu 3 ml der dialysierten PrP Lösung wurde soviel festes $^{63}\text{CuCl}_2$ gegeben, dass das Verhältnis von Cu zu PrP annähernd 5:1 betrug. Die Lösung wurde 1 h auf Eis inkubiert und bei 16000 g 30 min zentrifugiert, um ausgefallenes Kupfer zu entfernen.

Oberhalb einer Proteinkonzentration von 60 μM beginnen die Prion-Proteine Aggregate zu bilden. EXAFS benötigt aber Kupfer-Konzentrationen im millimolaren Bereich (Grantner 2003). Daher wurde das kupferbeladene PrP durch Zugabe von Ammoniumsulfat bzw. PEG (Polyethylenglycol) ausgefällt. Die Präzipitation wurde über Nacht auf Eis fortgesetzt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation bei 16000 g für 30 min pelletiert und mit viermal 30 μl destilliertem Wasser resuspendiert. Daraus ergab sich ein Gesamtvolumen von 150 μl PrP Suspension.

Mit Hilfe der ICP-MS (inductively coupled plasma mass spectroscopy) wurde die Kupferkonzentration der Lösung vor und nach der Präzipitation gemessen. Damit konnte die mittlere Kupferkonzentration pro Prion-Protein bestimmt werden.

Um die Ergebnisse aus XAS besser mit EPR, ENDOR und ESEEM vergleichen zu können, wurden die Proben immer aus demselben Reinigungszyklus für die jeweiligen Messungen präpariert.

Für die XAS-Experimente wurden 1mm dicke PVC-Plättchen mit herausgefrästen Fenstern verwendet, auf die mit Zweikomponentenkleber (Uhu plus schnellfest) auf einer Seite eine Mylar-Folie aufgeklebt wurde. Darauf wurden knappe 150 μl der PrP-Suspension mit einer Pipette aufgebracht. Die andere Seite wurde dann mit selbstklebender Mylar-Folie luftdicht

abgeschlossen. Mit der selbstklebenden Mylar-Folie nach oben wurde der Probenhalter auf der Probenstange des Kryostaten montiert. Die Probenstange mit dem Probenhalter wurde dann für einige Stunden fixiert, damit sich das Präzipitat im Probenhalter auf die nach unten zeigende Seite absetzen kann. Danach wurde der Probenhalter waagrecht in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Probenstange wurde dann so eingebaut, dass der Röntgenstrahl als erstes auf das Präzipitat trifft. Damit wurde erreicht, dass die von der Probe reemittierte Fluoreszenz-Strahlung nicht das Probenvolumen auf dem Weg zum Detektor durchlaufen muss. Damit wird das Signal- Rauschverhältnis stark verbessert.

5 Prion-Protein Octarepeat-Fragmente

5.1 EPR-Spektroskopie

Neben biochemischen Verfahren, mit denen die Integrität des Peptids untersucht worden ist, wurde zur qualitativen Bestimmung der Homogenität des Cu-Komplexes EPR-Spektroskopie eingesetzt.

5.1.1 Der Einfluß des Lösungsmittels auf den Octarepeat-Komplex

Um beim Versuch optimale chemische Randbedingungen für eine Strukturaufklärung des Prion-Protein-Octarepeats zu erhalten wurden zahlreiche verschiedene Puffersysteme getestet. Alle getesteten Proben, ebenso wie die Gründe, die für einen Test gesprochen haben, sind in Tab. 6 zusammengefaßt.

Abb. 26 zeigt eine Auswahl von EPR-Spektren des Octapeptids bei verschiedenen typischen Puffer- und Salzkonzentrationen. Die dargestellten EPR-Spektren zeigen eine vierfache Linienaufspaltung aufgrund der Interaktion des Elektronenspins des Cu-Atoms ($S=1/2$) mit dessen Kernspin ($I=3/2$). Proben mit guter Homogenität und solche, die keine Cu-Cu-Doppelkomplexe bilden, zeigen schmale Linienbreiten und gutes Signal-Rauschverhältnis (102.1 Octarepeat/Cu in H_2O und NEM, 117.2 Octarepeat/Cu in D_2O und NEM, 111.1/115.1 Octarepeat/Cu in DPC-Micellen und 105.1 Octarepeat/Cu in SDS-Micellen in Abb. 26).

Das in der Literatur am besten untersuchte System ist eine wässrige Lösung aus KCl und N-ethyl-Morpholin (NEM). Für die Probe 102.1 (Octarepeat/Cu in H_2O und NEM) wurde zunächst eine solche Umgebung ausgewählt, um komplementäre Daten aus der Literatur nutzen zu können.

Die Probe 105.1 (Octarepeat/Cu in H_2O) zeigt im Vergleich relativ breite Linien. Die Qualität des Komplexes ist also relativ schlecht. Außerdem unterscheidet sich die Probe im Bereich um 355.0mT deutlich von den anderen in Abb. 26 dargestellten Spektren, sie zeigt dort eine schwache Resonanz. Es handelt sich in diesem Fall also um einen von 102.1, 117.2 und 111.1/115.1 verschiedenen Komplex. Dieser besitzt, wie Anhang C und Abb. 26 belegen, deutliche Unterschiede bezüglich der EPR-Parameter im Vergleich zu den Proben 102.1, 117.2 und 115.1. Da dies auf eine andere Ligandierung schließen lässt (Peisach und Blumberg 1974) wird die Probe nicht weiter betrachtet.

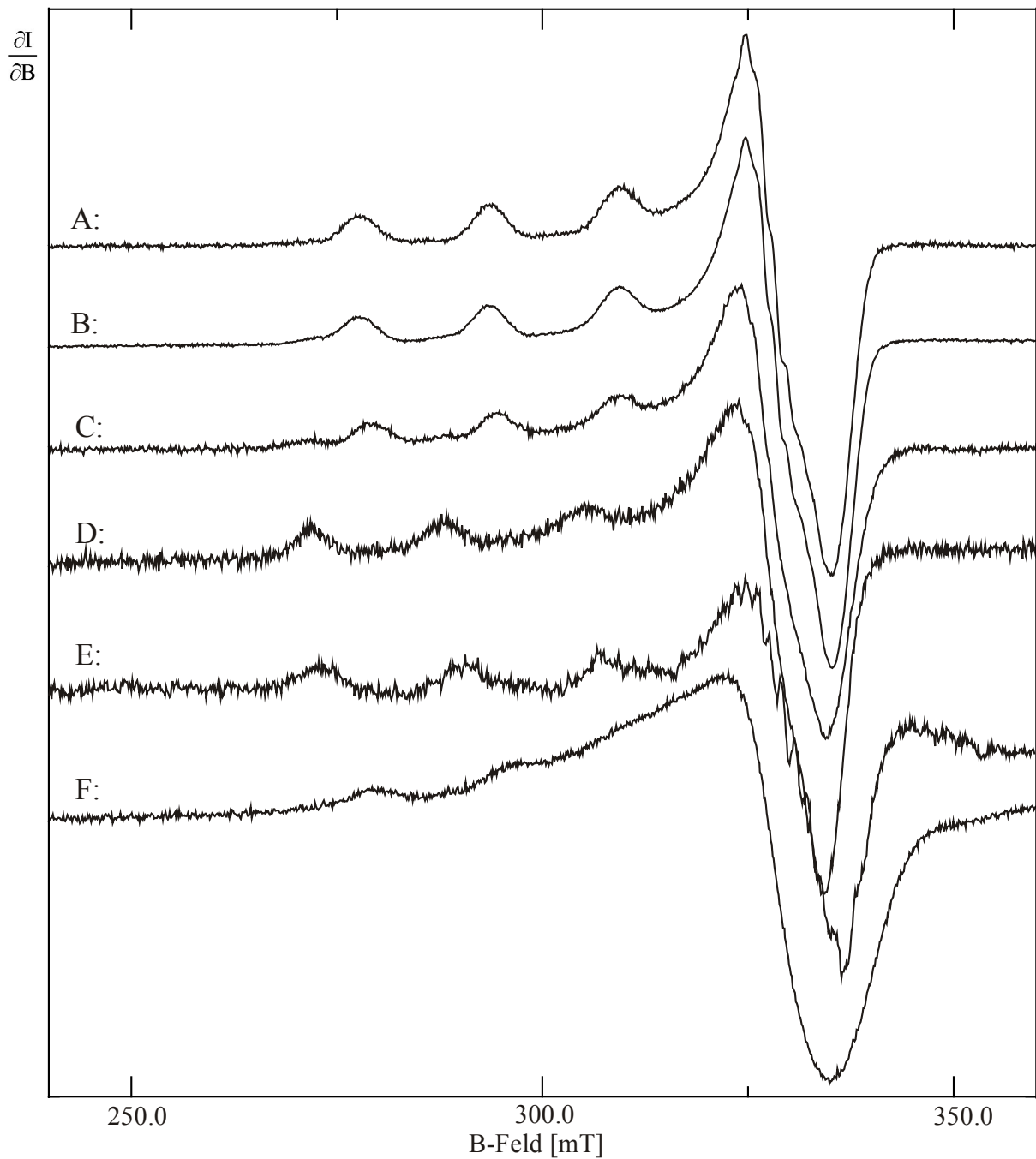


Abb. 26: EPR-Spektren des Prion-Protein-Octapeptids bei verschiedenen Puffer- und Salzkonzentrationen. A: 102.1 (Octarepeat in H₂O und NEM); B: 117.2 (Octarepeat in D₂O und NEM); C: 111.1/115.1 (Octarepeat in H₂O und DPC Micellen; D: 105.1 (Octarepeat in H₂O und SDS Micellen; E: 108.1 (Octarepeat in H₂O und Phosphatpuffer); F: 104.1 (Octarepeat in H₂O)

erhalten	Nr.	Probenzusammensetzung [mM]				sonstiges	EPR	ENDOR	ESEEM	EXAFS	Kommentar
		OCTA	⁶³ CuCl ₂	Umgebung	KCl						
11.09.01	102.1	1.17	1.17	25mM NEM	100	20%	pH 7.15	✓	✓	✓	1 Spezies, gute Intensität, schmale Linienbreite, Probe nach Aronoff-Spencer et al. (2000)
22.11.01	103.1	1.17	1.17	0	0	0	pH 7.15	s	s	n	Intensität zu schwach → Präparation von 104.1
23.11.01	104.1	2.34	2.34	0	0	0	pH 7.15	✓	✓	✓	Einfluß von Glycerin und NEM? → Ja! (2 Spezies)
04.2.02	105.1	1.17	1.17	200mM SDS			100mM SDS, pH 7.15	✓	✓	✓	1 Spezies, aber nicht dieselbe wie 102.1
16.04.02	106.1	1.17	1.17	0	100	20%	pH 7.15	✓	✓	✓	Einfluß von NEM allein? → Ja! (2 Spezies)
16.04.02	107.1	5.1	5.1	25mM NEM	150	0%		✓	✓	✓	Einfluß von Glycerol allein? → JA! (2 Spezies)
	107.2						+20µl Buffer	✓			} Formation des artifiziiellen Komplexes Konzentrationsabhängig? → Nein!
	107.3						+20µl Buffer	✓			
	107.4						+20µl Buffer	✓			
	107.5						+20µl Buffer	✓			

16.04.02	108.1	1.0	1.0	20mM H ₂ PO ₄ ⁻ /HPO ₄ ²⁻	100	0%	pH 7.15	✓	Funktioniert Phosphatpuffer H ₂ PO ₄ ⁻ /HPO ₄ ²⁻ → Nein!
16.04.02	109.1	1.0	1.0	20mM H ₂ PO ₄ ⁻ /HPO ₄ ²⁻	100	0%	pH 3.88	✓	Funktioniert Phosphatpuffer H ₂ PO ₄ ⁻ /HPO ₄ ²⁻ → Nein!
19.06.02	110.1	1.0	1.0	100mM DPC- Micellen	100	0%	pH 7.15	✓	Kontrolle für 111.1 (DPC-Micellen)
19.06.02	111.1	1.0	1.0	100mM DPC- Micellen	100	0%	pH 7.03	✓	Wechsel auf physiologisches System, 1 Spezies wie 102.1
12.08.02	115.1	1.0	1.0	100mM DPC- Micellen	100	0%	pH 7.03	✓	Höhere Konzentration für ENDOR, 111.1 ist bestrahlt (EXAFS) 1 Spezies
03.02.03	116.1	1.0	1.0	25mM NEM	100	0%	pH 7, D ₂ O	✓	2 Spezies,
05.02.03	117.1	1.0	1.0	25mM NEM	100	0%	pH 7, D ₂ O	✓	2 Spezies,
06.02.03	117.2	1.0	1.0	25mM NEM	100	20%	pH 7, D ₂ O	✓	Dasselbe Spektrum wie 102.1, 1 Spezies

Tab. 6: Übersicht über alle Octapeptidproben, deren chemische Umgebung, die Messungen, die an ihnen ausgeführt worden sind, und der Grund ihrer Präparation bzw. Messung. Die Symbole bedeuten: ✓ : mit guter Statistik gemessen; s: messbar, aber schlechte Statistik, n: Messung nicht möglich, beispielsweise bei zu schnellen Relaxationszeiten bei ENDOR-Spektroskopie.

Auch Komplexe im häufig für biologische Systeme verwendete Phosphatpuffer sind nicht gut definiert (Probe 108.1 (Octarepeat/Cu in Phosphatpuffer) in Abb. 26). Die Intensität der Probe ist für eine 1mM Konzentration bemerkenswert schlecht. Das ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass nicht alles Kupfer komplexiert wird, sondern dass sich teilweise $\text{Cu}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ bildet, welches kein EPR-Signal zeigt. Außerdem zeigt die Probe eine schwach sichtbare Resonanz bei 355.0mT. Auch diese Probe wird nicht weiter untersucht.

Das Prion-Protein Octarepeat in NEM: Abb. 27 zeigt das EPR Spektrum der Probe 102.1 (Octarepeat/Cu in H_2O und NEM). Im Vergleich zu ähnlichen EPR-Spektren von Cu-Komplexen fallen besonders die kleine Linienbreite und das gute Signal/Rausch-Verhältnis auf.

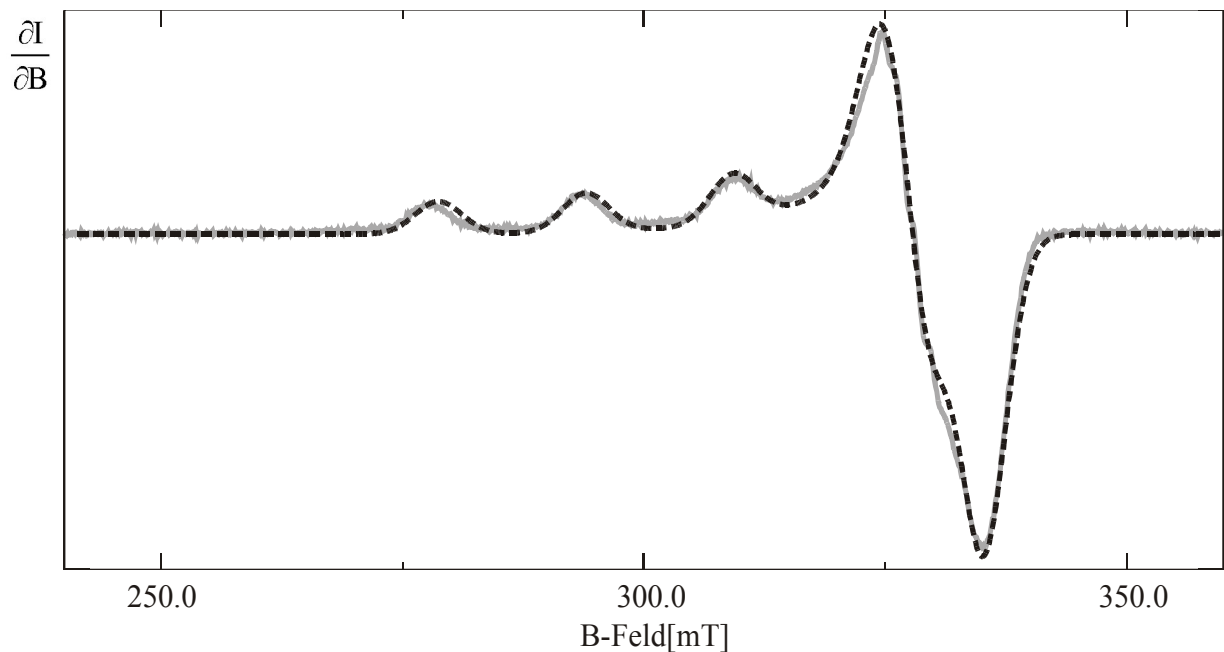


Abb. 27: EPR-Spektrum (durchgezogen, grau) und Anpassung nach der Methode der kleinsten quadratischen Abweichung (gestrichelt, schwarz) der Probe 102.1 (Octarepeat/Cu in H_2O und NEM): $g_x=2.057$, $g_y=2.073$, $g_z=2.248$, $A_x=7.8\text{G}$, $A_y=7.8\text{G}$, $A_z=165\text{G}$, Linienbreite = 49.1G, Lorentz/Gauss = 0.26

Von allen in Tab. 6 gelisteten Proben ist 102.1 diejenige mit der höchsten Intensität. Dies lässt darauf schließen, dass alles Cu komplexiert worden ist, da überschüssiges Kupfer $\text{Cu}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ bilden würde, welches kein EPR-Signal zeigt.

Das Spektrum lässt sich sehr gut mit einer Anpassung nach der Methode der kleinsten quadratischen Abweichung wiedergeben. Die Anpassung und deren Parameter sind ebenfalls

in Abb. 27 gezeigt. Eine solche Standardanpassung wurde für alle gemessenen EPR-Spektren durchgeführt. Für die Anpassung wurde das Programm Xepmr benutzt (<http://epr.chem.jyu.fi/xemr>). Die Linienform spricht für eine quadratisch planare Koordinierung des Cu-Atoms. Laut den etablierten Peisach-Blumberg-Korrelationen (Abb. 28) (Peisach und Blumberg 1974) sprechen die gemessenen g - und A - Tensor-Werte am ehesten für eine Ligandierung mit 3N und 1O. Wie in Abb. 28 gezeigt, kann diese Zuordnung aber nicht eindeutig sein. Für die zweifelsfreie Zuordnung der Liganden müssen weitere Informationen hinzugezogen werden.

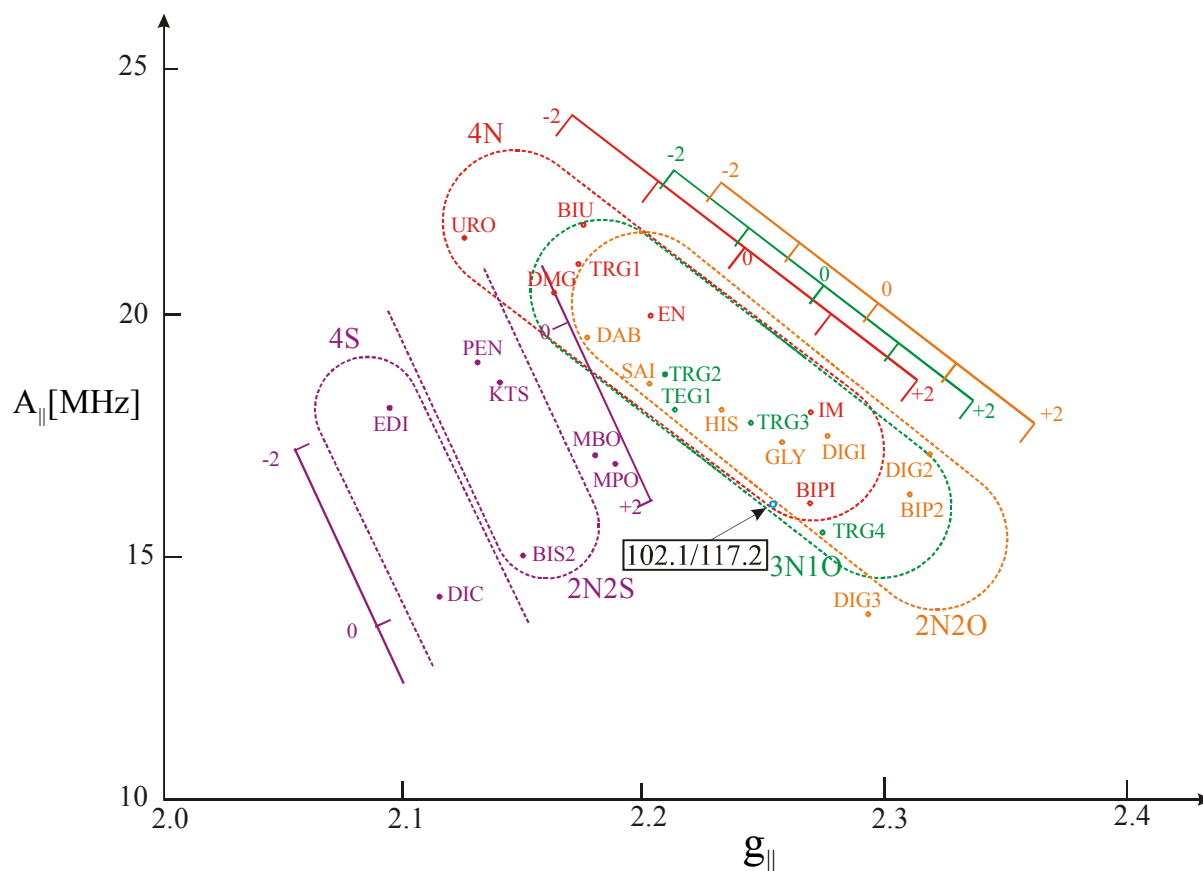


Abb. 28: Korrelation der Werte für die g - und A - Tensoren mit der Art der Ligandierung für Cu-Komplexe. Grundlage der Zuordnung bilden die EPR-Spektren der eingezeichneten Komplexe mit bekannter Geometrie. Eine Tabelle der Abkürzungen befindet sich in Anhang E. Abbildung modifiziert nach Peisach und Blumberg (1974).

Bei Probe 117.2 (Octarepeat/Cu in D_2O und NEM) wurde im Gegensatz zu 102.1 (Octarepeat/Cu in H_2O und NEM) D_2O als Basis für den Puffer verwendet. Das EPR-Spektrum von 117.2 ist identisch mit dem der Probe 102.1, es ist also sehr wahrscheinlich, dass in der deuterierten Probe derselbe Komplex vorliegt.

Die für die Probe 102.1 (Octarepeat/Cu in H₂O und NEM) gemessenen Spektren dienen als Basis für die Entwicklung der iterativen Strukturverfeinerung, vorgestellt in Kap.7.

Das Prion-Protein Octarepeat in DPC-Micellen: Proben mit Octarepeat-Cu-Komplexen in NEM weisen zwar gute Homogenität und Intensität auf, Puffer dieser Art stellen jedoch kein besonders naturnahes Milieu für Proteine dar. Aus diesem Grund wurden bestimmte Micellenarten als Umgebung für Octarepeat/Cu-Komplexe untersucht. Da sich das EPR Spektrum bei dem Einsatz von SDS-Micellen im Vergleich zu allen anderen Spektren deutlich verändert und daher eine andere Ligandierung zu erwarten ist, wurden ausschließlich DPC-Micellen weiter untersucht. Abb. 29 zeigt das Spektrum der Probe 111.1/115.1 (Octarepeat/Cu in DPC-Micellen) und eine Standardanpassung.

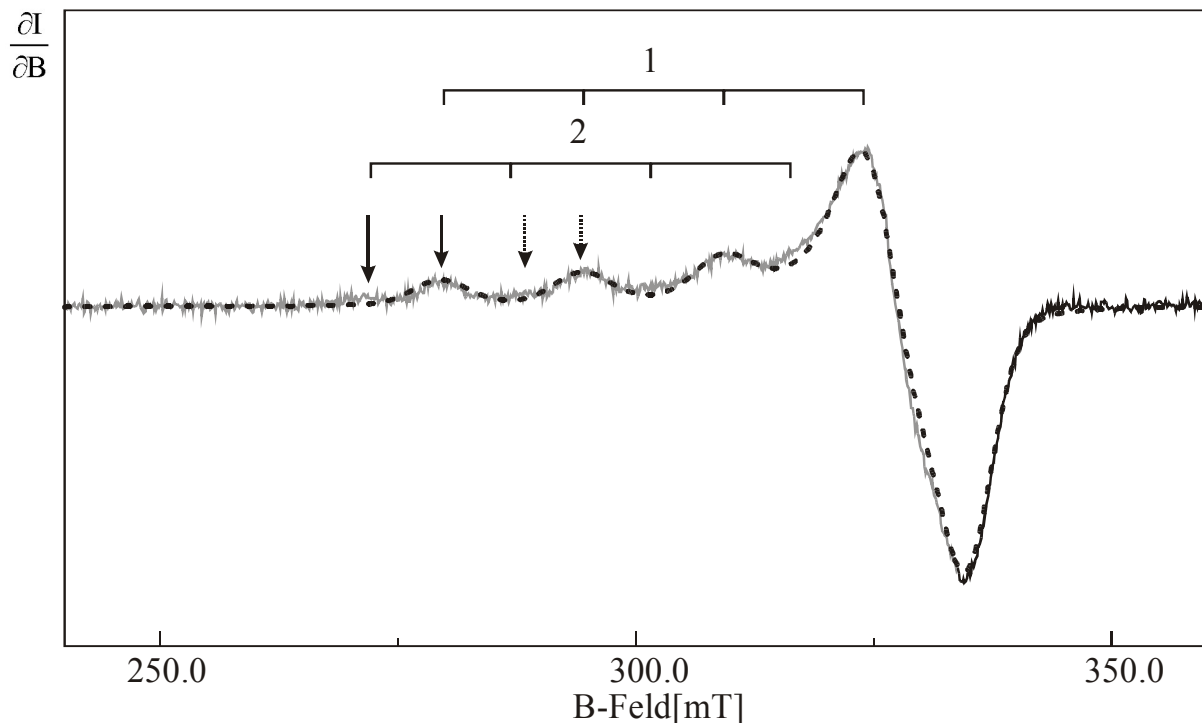


Abb. 29: EPR-Spektren (durchgezogen, grau) von Probe 111.1/115.1 (Octarepeat/Cu in DPC-Micellen) und Standardanpassung (gestrichelt, schwarz). 1 und 2 bezeichnen Resonanzen der beiden Spezies. Spezies1: $g_x = 2.0653$, $g_y = 2.0653$, $g_z = 2.2450$, $A_x = 32.6$ MHz, $A_y = 32.6$ MHz, $A_z = 467.7$ MHz, Linienbreite = 57.0G, Lorentz/Gauss = 0.3; Spezies 2 ist nur in Spuren vorhanden. Sie wurde nicht angepasst. Die durchgezogenen Pfeile markieren Resonanzen für $M_{I_{Cu}} = 3/2$ ($\Theta = 0$), die beiden gestrichelten Pfeile die Resonanzen für $M_{I_{Cu}} = 1/2$ ($\Theta = 0$).

Trotz der insgesamt hohen Qualität des Komplexes ist eine zweite Spezies erkennbar, deren Resonanzen zu kleinerem Feld hin verschoben sind. Besonders deutlich ist dies bei den Resonanzen $M_{Cu\ I}=1/2$ ($\Theta=0$) und $M_{Cu\ I}=3/2$ ($\theta=0$) zu erkennen (siehe Abb. 12 und Abb. 29). Ansatzweise zeigt auch die Probe 117.2 (Octarepeat in D₂O und NEM) diese Spezies. Die Resonanzpositionen der Hauptspezies sind praktisch gleich denen der Probe 102.1 (Octarepeat in H₂O und NEM) und 117.2. Eine Ligandierung durch dieselben Atomarten ist daher wahrscheinlich. Auch das Signal/Rausch-Verhältnis der Probe ist sehr gut. Dies lässt darauf schließen, dass alles Cu komplexiert wurde.

Die relativ schmalen Linien und die hohe Intensität der Proben 102.1, 117.2 (Octarepeat/Cu in H₂O bzw. D₂O und NEM) und 111.1/115.1 (Octarepeat/Cu in H₂O und DPC-Micellen) in Abb. 26 kennzeichnen einen homogenen, gut definierten Komplex. Die Proben sind für die weitere Analyse mittels ENDOR-, ESEEM- und EXAFS- Spektroskopie geeignet.

5.1.2 Der Tetraoctarepeat-Komplex

Das EPR-Spektrum der Probe 112.1 (Tetraoctarepeat/Cu in DPC-Micellen) ist dem der Probe 111.1/115.1 (Octarepeat/Cu in DPC-Micellen) sehr ähnlich. Es ist in Abb. 30 dargestellt. Auch die Parameter, welche sich aus einer Standardanpassung ergeben, sind mit denen der Probe 111.1/115.1 praktisch identisch. Wieder ist eine Koordination durch dieselben Atomtypen wie in Probe 102.1 (Octarepeat/Cu in H₂O und NEM) wahrscheinlich. Auch bei dieser Probe tritt eine zweite Spezies auf deren Intensität sehr schwach ist, die Positionen ihrer Resonanzen sind etwas zu niedrigerem Feld hin verschoben.

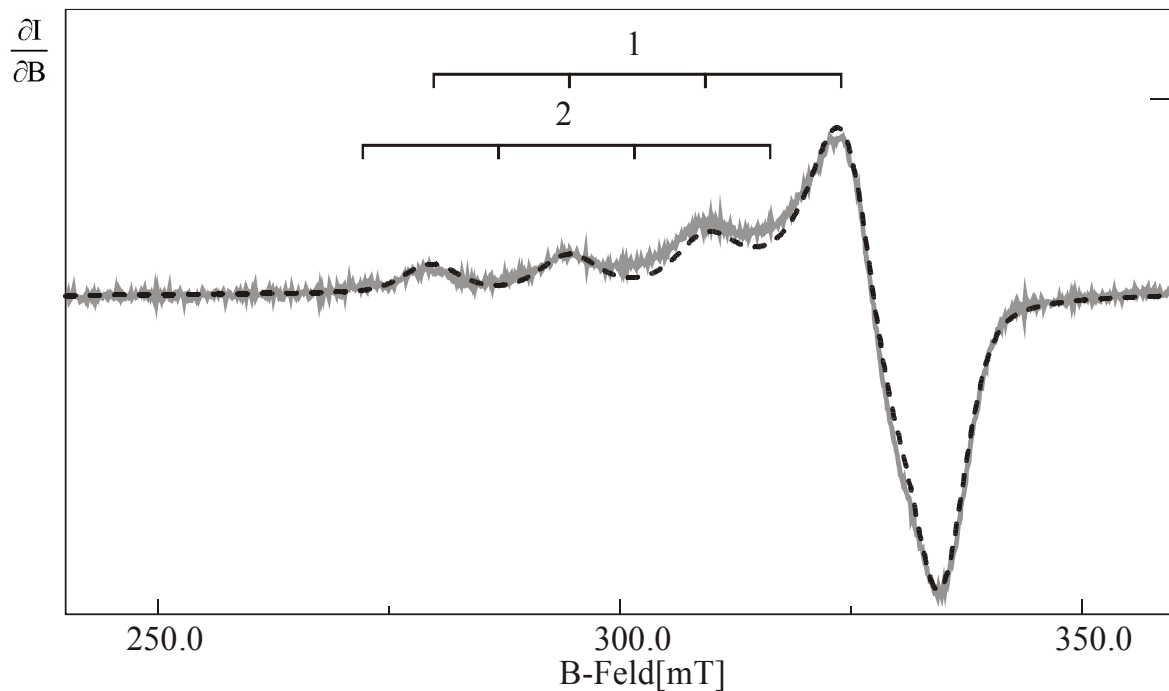


Abb. 30: EPR-Spektren (durchgezogen, grau) von Probe 112.1 (Tetraoctarepeat/Cu in DPC-Micellen) und Standardanpassung (gestrichelt, schwarz). 1 und 2 bezeichnen Resonanzen der beiden Spezies. Spezies1: $g_x = 2.0668$, $g_y = 2.0668$, $g_z = 2.2450$, $A_x = 32.7$ MHz, $A_y = 32.7$ MHz, $A_z = 467.7$ MHz, Linienbreite = 55.0G, Lorentz/Gauss = 0.5; Spezies 2 ist nur in Spuren vorhanden. Sie wurde nicht angepasst.

5.2 ENDOR- und ESEEM-Spektroskopie

Das Prion-Protein Octarepeat in NEM: Da die beiden Proben 102.1 und 117.2 (Octarepeat/Cu in H_2O bzw. D_2O und NEM) exakt dieselben g - und A -Tensoren aufweisen, sind für die Aufnahme der ENDOR-Spektren bei beiden Proben auch dieselben Arbeitspunkte (Kapitel 2.2.5) verwendet worden (Tab. 15 in Anhang C und Abb. 26). Diese sind für die Probe 102.1 (Octarepeat/Cu in H_2O und NEM) in Abb. 31 dargestellt.

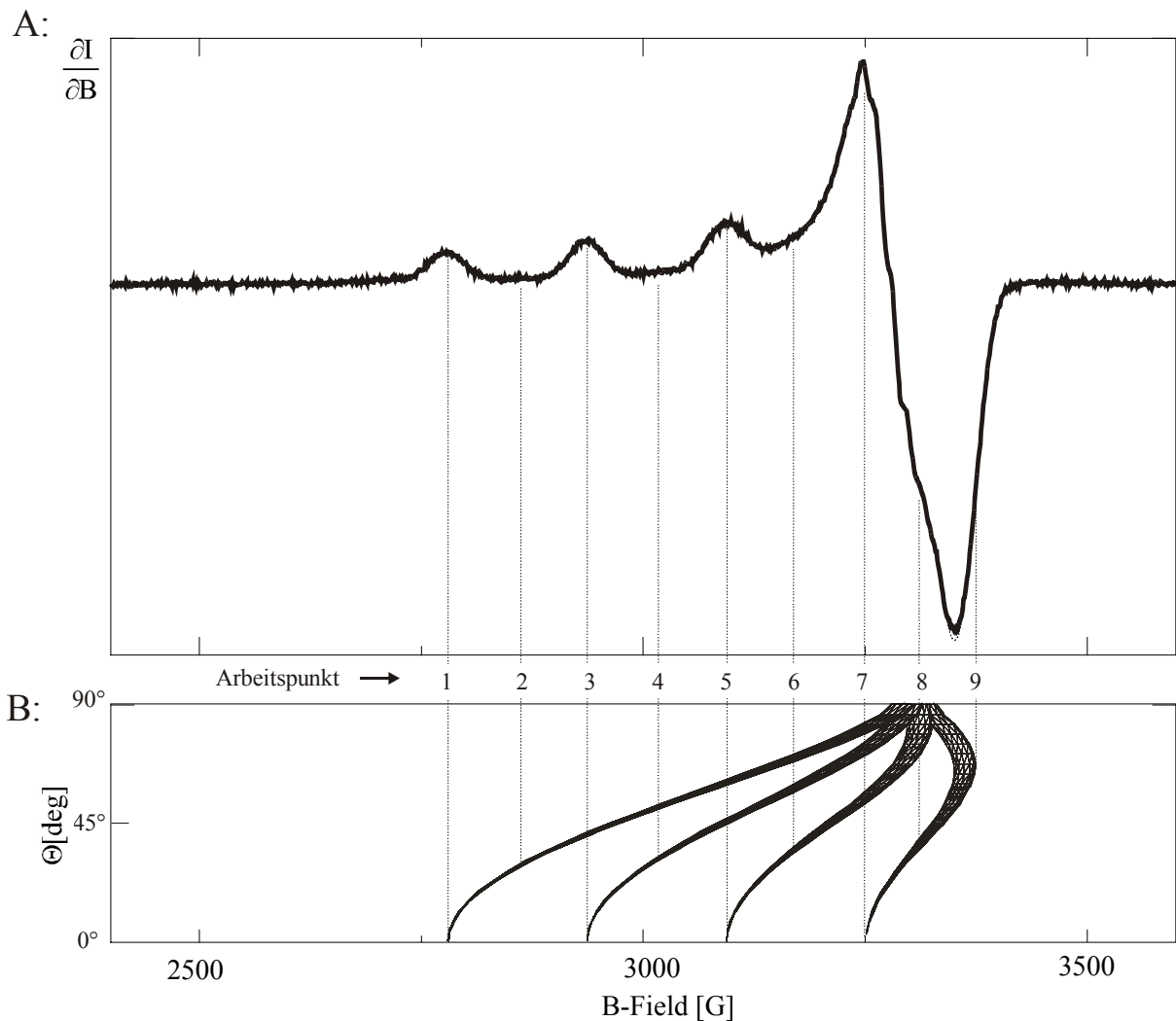


Abb. 31: Darstellung der ENDOR-Arbeitspunkte für die Winkelselektion nach Θ . A: EPR-Spektrum der Probe 102.1 bzw 117.2 (Octarepeat/Cu in H₂O bzw. D₂O und NEM); B: Darstellung der Resonanzpositionen und der Linienbreiten in Abhängigkeit des Winkels Θ . Die Arbeitspunkte sind nicht äquidistant gewählt. Sie liegen an jeweils besonders markanten Winkelpositionen (Arbeitspunkte 1, 3, 5, 7, 8 und 9) und schließen einige Zwischenwerte mit ein (Arbeitspunkte 2, 4 und 6)

Die erheblichen Intensitätsunterschiede zwischen den einzelnen ENDOR-Arbeitspunkten haben ein stark unterschiedliches Signal-Rausch-Verhältnis zur Folge. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass bei den meisten Arbeitspunkten nicht nur ein Winkel Θ angewählt wird, sondern mehrere gleichzeitig. Im Arbeitspunkt 7 sind es zum Beispiel vier. In Tab. 7 sind die zu den Arbeitspunkten gehörigen Magnetfelder und Winkel Θ gelistet.

Arbeitspunkt	Magnetfeld [mT]	Winkelauswahl nach Θ
1	279.0	0°
2	286.4	27°
3	293.8	0°, 40°
4	301.0	31°, 50°
5	308.2	0°, 45°, 59°
6	315.6	35°, 68°, 69°
7	323.0	0°, 54°, 72°, 80°
8	328.3	34°, 70°, 90°
9	334.0	66°

Tab. 7: Die Arbeitspunkte, deren Magnetfelder und die zugehörige Winkelauswahl nach θ

Die zu den Arbeitspunkten 1, 4 und 8 gehörenden Spektren sind in in Abb. 32 dargestellt. Sie zeigen ^1H -Resonanzen im Bereich von 9-17MHz. Diese tauchen symmetrisch um die Kern-Zeeman-Frequenz des Protons von etwa 12-14MHz auf. Die Kern-Zeeman-Frequenz ist abhängig vom externen Magnetfeld \vec{B}_{ext} . Die Größe der Aufspaltung um diese Kern-Zeeman-Frequenz besteht aus der Dipol-Dipol-Wechselwirkung zum einen und der isotropen Wechselwirkung zum anderen. Die Quadrupolwechselwirkung der Protonen ist vernachlässigbar klein.

Eine andere Gruppe von Linien ist im Frequenzbereich von 5-9MHz zu sehen. Sie besteht aus insgesamt vier Linien, am deutlichsten zu erkennen im Spektrum am Arbeitspunkt 4 (gestrichelte Pfeile in Abb. 32). Besonders in den Spektren am Arbeitspunkt 1 sind auch Linien im Bereich von 15-20MHz sichtbar (gepunktete Pfeile in Abb. 32). Die Lage dieser Linien ist kompatibel mit Stickstoffliganden.

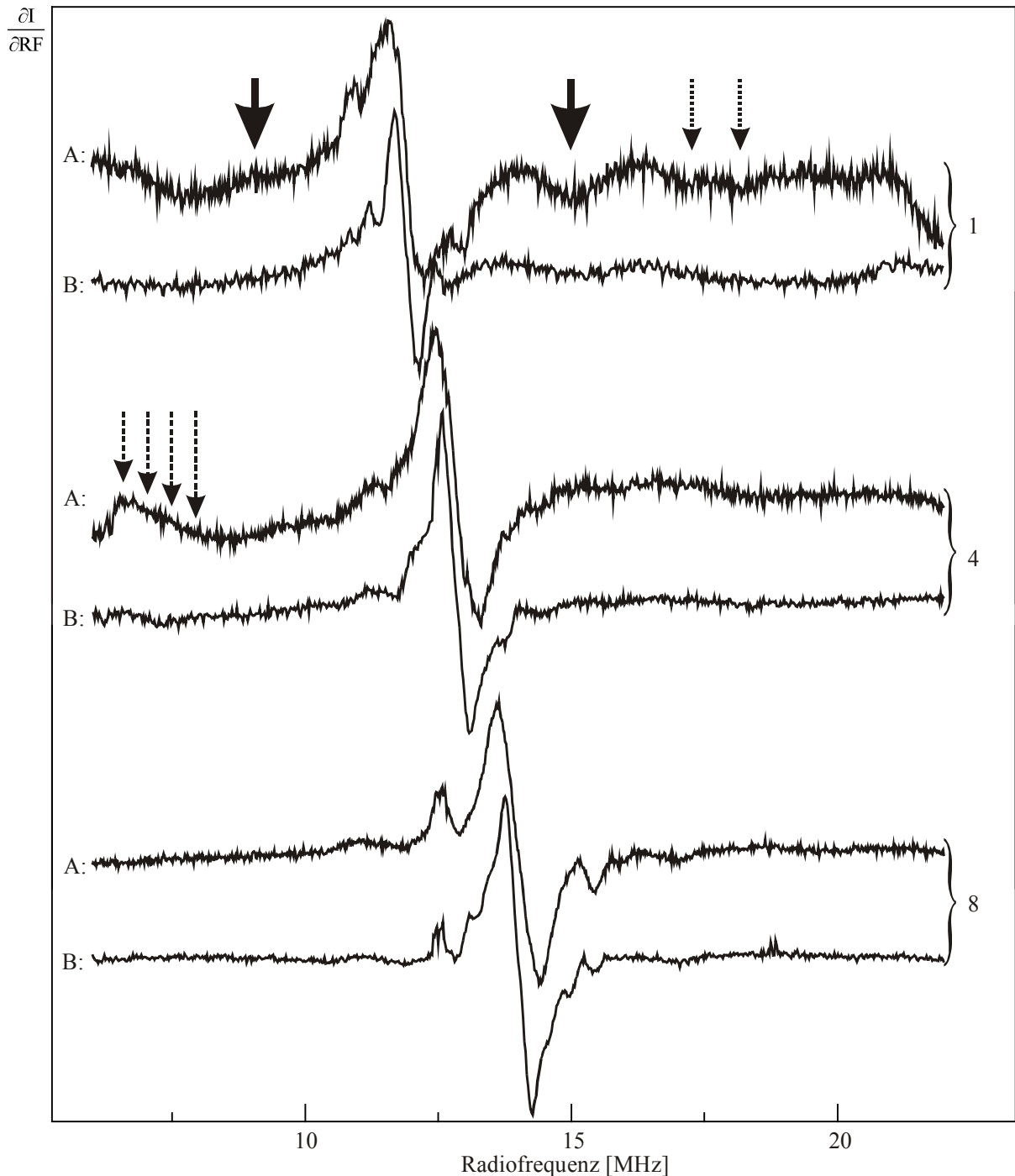


Abb. 32: 3 ENDOR-Spektren an den 3 ENDOR-Arbeitspunkten 1, 4 und 8 (siehe Tab. 7). A: 102.1 (Octa in H_2O unhd NEM); B: 117.2 (Octa in D_2O und NEM); Die durchgezogenen Pfeile bezeichnen Resonanzen austauschbarer Protonen. Gepunktete und gestrichelte Pfeile markieren Stickstoffresonanzen. Aufgrund des schlechten Signal/Rausch-Verhältnisses werden sie nicht weiter interpretiert.

Aufgrund des wesentlich kleineren kernmagnetischen Moments des Stickstoffatoms im Vergleich zum Wasserstoffatom ist die Kern-Zeeman-Energie bei Stickstoffen klein. Der dominante Energieterm ist hier die Quadrupolwechselwirkung, andere Energieterme führen lediglich zu einer weiteren Energieaufspaltung. Die Linienposition ist daher nicht vom

äußeren Magnetfeld \vec{B}_{ext} abhängig. Die Linienbreite hingegen schon. Sie nimmt aufgrund der zunehmenden Kern-Zeemanaufspaltung mit größer werdendem Magnetfeld zu. Aufgrund der unterschiedlichen Quadrupolaufspaltung der beiden Liniensätze von 5-14 MHz und von 15-20 MHz ist es denkbar, dass sie von jeweils zwei unterschiedlich ligandierenden Stickstoffatomen herrühren. Aufgrund des schlechten Signal/Rausch-Verhältnisses ist eine weitere Analyse dieser Linien nicht durchgeführt worden.

Abb. 32 zeigt ENDOR Spektren bei 3 Arbeitspunkten. Alle 9 Arbeitspunkte werden an dieser Stelle der Übersichtlichkeit halber nicht dargestellt, diese sind in Anhang F zu finden.

Beim Vergleich der Spektren der Proben 102.1 (Octarepeat/Cu in NEM und H₂O) und 117.2 (Octarepeat/Cu in NEM und D₂O) fallen zunächst die zwei bei Probe 117.2 fehlenden Signale auf. Sie sind in Abb. 32 mit Pfeilen gekennzeichnet (Arbeitspunkt 1). Außerdem ist die zentrale Linie der Spektren aller Arbeitspunkte bei 117.2 deutlich schmaler als bei 102.1. Es befindet sich also eine geringere Anzahl von Protonen in der Umgebung des Cu-Zentrums.

Aufgrund der hohen Absorption und der langen Spin-Gitter-Relaxationszeit der Probe 102.1 (Octarepeat/Cu in H₂O und NEM) ist es möglich ein ESEEM-Spektrum aufzuzeichnen (Abb. 33).

Da das zur Verfügung stehende Spektrometer für 3-Puls ESEEM weder ausreichende Leistung noch eine ausreichende Anzahl von Pulskanälen zur Verfügung stellt, ist für die Messung lediglich eine einfache Pulsfolge aus 2 Pulsen verwendet worden. Es ist daher nicht möglich, parasitäre Signale mittels Phasenverschiebung zu unterdrücken. Aus diesem Grund sind die Summen und Differenzen der Signale, die bei sonst üblichen 3-Puls-Folgen nicht zu sehen sind, erkennbar. Der in Abb. 33 bei 2.8 MHz sichtbare Resonanz ist so eine parasitäre Linie. Sie entsteht aus der Summe der beiden Resonanzen, die mit Pfeilen markiert sind.

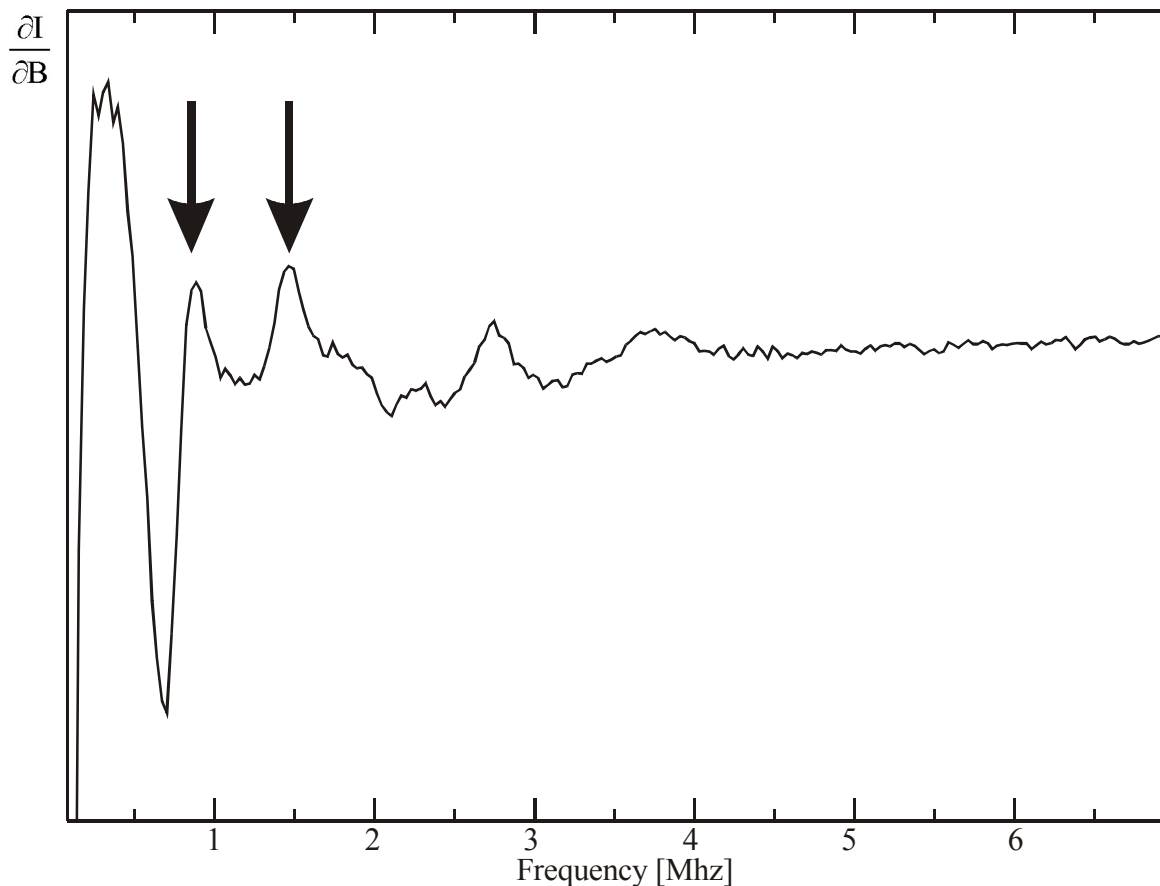


Abb. 33: 2-Puls ESEEM-Spektrum der Probe 102.1 (Octarepeat/Cu in H₂O und NEM). Parasitäre Signale können nicht unterdrückt werden. Die beiden Pfeile bezeichnen die Resonanzen, die dem His N_ε zugeordnet werden.

Die beiden in Abb. 33 mit Pfeilen markierten Maxima sind typisch für ein ligandierendes His. Sie stammen von dem der Koordination abgewandten Stickstoff, dem N_ε des Imidazolrings (Magliozzo und Peisach 1993; Aronoff-Spencer et al. 2000). Eine Aussage darüber, wie viele Imidazolringe das Cu ligandieren, ist nur im Vergleich zu anderen Proben möglich, von denen genau bekannt ist, wieviele Histidine koordinieren. Da dies im Zuge dieser Arbeit nicht gewährleistet ist, kann auf Basis der ESEEM-Spektren darüber keine zweifelsfreie Aussage gemacht werden.

Das Prion-Protein Octarepeat in DPC-Micellen: Da das Signal/Rausch-Verhältnis der Probe 111.1/115.1 (Octarepeat in D₂O und DPC-Micellen) sehr gut ist, macht dies eine Charakterisierung der Probe mittels ENDOR-Spektroskopie möglich. Weil die EPR-Resonanzen denen der Probe 102.1 sehr ähnlich sind, sind auch dieselben Arbeitspunkte (Tab. 7) verwendet worden.

Aufgrund geringerer Intensität der Probe 111.1/115.1 verglichen der Probe 102.1 sind die Spektren der Probe 111.1/115.1 durch relativ starke Resonator-interne Resonanzen überlagert. Sie können vom originalen Meßspektrum abgezogen werden. Bei den Spektren 1 und 4 in Abb. 35 wurde dies durchgeführt. Das Vorgehen ist in Abb. 34 demonstriert.

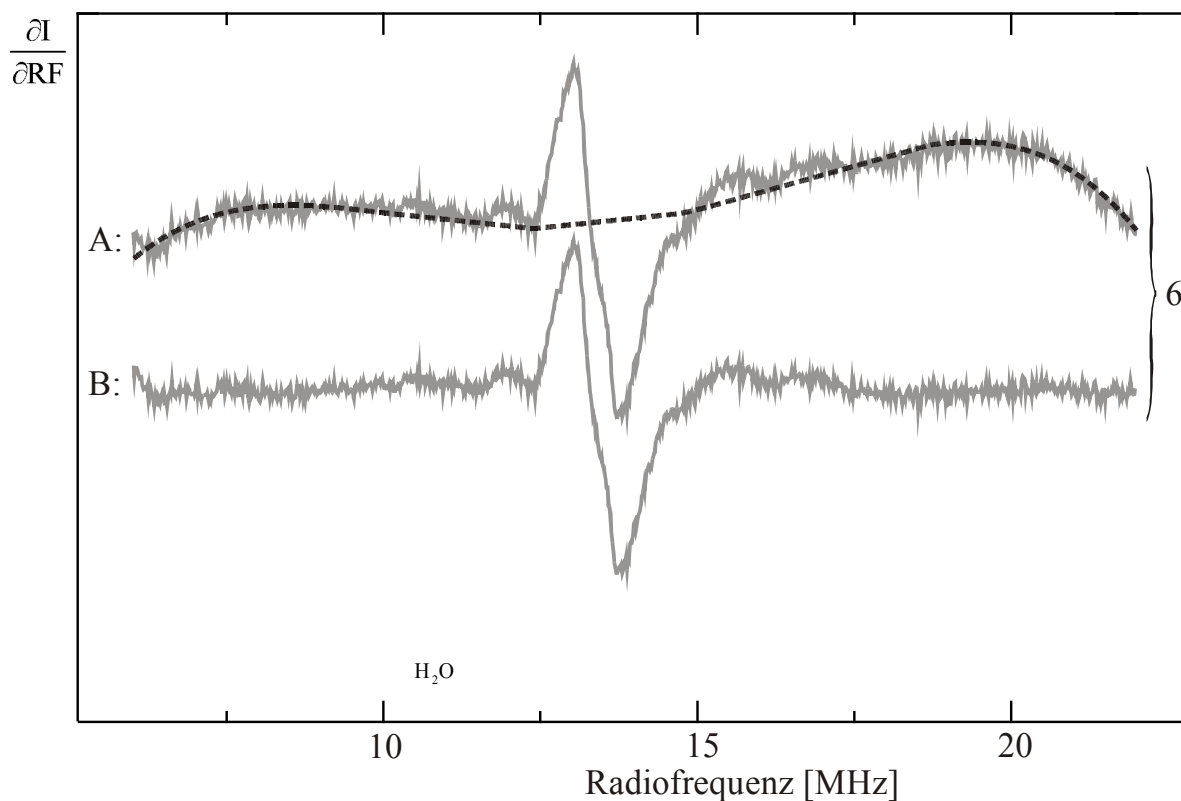


Abb. 34: Korrektur von ENDOR-Spektren, die durch resonatorinterne Resonanzen überlagert sind, hier demonstriert für das Spektrum des Arbeitspunktes 6. Das gemessene Spektrum ist mit A bezeichnet (durchgezogen), nach Abzug resonatorinterner Resonanzen (gestrichelt) ergibt sich das korrigierte Spektrum (B).

In Abb. 35 sind Spektren der Arbeitspunkte 1, 4 und 8 der Probe 111.1/115.1 dargestellt. Sie werden verglichen mit denen der Probe 102.1 (Octarepeat in H₂O und NEM). Die beiden Resonanzen, die bei den Spektren der Probe 102.1 (Octarepeat in H₂O und NEM) einem axial ligandierenden Wassermolekül zugeordnet wurden, sind in den Spektren der Probe 111.1/115.1 (Octarepeat in DPC-Micellen) nicht sichtbar (durchgezogene Pfeile in Abb. 35). Es ist daher denkbar, dass sich bei Anwesenheit von Membranen eine andere axiale Ligandenstruktur ausbildet. Lage und Intensität der Resonanzen, die hauptsächlich die planare Koordinierung widerspiegeln (Arbeitspunkt 8) sind hingegen unverändert, was dafür spricht, dass die planare Koordinierung der Probe 111.1/115.1 mit der der Probe 102.1 (Octarepeat/Cu in H₂O und NEM) identisch ist.

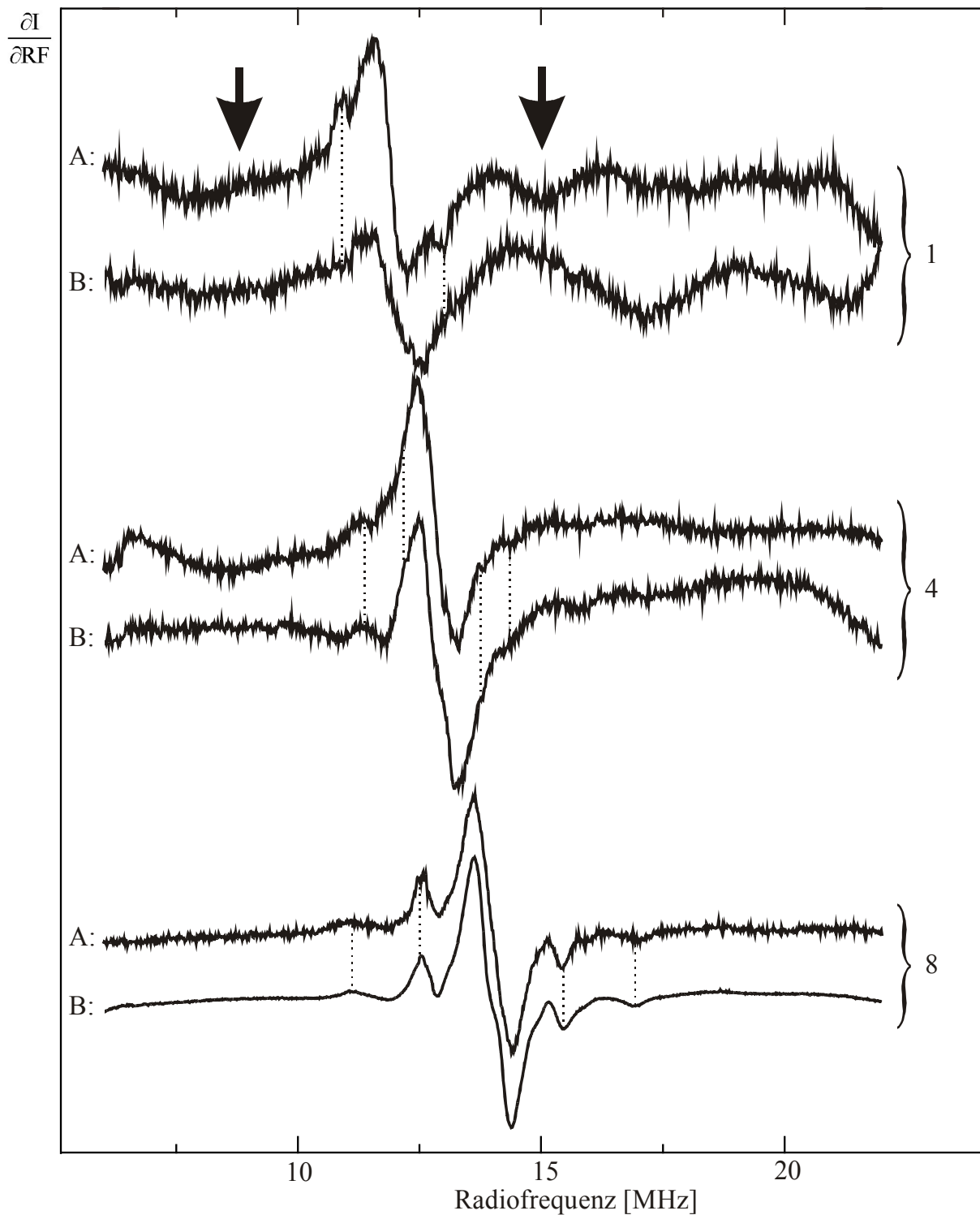


Abb. 35: Auswahl von ENDOR-Spektren: B bezeichnet Spektren der Probe 111.1/115.1 (Octarepeat/Cu in DPC-Micellen) und A die der Probe 102.1 (Octarepeat in H₂O und NEM). Es werden jeweils die Arbeitspunkte 1, 4 und 8 verglichen. Die Pfeile bezeichnen die Resonanzen der Probe 102.1, die einem axialen Wasserliganden zugeordnet werden. Diese Resonanzen sind in den Spektren der Probe 111.1/115.1 nicht sichtbar.

5.3 EXAFS-Spektroskopie

Sowohl von der Probe 102.1 (Octarepeat/Cu in H₂O und NEM) als auch von Probe 111.1/115.1 (Octarepeat/Cu in DPC-Micellen) wurden EXAFS-Spektren gemessen. Sie sind in Abb. 36 dargestellt. Die Daten weisen bis $k=11\text{\AA}^{-1}$ gute Statistik auf. Bei größeren k -Werten stört der Einfluß der Zink-Kante, welche etwa 600 eV über der Kupferkante liegt.

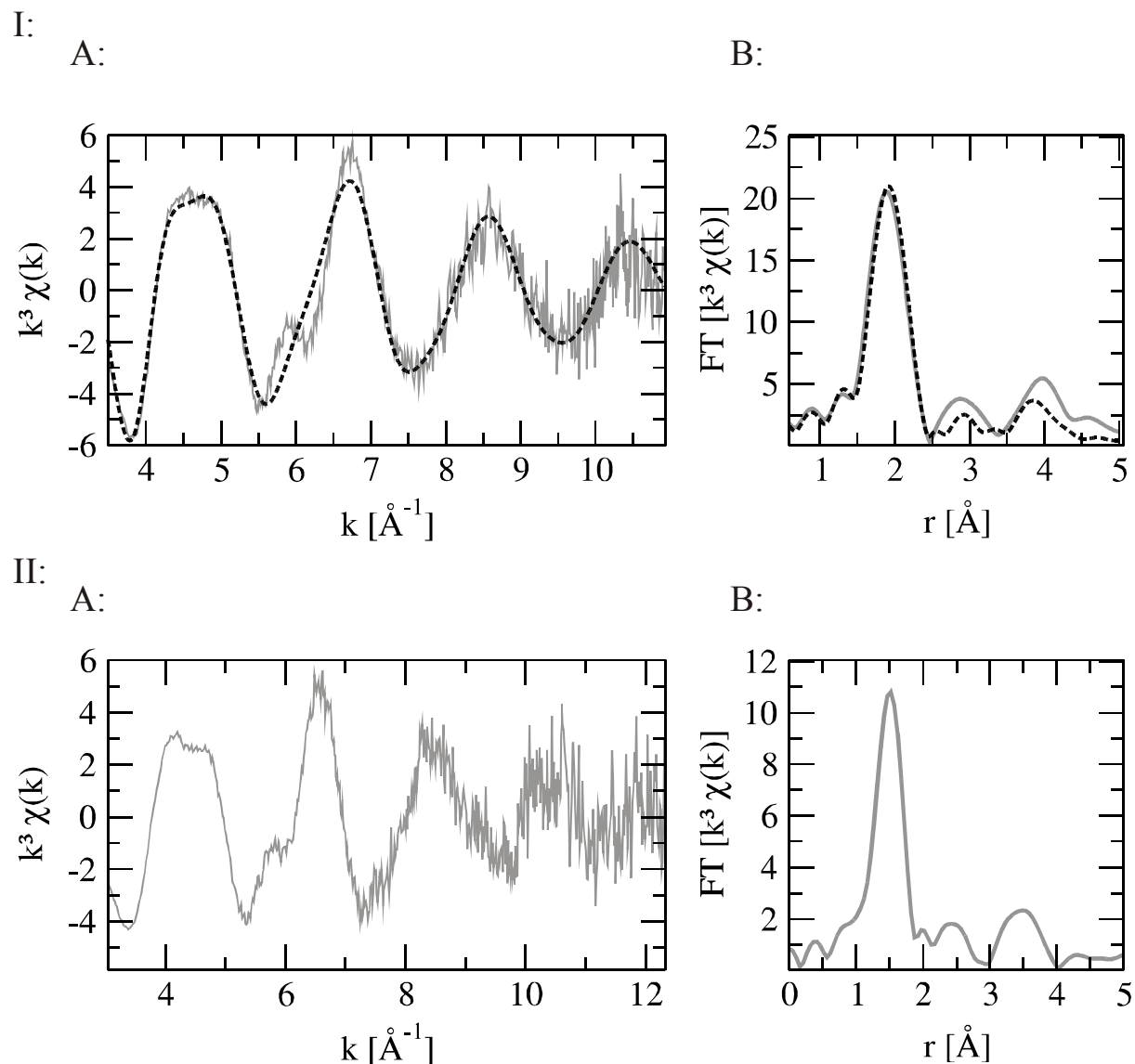


Abb. 36: I: A: experimentelles EXAFS-Spektrum (durchgezogene Linie, grau) und eine Standardanpassung (gestrichelt, schwarz) der Probe 102.1 (Octarepeat/Cu in H₂O und NEM) B: Fourier-Transformierte des EXAFS-Spektrums (durchgezogene Linie, grau) und der Standardanpassung (gestrichelt, schwarz); II: A: EXAFS-Spektrum der Probe 111.1/115.1 (Octarepeat/Cu in DPC-Micellen) B: Fourier-Transformierte des Spektrums

Die Proben zeigen denselben Verlauf des Spektrums. Insbesondere das kleine Maximum bei etwa 6 \AA^{-1} ist bei beiden Proben deutlich ausgeprägt. Für die Probe 102.1 (Octarepeat/Cu in H_2O und NEM) wurde eine Anpassung basierend auf einem einfachen Modell des Komplexes, dargestellt in Abb. 37, versucht.

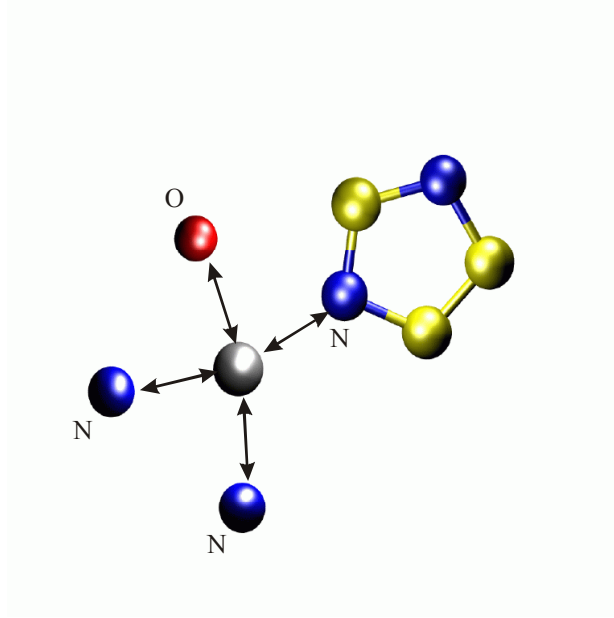


Abb. 37: Einfaches Modell eines Cu-Komplexes, auf dessen Basis eine EXAFS-Anpassung des Spektrums der Probe 102.1 (Octarepeat in H_2O und NEM) versucht wurde. Die Abstände der Liganden vom Cu-Zentrum (schwarze Doppelpfeile) sind Parameter der Anpassung, ebenso wie die Kantenverschiebungsenergie E_F und ein gemeinsamer Debye-Waller-Faktor für alle Atome.

Parameter für die Anpassung waren die Kantenverschiebungsenergie E_F , die Abstände der ligandierenden Atome und ein gemeinsamer Debye-Waller-Faktor für alle Atome. Der Imidazolring wurde als Einheit angepasst (Grantner 2003). Wie Abb. 36 I belegt, kann eine Standardanpassung die gemessenen Daten nur unzureichend wiedergeben.

6 Das humane Prion-Protein

6.1 EPR-Spektroskopie

Da die Präparation von humanen Prion-Protein-Proben einen erheblichen Aufwand darstellt, war es nicht möglich, verschiedene Puffersysteme zu testen. Es wurden nur solche Systeme verwendet, von denen bekannt ist, dass sie stabilisierenden Einfluß auf die Cu-Komplexierung haben (MES, MOPS, HEPES). Tab. 8 zeigt einen Überblick über alle gemessenen Prion-Protein-Proben. Bei der Präparation der Prion-Protein-Proben wurde zur Kontrolle der Homogenität zunächst EPR-Spektroskopie eingesetzt. Die für X-Band EPR erforderlichen hohen Proteinkonzentrationen lassen sich nicht ohne weiteres erreichen. Humane Prion-Proteine (hPrP) fallen ab einer Konzentration von 120µM in Lösung aus. Deshalb ist die kontrollierte Fällung mittels Ammoniumsulfat eingesetzt worden, um eine ausreichende Zahl EPR-aktiver Zentren in einem möglichst kleinen Probenvolumen zu erreichen. Im Zuge der Resuspendierung ist aufgefallen, dass dies mit den Proben bei pH 8 wesentlich leichter möglich ist als mit solchen bei pH 7 oder pH 6.

erhalten	Nr.	Probenzusammensetzung	EPR	ENDOR	ESEEM	EXAFS
19.06.02	201.1	hPrP in 10mM MES, pH 6.0, c(Cu) durchschnittlich 1.7 pro Prion-Protein, gefällt mit 95%	✓			✓
01.08.02	202.1	hPrP in 10mM MOPS, pH 7.0, c(Cu) durchschnittlich 2.7 pro Prion-Protein, gefällt mit 95% Ammoniumsulfat	✓	s	n	✓
	202.2	+Xray	✓	✓		
	204.1	hPrP in 50mM HEPES, pH 8.0, gefällt mit 95% Ammoniumsulfat, Cu/PrP-Verhältnis noch nicht bestimmt	✓		n	
20.01.03	210.1	hPrP in 2 mM NEM, pH 6.0, c(Cu), gefällt mit 50% PEG	o	o	o	✓

Tab. 8. Tabelle der kupferbeladenen humanen Prion-Protein-Proben und Übersicht über alle vorhandenen Messungen. ✓ : mit guter Statistik gemessen; s: messbar, aber schlechte Statistik, o: Messung ist noch nicht durchgeführt; n: Messung aufgrund zu geringer Probenkonzentration nicht durchführbar

Abb. 38: zeigt EPR-Spektren der Proben, die die beste Homogenität aufweisen. Da während der Herstellung der Prion-Protein-Proben Kupfer im sechsfachen Überschuß zugegeben wird

(Kap. 4.2), spielt die Bestimmung von freiem Cu in der Probe eine besondere Rolle. Wie man den Spektren in Abb. 38 entnehmen kann, ist in keiner der Proben freies Cu vorhanden. Dieses zeigt bei niedrigem Feld 4 einzeln sichtbare hyperfein aufgespaltene Linien und nicht nur 3 (Aronoff-Spencer et al. 2000).

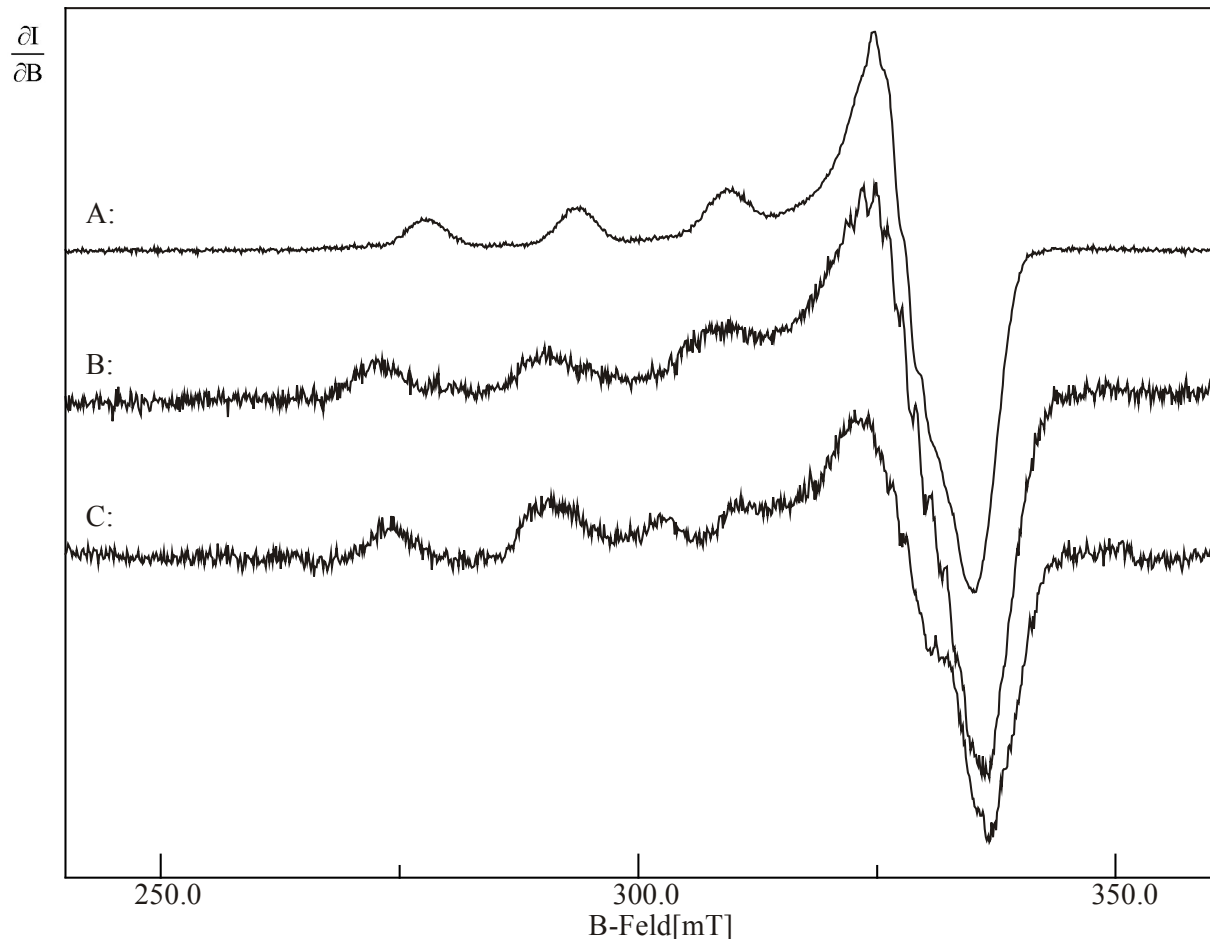


Abb. 38: EPR-Spektren von Prion-Protein-Proben. B: 202.2 (HPrP in H₂O und MOPS, pH 7); C: 204.1 (HPrP in H₂O und HEPES, pH 8); zum Vergleich ist auch das Spektrum des Cu-komplexierten Octarepeats in H₂O und NEM (102.1) dargestellt (A)

Die Homogenität der Prion-Protein-Proben ist schlechter als die der Peptid-Proben (vgl. Abb. 26). Interessant ist, dass die Resonanzen der Prion-Protein/Cu Komplexe gegenüber denen der Probe 102.1 (Octa/Cu in NEM) leicht verschoben sind. Die angepassten g und A Faktoren sind in Anhang C zusammengefasst.

Verglichen mit denen der Octapeptidproben entsprechen die Werte der g- und A- Tensoren (Anhang C) außerdem mehr solchen, die bei einer 4N-Ligandierung zu erwarten wären (Anhang D). Eine eindeutige Aussage ist aber nicht möglich, da die Bereiche der Parameter für 3N1O und 4N Ligandierung stark überlappen, wie man in Abb. 28 erkennen kann.

Die Probe 202.2 (HPrP in H₂O und MOPS, pH 7) zeigt deutlich sichtbar eine zusätzliche Spezies bei etwas höherem Magnetfeld. Sie sind in Abb. 39 A mit 2 bezeichnet. Besonders gut erkennbar ist das bei den Resonanzen, die zu den Übergängen $M_{Cu\ I}=1/2$ und $M_{Cu\ I}=3/2$ gehören.

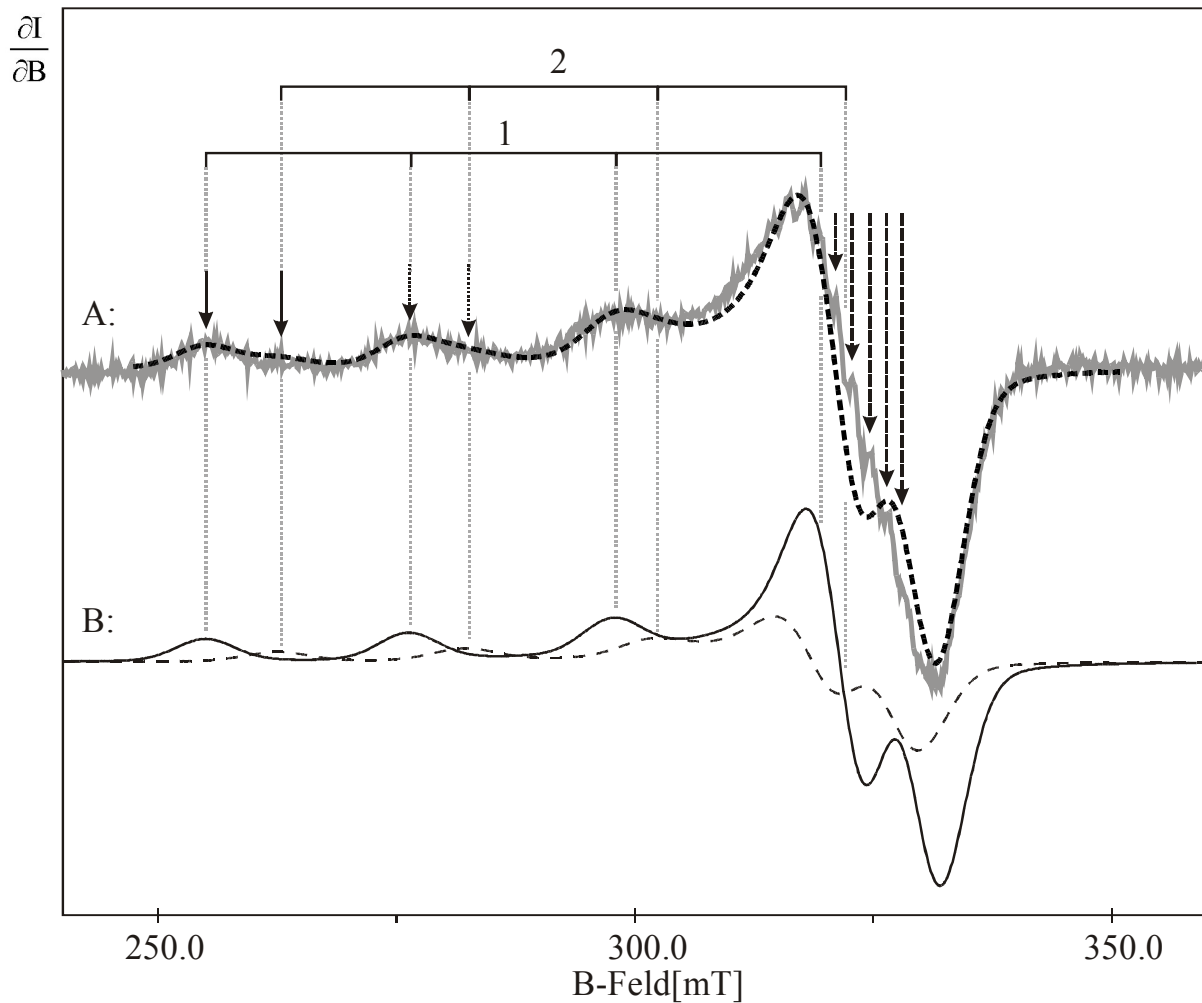


Abb. 39: A: EPR-Spektrum der Probe 202.2 hPrP in H₂O und MOPS. Es ist versucht worden, das Spektrum mit zwei Spezies anzupassen (bezeichnet mit 1 und 2). Spezies 1 tritt mit deutlich höherer Konzentration auf. Durchgezogene bzw. punktierte Pfeile markieren die zu $M_{I\ Cu}=3/2$ bzw. die $M_{I\ Cu}=1/2$ gehörenden Resonanzen ($\Theta=0^\circ$). Die mit gestrichelten Pfeilen bezeichneten Resonanzen stammen von größeren A_{\perp} -Werten des Hyperfeinwechselwirkungstensors (siehe auch Abb. 6). B: Aus einer Standardanpassung ergeben sich für Spezies 1 die Parameter: $g_x=2.0600$, $g_y=2.0600$, $g_z=2.2569$, $A_x=4.07$ MHz, $A_y=4.07$ MHz, $A_z=563.8$ MHz, Linienbreite = 50.0G, Lorentz/Gauss = 0.3, und für Spezies 2 $g_x=2.0600$, $g_y=2.0600$, $g_z=2.2265$, $A_x=4.07$ MHz, $A_y=4.07$ MHz, $A_z=513.3$ MHz, Linienbreite = 50.0G, Lorentz/Gauss = 0.3

Es ist versucht worden, dieses Spektrum mit zwei Spezies anzupassen. Die zugehörigen berechneten Spektren sind in Abb. 39 B zu sehen.

Das EPR-Spektrum von Probe 204.1 zeigt bei den Resonanzen $M_{CuI}=3/2$ ($\theta=0$) und $M_{CuI}=1/2$ ($\theta=0$) nur eine Spezies. Die zu $M_{CuI} = -1/2$ gehörende Resonanz erscheint jedoch scheinbar in zwei weitere Linien aufgespalten.

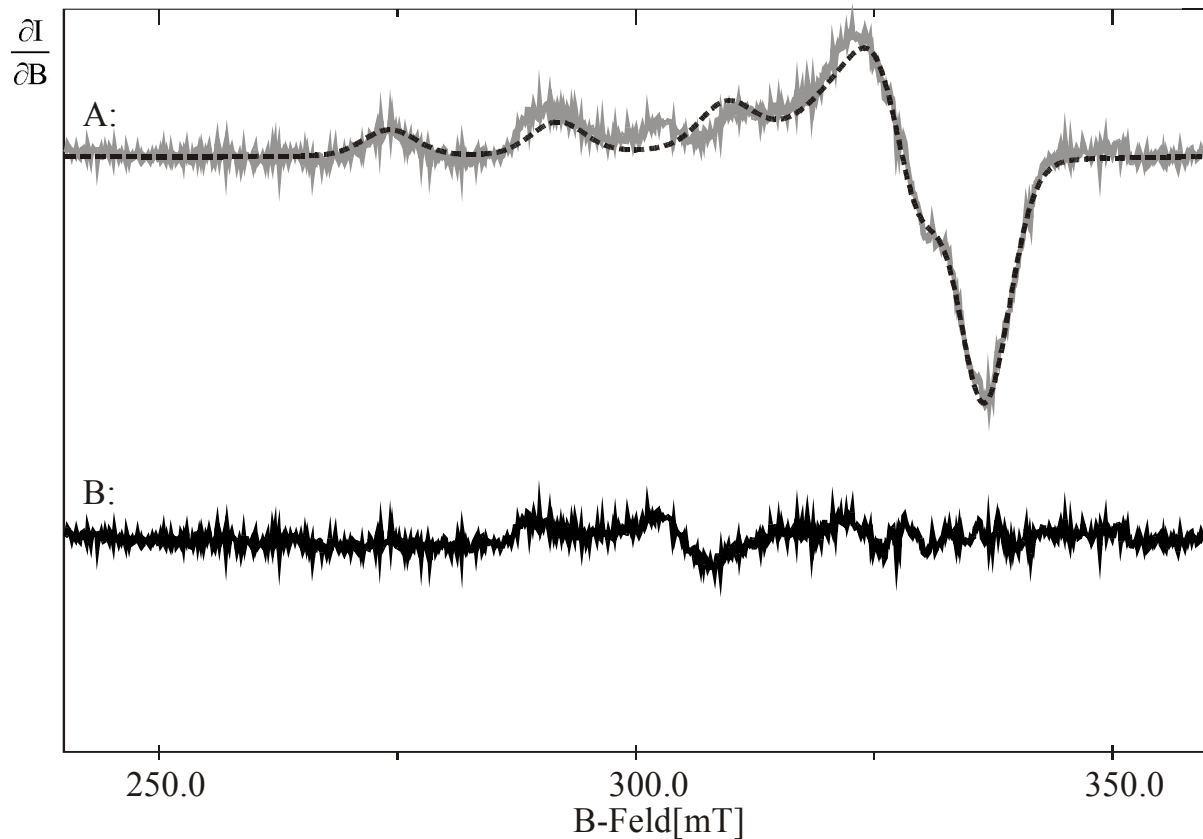


Abb. 40: A: EPR-Spektrum (durchgezogen, grau) der Probe 204.1 und Standardanpassung (gestrichelt, schwarz). Die Übereinstimmung ist nicht befriedigend. B: Die Differenz von experimentellem und theoretisch berechnetem Spektrum.

Auch für das EPR-Spektrum der Probe 204.1 (HPrP in H_2O und HEPES, pH 8) wurde eine Anpassung versucht. Sie gibt das Spektrum nur unzureichend wieder. Um die Störung besser charakterisieren zu können wurde die Differenz aus experimentellem Spektrum und Anpassung gebildet, sie ist in Abb. 40 B gezeigt. Sie rührt möglicherweise von einem zusätzlichen Bindungsplatz mit anderer Koordination des Cu her oder von der Bildung eines Cu-Cu-Doppelkomplexes.

Eine präzise spektroskopische Charakterisierung von kupferbeladenen Prion-Protein-Proben ist wesentlich komplexer als die von Octarepeat-Proben. Es muß berücksichtigt werden, dass sich auch bereits bei pH 7 zusätzliche kupferaffine Bindungsplätze im Vollängenprotein

befinden. Außerdem besteht die Möglichkeit der Doppelkomplexbildung verstärkt, da sich jeweils vier Octarepeatsequenzen auf engem Raum befinden.

6.2 ENDOR-Spektroskopie

Da die Probe 202.2 verglichen mit den Proben 102.1 und 117.2 nur leicht unterschiedliche g und A -Tensoren aufweist, sind wieder dieselben Arbeitspunkte (Tab. 7) verwendet worden. Da die Konzentration der kupferbeladenen Prion-Protein-Proben niedriger ist als die der Peptid/Cu-Komplexe, ist das Signal/Rausch -Verhältnis merklich schlechter. In Abb. 41 ist eine Auswahl der ENDOR-Spektren zusammen mit ENDOR Spektren der Proben 102.1 (Octarepeat/Cu in H_2O und NEM) und 117.2 (Octarepeat/Cu in D_2O und NEM) dargestellt.

Es existieren parasitäre Resonanzen bei etwa 16-17MHz (gepunktete Pfeile in Abb. 41). Diese sind resonatorbedingt, und sie können bei der Messung nicht unterdrückt werden. Sie fallen nur in Spektren auf, deren Probensignale sehr schwach sind. Die Resonanzen sind unabhängig vom momentanen Magnetfeld \vec{B}_{ext} . Dadurch sind sie von Protonresonanzen unterscheidbar.

Beim Vergleich der ENDOR-Spektren der humanen Prion-Protein-Probe 202.2 mit denen der Probe 102.1 (Octarepeat in H_2O und NEM) fällt auf, daß die Resonanzen bei Arbeitspunkt 8 praktisch identisch sind. Bei kleineren Magnetfeldern treten die Unterschiede aber umso stärker auf. Das heißt, dass besonders in den Bereichen um die Molekülachse strukturelle Unterschiede zu erwarten sind, während die Geometrie in den planaren Bereichen sehr ähnlich ist. Besonders für den Arbeitspunkt 1 fällt auf, dass die zentrale Linie sehr schmal ist und vergleichbar mit der Linienbreite der deuterierten Probe. Die mit schwarzen Pfeilen bezeichneten Resonanzen, für 102.1 einem axialen Wassermolekül zugeordnet, sind auch in den Spektren der Probe 202.2 sichtbar.

$$\frac{\partial I}{\partial RF}$$

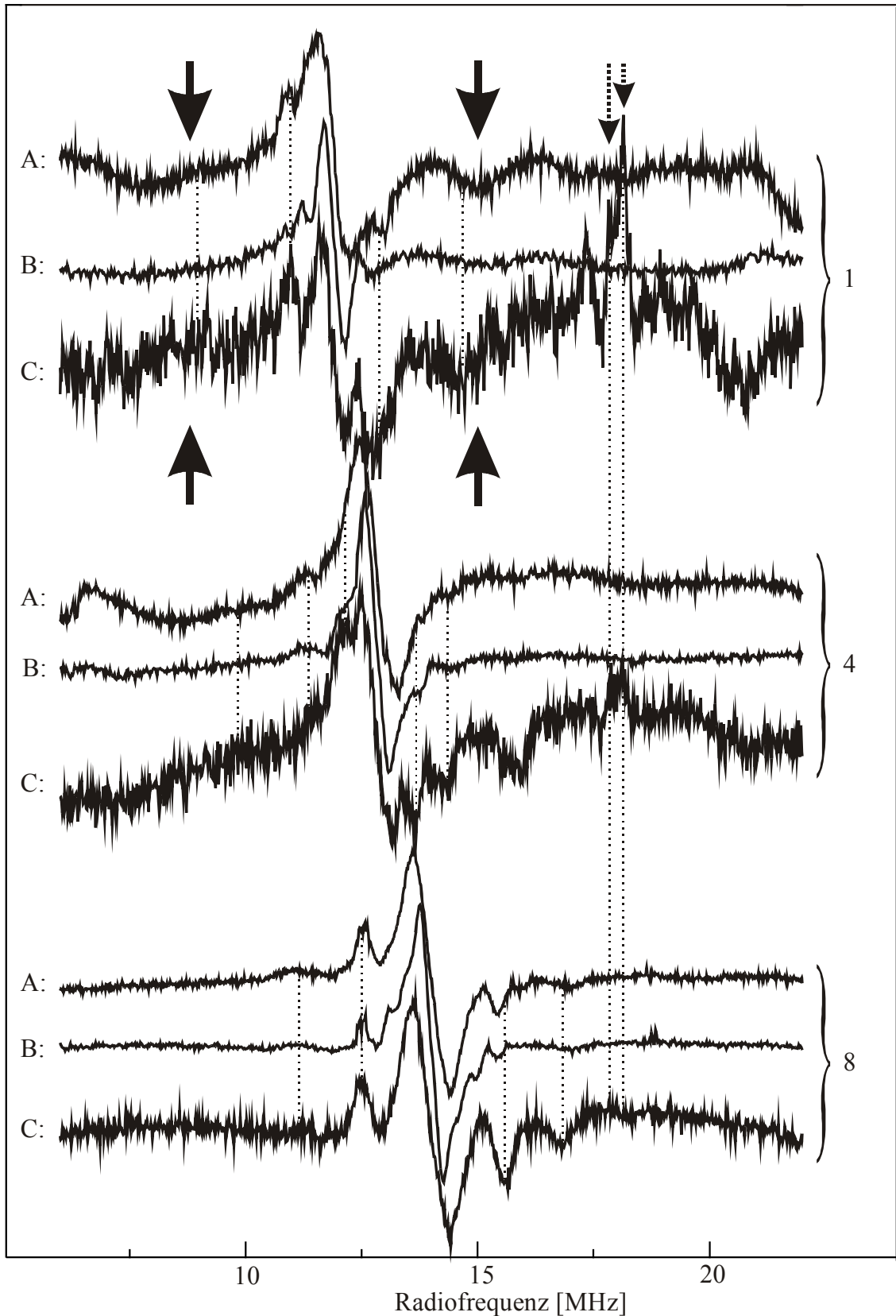


Abb. 41: ^1H ENDOR-Resonanzen der Prion-Protein-Probe 202.2 (HsPrP in H_2O und MOPS) bei den Arbeitspunkten 1, 4 und 8, bezeichnet mit C. Zum Vergleich sind auch die Spektren von 102.2 (Octarepeat in H_2O und NEM), Spektren A, und 117.2 (Octarepeat in D_2O und NEM), Spektren B, dargestellt. Die mit schwarzen Pfeilen markierten Resonanzen werden einem axialen Wassermolekül zugeordnet.

6.3 EXAFS-Spektroskopie

Für beide kupferbeladenen humanen Prion-Protein-Proben 202.2 (pH 7) und 204.1 (pH 8) wurden EXAFS-Spektren aufgezeichnet. Sie sind in Abb. 42 dargestellt.

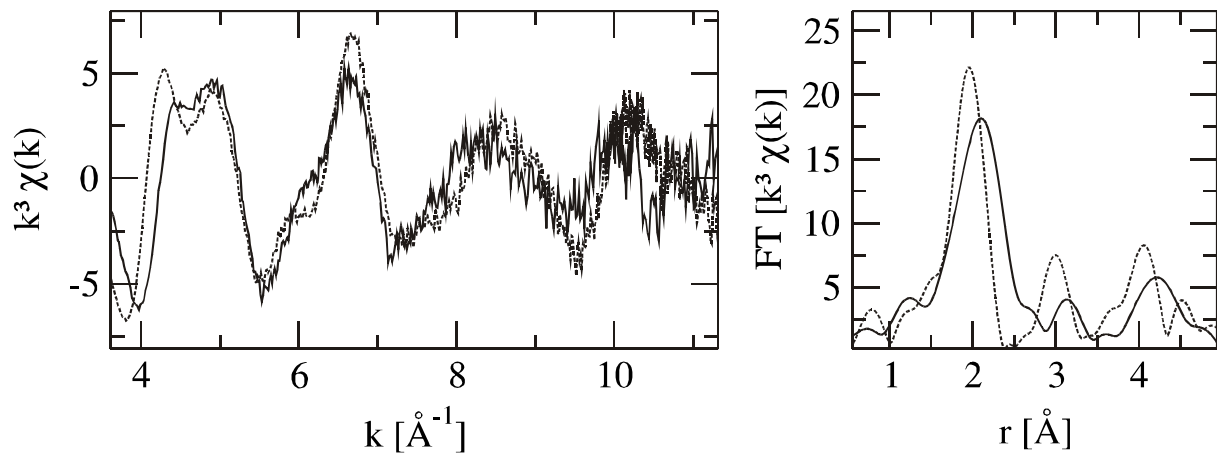


Abb. 42: A: Vergleich der experimentellen EXAFS-Spektren der beiden humanen Prion-Protein-Proben 202.2 bei pH 7 (gestrichelt) und 204.1 bei pH 8 (durchgezogen); B: Die Fourier-Transformierte der EXAFS-Spektren 202.2 (gestrichelt) und 204.1 (durchgezogen)

Obwohl das Spektrum von Probe 204.1 schlechtere Statistik aufweist ist ersichtlich, dass der Verlauf der Spektren bei beiden Proben ähnlich ist. Besonders die Bereiche zwischen 5 und 8 \AA^{-1} zeigen gute Übereinstimmung. Bemerkenswert ist, dass das Maximum bei etwa 6 \AA^{-1} beim EXAFS-Spektrum der Probe 204.1 nur ansatzweise auftritt, wohingegen es bei der Probe 202.1, und auch bei allen bisher gemessenen Peptidproben, vorhanden ist. Auch im Bereich $<5 \text{\AA}^{-1}$ gibt es signifikante Unterschiede zwischen beiden Spektren. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass der Cu-Bindungsplatz bei höheren pH-Werten eine andere Struktur einnimmt.

7 Iterative Verfeinerung der Struktur des Prion-Protein-Octarepeats

Diese neue Methode des Strukturrefinements ist in Zusammenarbeit mit dem Institut für BioMolekulare Optik, Ludwig-Maximilians-Universität München, Prof. Tavan, entstanden (Mentler et al. 2004).

Die in dieser Arbeit eingesetzten spektroskopischen Methoden liefern eine Vielzahl unterschiedlicher Informationen. EXAFS liefert besonders präzise Informationen ($\pm 0.02\text{\AA}$) über die erste Koordinationsschale um das zentrale Cu-Atom. Außerdem ist es möglich, über die Berücksichtigung von Vielfachstreubeiträgen zum EXAFS-Spektrum, die Lage aromatischer Gruppen nahe des Cu-Atoms zu bestimmen. Mittels EPR lässt sich Art und Anzahl der direkten Liganden bestimmen, ebenso wie die Symmetrie des Komplexes, während ENDOR besonders sensitiv auf magnetische Dipole in einer Distanz kleiner als 4\AA ist (besonders Protonen, aber auch direkt ligandierter Stickstoff). Mit ESEEM ist es möglich vor allem Stickstoff-Atome im Abstand von etwa 6\AA nachzuweisen.

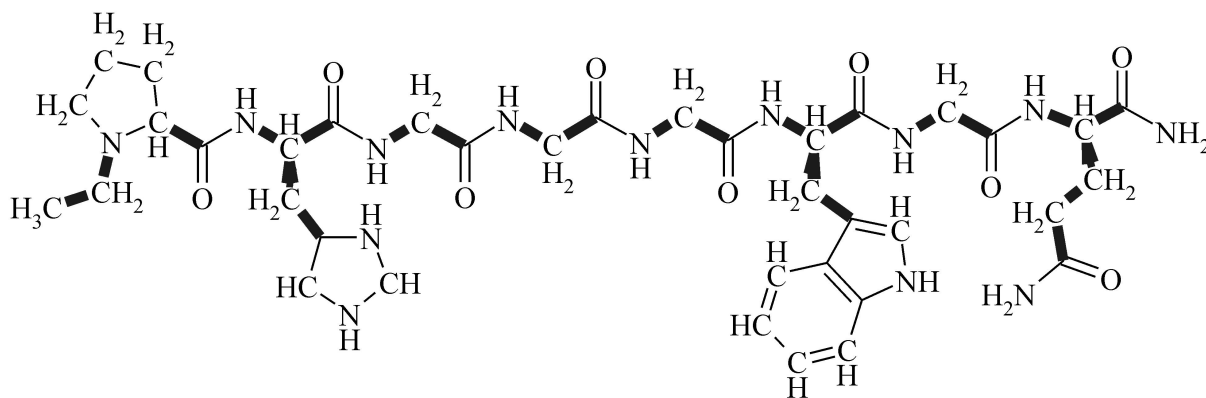


Abb. 43: die Polypeptidkette des Prion-Protein Octapeptids. Bindungen, um die gedreht werden kann, sind fett gezeichnet.

In diesem Abschnitt wird eine neuartige Methode für die Strukturbestimmung der Metallumgebung eines metallhaltigen Peptides vorgeschlagen. Um die Beschreibung zu vereinfachen, wird sie am Beispiel des Prion-Octapeptids durchgeführt.

Um eine Aussage über die Struktur des Prion-Octapeptids zu treffen, ist es notwendig, Informationen aus einer Vielzahl spektroskopischer Methoden zu einem konsistenten Bild zu verschmelzen. Abb. 43 zeigt die synthetisierte Prion-Octapeptidkette, die spezifisch Kupfer

binden kann. Diese weist eine große Menge an Freiheitsgraden auf. Alle denkbaren Komplexe, die ein Cu-Ion mit dieser Peptidkette bilden kann, zu berücksichtigen ist, auch unter massivem Einsatz von Computern, nicht möglich.

7.1 Entwicklung eines Basismodells

Anhand der EPR- und der EXAFS-Daten wurde zunächst ein Basismodell entwickelt, welches die Liganden der ersten Koordinationsschale umfasst. Die direkten Liganden werden mittels EPR-Spektroskopie bestimmt, ebenso die Symmetrie des Komplexes. Für den Fall des Cu-ligandierten Prion-Octarepeats ergibt sich nach Kapitel 2.1.4 (Peisach und Blumberg 1974) eine axialsymmetrische Struktur, deren starke Liganden in der Ebene normal zur Symmetrieachse planar angeordnet sind. Auswertung der g- und A-Tensoren nach Aronoff-Spencer (2000) und Peisach und Blumberg (1974) ergeben als wahrscheinlichstes Ligandierungsmuster 3N und 1O, die in einer Ebene normal zur Symmetrieachse angeordnet sind. Ferner sprechen die ESEEM-Spektren für einen Imidazolring als Liganden.

Ist die Art der Ligandierung bekannt, ist es möglich, mit Hilfe einer Standard-EXAFS-Datenauswertung die ungefähren Abstände der Liganden zu bestimmen, Abb. 44 A. Zusätzlich ist es in diesem speziellen Fall möglich, auch die Lage des Imidazolrings relativ zum Kupfer einzugrenzen. Die Berücksichtigung der Mehrfachstreuung am Imidazolring setzt eine bestimmte, in Abb. 44 B dargestellte Geometrie voraus. Dabei bleiben Kräfte, die die Peptidstruktur auf die Liganden ausübt, zunächst unberücksichtigt, ebenso wie die Ladung der Liganden, die natürlich ebenfalls mit der Ladungsverteilung des Peptids und der des Cu-Ions wechselwirkt.

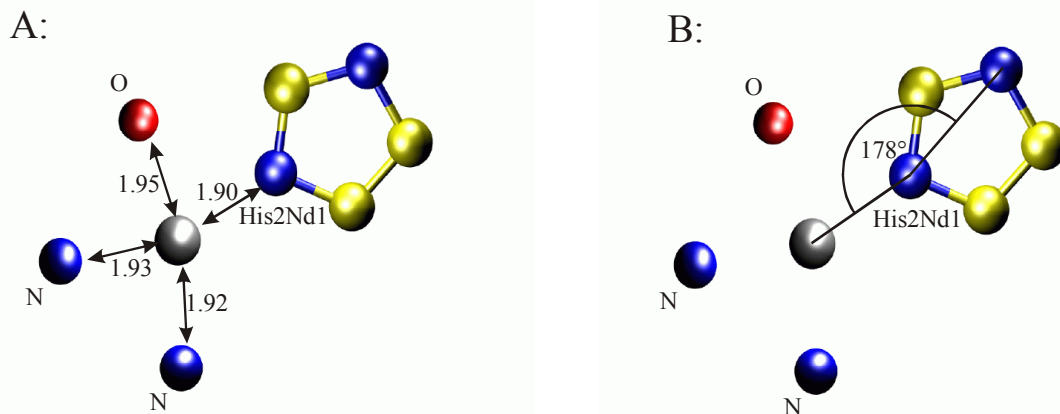


Abb. 44: Basismodell nach Auswertung der EPR-, EXAFS- und ESEEM-Spektren

Eine gute Übereinstimmung simulierter EXAFS-Spektren mit dem Experiment kann auf Grundlage eines solchen Basismodells nicht erwartet werden (Abb. 45).

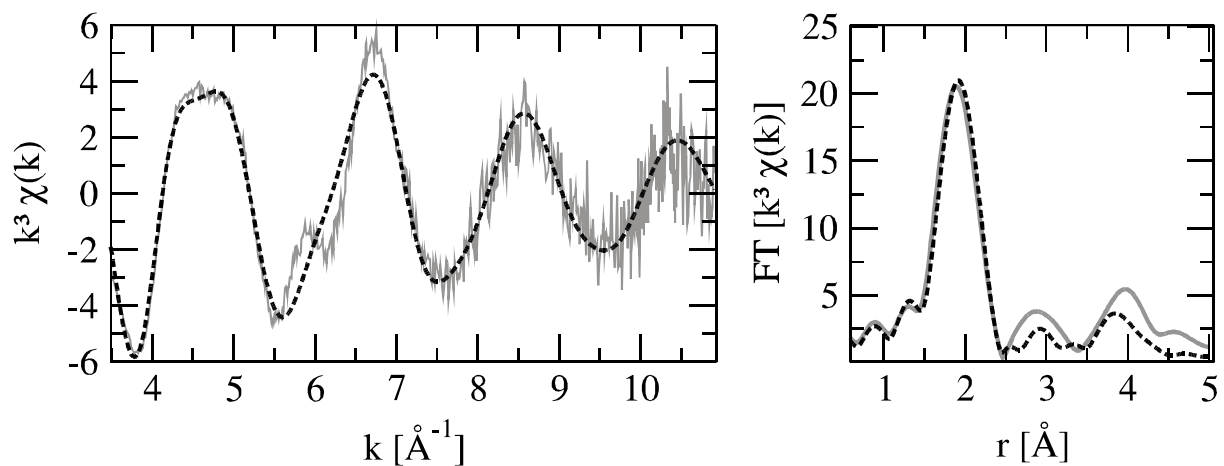


Abb. 45: EXAFS-Spektrum (grau, durchgezogen) der Probe 102.1 und Anpassung (schwarz, gestrichelt) basierend auf den Daten des Basismodells (Abb. 44). Feinheiten des Spektrums, insbesondere das kleine Maximum bei 6\AA^{-1} , können nicht wiedergegeben werden.

Vielfachstreubeiträge können bei dieser Art des Modellbaus nur innerhalb des Imidazolrings berücksichtigt werden. Wesentliche Beiträge zur Vielfachstreuung ergeben sich jedoch auch aus der Berücksichtigung der zweiten und dritten Koordinationsschale. Dennoch ist eine Abschätzung der Abstände der Cu-Liganden möglich, denn diese wird lediglich von der Grundfrequenz des EXAFS-Spektrums wiederspiegelt. Abb. 44 zeigt die durch EPR und ESEEM identifizierten Liganden, die von EXAFS dazu bestimmten Abstände, und auch die

Lage des Imidazolrings. Dieses einfachste aller möglichen Modelle ist mit EPR und EXAFS kompatibel. Es ist auch das in der Literatur am weitesten verbreitete und das am meisten diskutierte.

7.2 Generierung aller möglichen Konfigurationen

Die in Kap 7.1 vorgestellte Ligandierung kann vom Proteinerückgrat auf unterschiedliche Art und Weise erreicht werden. Aus einem Vergleich der Literaturdaten kann die Ligandierung durch die Seitenkette des Tryptophan ausgeschlossen werden (Stöckel et al. 1998; Luczkowski et al. 2002; Mentler et al. 2004). Daß das Cu vom His N_δ koordiniert wird gilt als sicher (Miura et al. 1996b; Miura et al. 1999). Alle anderen Stickstoffe und auch alle Sauerstoffatome des Proteinerückgrats müssen als mögliche Liganden in Betracht gezogen werden. Abb. 46 zeigt alle in Frage kommenden Liganden.

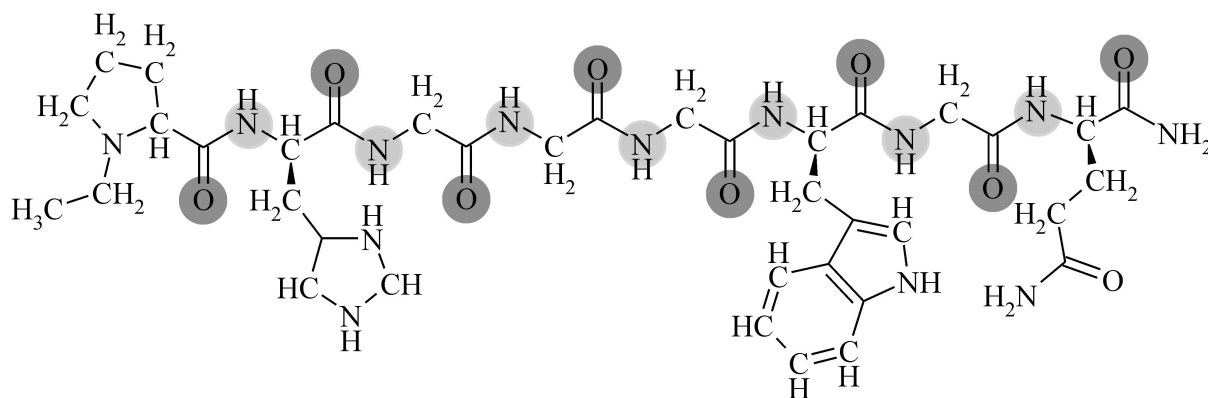


Abb. 46: Alle möglichen Stickstoff- und Sauerstoffliganden im Octapeptid des Prion-Proteins mit Ausnahme des als sicher geltenden Liganden N_ε der His-Seitenkette. Die in Frage kommenden Sauerstoffatome sind dunkel unterlegt, die Stickstoffatome hell.

Die große Anzahl der mit dem Grundmodell kompatiblen Konfigurationen machen eine computergestützte Auswertung unerlässlich, eine Implementierung aller Modelle „mit der Hand“ ist nicht durchführbar. Bei einer ersten Koordinationsschale, die 3 Stickstoffe und einen Sauerstoff umfasst, wobei ein Stickstoff durch einen Imidazolring bereits fest vorgegeben ist, und einer Anzahl von insgesamt 8 möglichen Sauerstoffliganden und 7 möglichen Stickstoffliganden ergibt sich eine Gesamtzahl von 189 verschiedenen Konfigurationen. Es ist anzunehmen, dass die meisten dieser 189 Konfigurationen aus sterischen Gründen nicht stabil oder mit der Symmetrievorgabe einer quadratisch planaren Anordnung nicht kompatibel sind.

Um zu bestimmen, wie wahrscheinlich bzw. wie energetisch günstig eine bestimmte Konfiguration ist, wird das aus der Röntgenstrukturanalyse bekannte Programmpaket XPLOR herangezogen. Das Programm ist in der Lage, die Energie eines Proteins oder einer Polypeptidkette auf Grundlage bestimmter stereochemischer Informationen, wie Bindungswinkel, Bindungslängen oder der Planarität bestimmter Atomgruppen, zu bestimmen. Die die Peptidkette betreffenden Potentiale stammen aus Hartree-Fock Rechnungen mit einem 6-31G* Basissatz an Modellpeptiden (MacKerell Jr. et al. 1998). Sie werden in der Proteinkristallographie und für NMR-Strukturbestimmungen seit langem angewandt und sind daher entsprechend gut definiert. Anders ist das für die Potentiale, die die Koordinierung des Cu-Ions beschreiben. Diese sind längst nicht so genau bekannt. Ihre Größenordnung kann mit modernen Molekülorbitalrechnungen bestimmt werden (Weiss 2005). Tab. 9 zeigt die Stärke dieser Potentiale und im Vergleich dazu auch einige aus der Röntgenstrukturanalyse bestimmte Potentiale. Zusätzlich stehen auch noch gemessene Abstände aus EXAFS zur Verfügung, mittels derer die Plausibilität der errechneten Potentiale überprüft werden kann.

Stereochemische Information	Potential [kJ/mol]	Quelle
Cu - N	755	Molekülorbitalrechnungen
Cu - O	189	Molekülorbitalrechnungen
C _α - C	1048	(MacKerell Jr. et al. 1998)
C - N	1090	(MacKerell Jr. et al. 1998)
C - O	4598	(MacKerell Jr. et al. 1998)

Tab. 9: Einige der verwendeten Potentiale und deren Ursprung

Um bei der Komplexbildung in der ersten Koordinationsschale des Cu-Atoms eine Symmetrie zu erreichen, die der des Basismodells entspricht, und gleichzeitig die Randbedingungen für eine korrekte Geometrie des Peptidrückgrates und seiner Seitenketten zu gewährleisten, müssen zusätzliche Potentiale eingeführt werden. Sie definieren die Kupfer-Koordination an die Peptidkette. Tab. 10 gibt einen Überblick, in Abb. 47 sind die betreffenden Atome farblich markiert.

Zunächst werden die im Basismodell gewonnenen Bindungsabstände (Abb. 44) der direkten Liganden vorausgesetzt (Abb. 47 A), ebenso wie die Position des Imidazolrings (Abb. 47 D). Um dafür zu sorgen, dass die axiale Symmetrie des Systems nicht verloren geht, muss dafür

gesorgt werden, dass sich die Liganden, wenigstens annähernd, in einer Ebene befinden (Abb. 47 B). Dies wird dadurch erreicht, dass jeweils einem Liganden beim Verlassen der durch die restlichen drei Liganden definierten Ebene eine rücktreibende Kraft zugeordnet wird. Um auch das Cu-Atom daran zu hindern, sich aus dieser gedachten Ebene zu weit zu entfernen, wird mittels eines weiteren Restraints dafür gesorgt, dass es eine rücktreibende Kraft erfährt, wenn es die durch die 4 Liganden definierte, mittlere Ebene verlässt (Abb. 47 C). Bei einer Ligandierung von Stickstoffen, die zum Proteinrückgrat gehören, muß darauf geachtet werden, dass das Rückgrat seine korrekte Geometrie beibehält. Korrekte dihedrale Winkel (Abb. 47 E) von 0° müssen weiterhin eingehalten werden. Da diese Stickstoffe auch bei Ligandierung eines Cu sp^2 -hybridisiert sind, muß auch ein Bindungswinkel von 120° (Abb. 47 F) gegeben sein. Tab. 10 und Abb. 47 fassen alle zusätzlich eingeführten Potentiale noch einmal zusammen. Es wird deutlich, dass das Peptid durchaus vielen Anforderungen genügen muß.

Potential	Gleichgewic hts-wert	Kraftkonstante kJ/mol	Zweck	In Abb. 47
Cu - Histidin N	1.90Å	545	Bindungsabstand (EXAFS)	A
Cu - N	1.92Å	545	Bindungsabstand (EXAFS)	A
Cu - N	1.93Å	545	Bindungsabstand (EXAFS)	A
Cu - O	1.95Å	189	Bindungsabstand (EXAFS)	A
Cu-His-N δ -N ϵ	178°	189	Vielfachstreuung (EXAFS)	D
Dihedral (Cu-N-C α -H)	0°	126	Geometrie des Rückgrats	E
Ebene (N-N-N-O)		419	Symmetrie der Liganden (EPR)	B
Ebene (N-N-N-O-Cu)		210	Kleine Auslenkungen des Cu aus der Ligandenebene müssen möglich sein	C
Cu-N-C/C α	120	142	sp^2 -Hybridisierung	F

Tab. 10: Zusätzlich eingeführte Potentiale, welche die Geometrie des Proteinrückgrats und die Symmetrie des Komplexes gewährleisten.

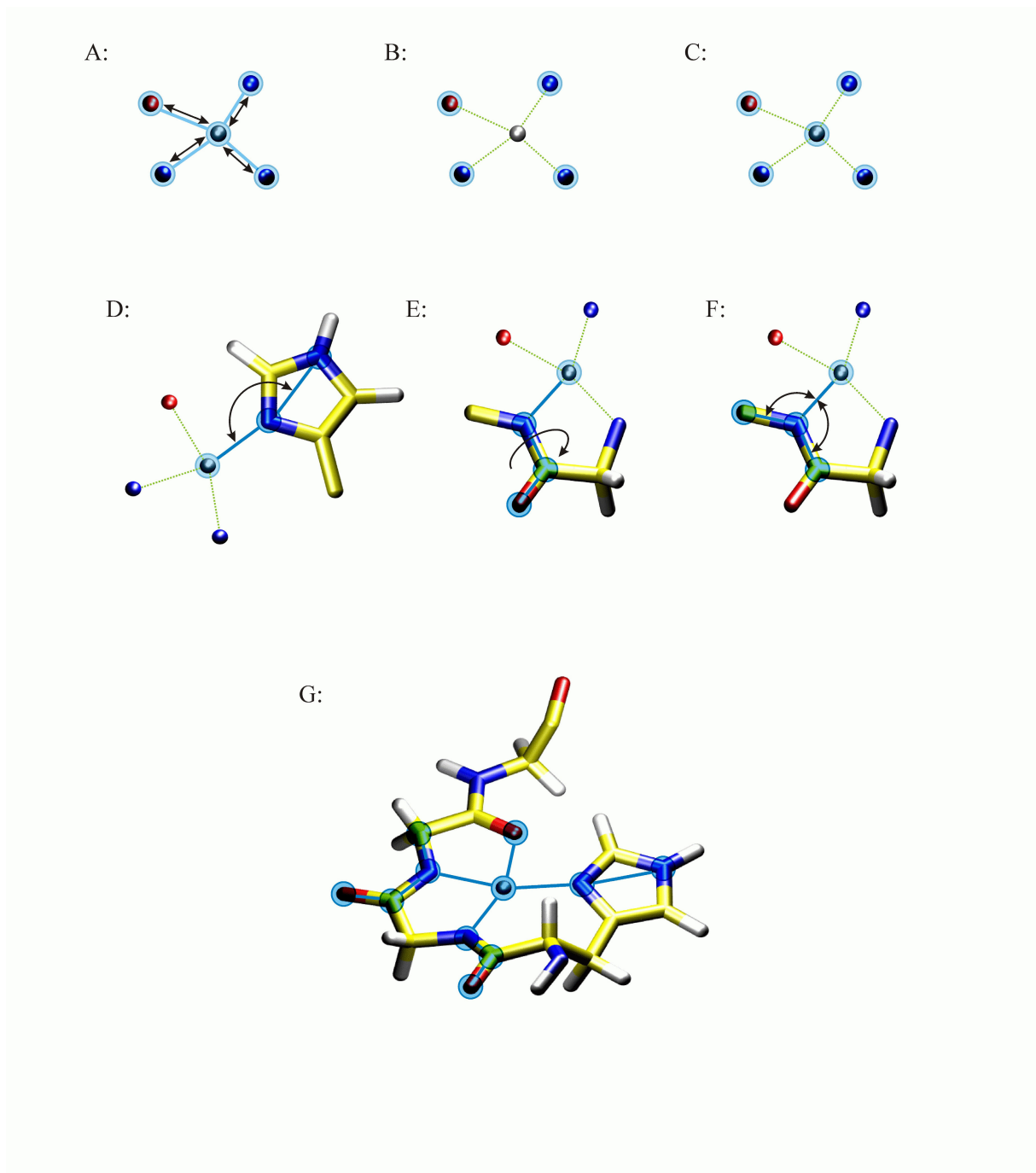


Abb. 47: Alle zur Proteinrückratgeometrie zusätzlich eingeführten Potentiale. A-F: Darstellung der in Tab. 10 angeführten Potentiale. A: Grobe Einschränkung auf die durch EXAFS gewonnenen Abstände; B: Die Liganden müssen in einer Ebene liegen; C: Auch das Cu-Zentrum darf sich nicht zu weit aus der Ebene entfernen; D: EXAFS-Spektren können nur bei korrektem Winkel $\text{Cu-N}_\delta\text{-N}_\epsilon$ wiedergegeben werden; E: Um die partielle Doppelbindung des Proteinrückgrats kann nicht frei gedreht werden; F: Die Bindungorbitale der sp^2 -hybridisierten Stickstoffe geben einen Bindungswinkel von 120° vor; G: Bei gleichzeitiger Darstellung aller Potentiale wird deutlich, wie stark mögliche Geometrien eingeschränkt werden.

Die automatische Generierung verschiedener Konfigurationen hat sich als nicht trivial erwiesen. Großes Augenmerk muss auf den Beginn der „Komplexbildung“ im Computer

gelegt werden. Die Prozedur, mit der das gelingt, ist am Beispiel einer Konfiguration in der Übersicht in Abb. 48 dargestellt.

Um für alle zu untersuchenden Konfigurationen gleiche Startbedingungen zu gewährleisten, muß zunächst von einer Peptidkonfiguration ausgegangen werden, die keine dieser Konfigurationen bevorzugt. Eine lineare Kette aus Aminosäuren scheint dafür geeignet zu sein (Abb. 48 A). Ausgehend von einem bekannten Stickstoffliganden (His N_δ), weiteren 2 unbekanntem aus insgesamt 7 und einem unbekanntem Sauerstoffliganden aus insgesamt 8 möglichen ergeben sich insgesamt 189 mögliche Konfigurationen für den Cu-Peptidkomplex (siehe Kap. 7.2 und Abb. 46). Für jede dieser Konfigurationen muß ein Computermodell generiert werden. Um später Bindungen zwischen dem Zentralatom und den Liganden knüpfen zu können, müssen diese möglichst behutsam an das später zentrale Cu-Atom herangeführt werden. Es ist nicht zweckmäßig, sofort Bindungen zu definieren, denn die Längen dieser Bindungen werden zu Beginn der Simulation um ein Vielfaches ihrer natürlichen Länge überschritten. Auf diese Weise wird sehr viel Energie in das System gebracht. Als Folge davon schießt das Cu-Atom in der darauffolgenden Phase der Energieminimierung auf die Peptidkette zu, und diese kann sich verwickeln, durchdringen oder „explodieren“. Um dieses Problem zu vermeiden, werden zunächst keine Bindungen definiert. Stattdessen werden die Ligandenatome ionisiert. Die Ladung, die den Bindungspartnern gegeben wird, orientiert sich an der Ladung einer zu 100% ionischen Bindung. Für das Prion-Octarepeat bedeutet das:

Bindungspartner	Ladung [e]
Cu	+2
Histidin-N	-0.7
Amid-N	-1.16
O	-0.5

Tab. 11: Ladung Kupferbindungspartner des Octarepeat/Cu-Komplexes zu Beginn der Simulation

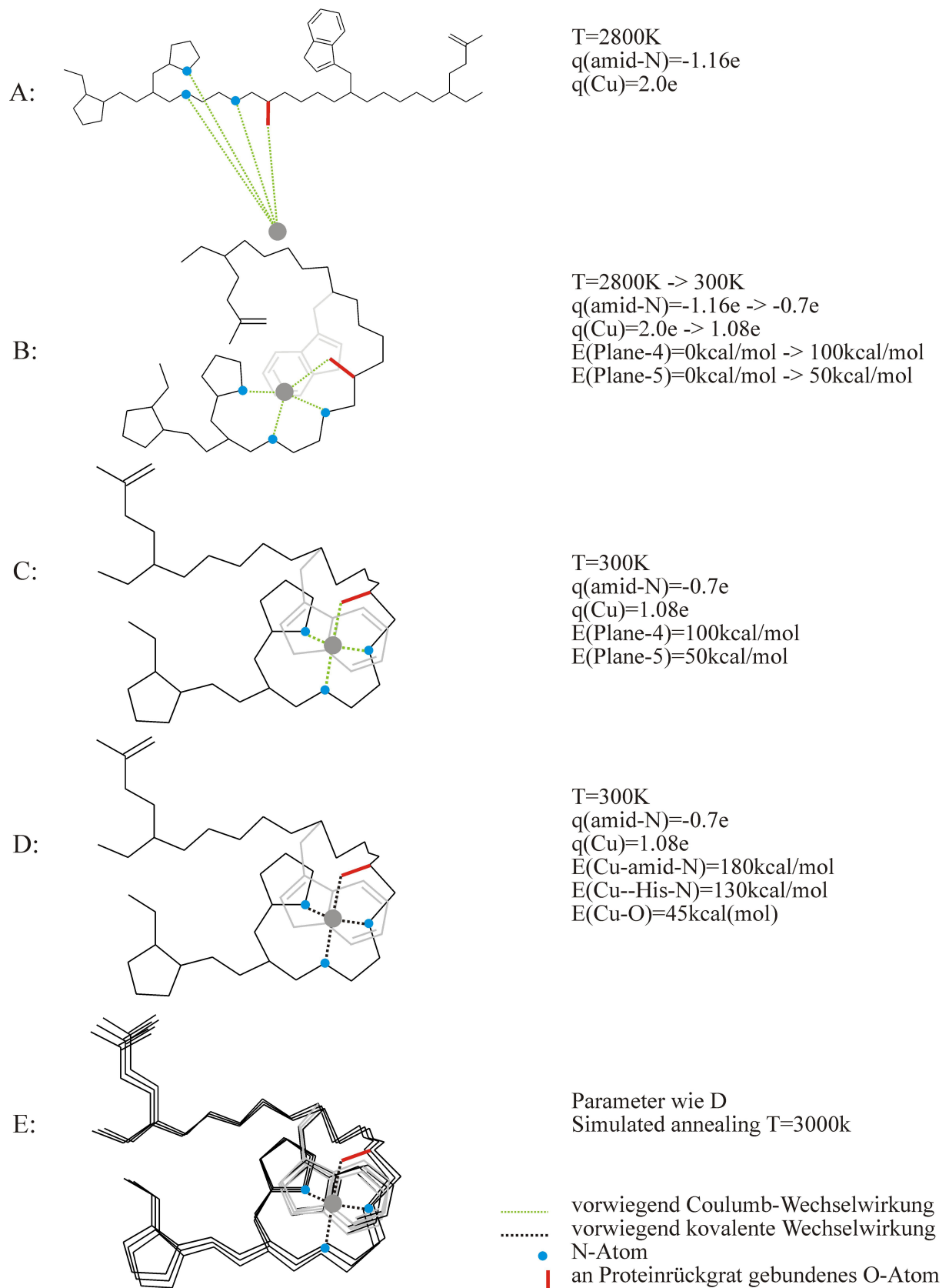


Abb. 48: Dargestellt ist der schematische Ablauf der Modellgeneration exemplarisch für eine der insgesamt 189 möglichen Konfigurationen des Octarepeat/Cu-Komplexes. Die Darstellung des Peptids und des zentralen Cu-Atoms ist nicht maßstabsgerecht.

Aufgrund der langreichweitigen und quadratisch abfallenden Coulombwechselwirkung ist gewährleistet, dass sich zunächst nur kleine Anziehungskräfte aufbauen. In der folgenden Phase der Energieminimierung ist darauf zu achten, dass die Peptidkette bei der Annäherung des Cu-Ions keine inneren Spannungen aufbaut. Um dem Peptid genug Mobilität zu geben, sich umzuorientieren, wird im Zuge der Simulation jedem Atom eine Geschwindigkeit mit zufälliger Richtung gegeben. Die kinetische Energie der Atome würde dann einer Temperatur von 2800K entsprechen. Diese hohe Temperatur wird in 100 Schritten von 2800K auf 300K linear gesenkt (Abb. 48 B).

Während des Temperatursenkungsprozesses werden auch die Ladungen der Bindungspartner auf Normalmaß abgesenkt. Gleichzeitig werden die Kraftkonstanten der dihedralen Winkel Cu-N-C_α-H bei Ligandierung etwaiger Rückgrat-Stickstoffe erhöht. Auch die Kräfte, die die Symmetrie des Komplexes gewährleisten sollen, das sind die zusätzlich eingeführten Ebenenkräfte (siehe Tab. 12 und Tab. 9), sind während des Temperatursenkungsprozesses nicht konstant, sondern sie sind erst 0 und werden dann in 100 Schritten auf 210 bzw. 419 kJ/mol erhöht. Als Ergebnis erhält man ein lose um das Cu-Atom gewundenes Peptid. Die zukünftigen Liganden befinden sich in größtmöglicher Nähe zum Zentralatom (Abb. 48 C).

Kraftkonstante	Anzahl der Einzelschritte	T=2800K (Anfang)	T=300K (Ende)
Temperatur	100	2800	300
Ladung(Cu)	100	+2	+1.08
Ladung(Amid-N)	100	-1.16	-0.7
Dihedral(Cu-N-C _α -H)	100	0	30
Ebene (N-N-N-O)	100	0	100
Ebene (N-N-N-O-Cu)	100	0	50

Tab. 12 Werte der Kraftkonstanten vor und nach dem Temperatursenkungsprozeß

Nach der Temperatursenkung kann die Koordination zwischen Liganden und Zentralatom definiert werden. Das Risiko, artifizielle Strukturen zu generieren, ist durch den oben beschriebenen Prozeß erheblich gesenkt worden (Abb. 48 D). Für die Bildung der Koordination werden zunächst die Gleichgewichtsabstände des Basismodells und die Kraftkonstanten aus Molekülorbitalrechnungen (Siehe Tab. 10), die auch schon für das Basismodell eingesetzt worden sind, verwendet. Es muss erwähnt werden, dass sich die Bindungslängen der Liganden zum zentralen Cu-Ion bei einer Struktur nach dem

Temperatursenkungsprozeß und anschließender Koordination von denen des Basismodells unterscheiden. Bei einer Modellbildung mit einer vollständigen Peptidkette wirken viele zusätzlichen Kräfte auf die ersten Liganden. Naturgemäß können die Kräfte der Peptidkette selbst nicht mit einem Basismodell wiedergegeben werden, aber auch die Ladungsverteilung ist anders. Es gibt viel mehr partiell geladene Teilchen in der Nähe des Cu-Atoms bei Rechnungen mit einer vollständigen Peptidkette.

Weil sich die aus EXAFS gewonnenen Gleichgewichtsabstände bei Rechnungen mit vollständiger Peptidkette verschieben, muß eine Simulated-Annealing-Prozedur angewendet werden, um die mit EXAFS gemessenen Bindungsabstände wiederherzustellen. Dabei werden die Gleichgewichtslängen in einem iterativen Prozeß leicht verschoben, sodass die mittleren Ligandenbindungsängen nach dem Simulated-Annealing-Verfahren wieder gleich der Bindungsängen des Basismodells sind.

Die Streuung der Bindungsängen um einen Mittelwert kann gesteuert werden, indem die zugehörigen Kraftkonstanten modifiziert werden. Grundsätzlich hat man sich an die Kraftkonstanten der quantenmechanischen Moleküldynamikrechnungen zu halten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist eine Modifikation dieser Konstanten nicht notwendig gewesen. Aber bei den Parametern, welche die Symmetrie fixieren, muss eine gewisse Flexibilität gewährleistet sein.

Für jede Peptidkonfiguration gibt es verschiedene Konformationen. Ausgehend von der ersten Struktur einer Konformation, die durch oben genanntes Verfahren erzeugt worden ist, werden durch eine Simulated-Annealing-Prozedur weitere mögliche Konformationen errechnet. Ziel dieser Rechnungen ist es, mehrere Peptidstrukturen gleicher Konfiguration zu erzeugen, die ähnliche, aber nicht gleiche Parameter aufweisen. Auf diese Weise ergeben sich Strukturen, die leicht unterschiedliche Bindungsängen und Winkel aufweisen. Konkret sind in diesem Fall für jede der 189 unterschiedlichen Konfigurationen 1200 unterschiedliche Konformationen berechnet worden.

7.3 Auswahl der mit den Messungen kompatiblen Konfigurationen

Ein großer Teil der berechneten 226800 Peptid/Cu-Strukturen ist mit den in Tab. 10 gezeigten Geometrien für die Cu-Komplexierung nicht vereinbar. Die Potentiale, die die Cu-Komplexierung beschreiben sind im Vergleich zu denen, die die Geometrie des

Proteinrückgrats definieren relativ klein. Es kommt daher zu einer relativ großen Streuung der Komplexgeometrien um die in Tab. 10 geforderten Werte. Deshalb müssen die mittels Simulated Annealing berechneten Komplexe auf Übereinstimmung mit geforderten Geometrien überprüft werden. Die zu einer Konfiguration gehörenden Spektren weisen eine Gaußverteilung bezüglich ihrer Energie auf. Nur solche Spektren, deren Energie niedriger als die Durchschnittsenergie der betreffenden Konfiguration ist, werden im Folgenden betrachtet. Darüber hinaus werden alle Strukturen ausgeschlossen, bei denen Atome näher als 2.3 Å am Cu zu liegen kommen, direkte Cu-Liganden ausgenommen. Weiters darf sich keiner der direkten Liganden weiter als 10° aus der mittleren Ligandenebene entfernen, und der Winkel Cu-N_δ-N_ε (Abb. 47 D) muß sich im Intervall 190°-210° befinden.

513 Strukturen von insgesamt 226800 genügen diesen Bedingungen, sie gehören zu insgesamt 19 unterschiedlichen Konfigurationen. Für diese Strukturen wurden EXAFS-Spektren berechnet. Dafür stehen jetzt vollständige Peptidstrukturen zur Verfügung, es können also auch Vielfachstreubeiträge berücksichtigt werden, und zwar nicht nur innerhalb einer Aminosäure, sondern auch zwischen einzelnen Aminosäuren. Vielfachstreubeiträge hängen stark von der Geometrie von Atomen in der zweiten und dritten Koordinationsschale ab. Ein Konfigurationswechsel resultiert daher in starken Veränderungen des EXAFS-Signals, auch wenn die Abstände der ersten Liganden gleich bleiben. Insgesamt 6 der 19 Konfigurationen sind nach Analyse der Vielfachstreubeiträge mit dem gemessenen Spektrum kompatibel. Diese Konfigurationen sind in Tab. 13 dargestellt.

Nr.	Konfiguration	Nr.	Konfiguration
1	His2Nd-Gly3N-Gly4N-Gly4O	4	His2Nd-His2N-Gly4N-Gly7O
2	His2Nd-Gly3N-Trp6N-Trp6O	5	His2Nd-Gly7N-Gly8N-Gly8O
3	His2Nd-Gly5N-Trp6N-Trp6O	6	His2Nd-Gly3N-Gly8N-Gly8O

Tab. 13: Die nach Analyse der EXAFS-Vielfachstreubeiträge mit dem experimentellen EXAFS-Spektrum kompatiblen Konfigurationen.

Die in Tab. 13 angegebenen Konfigurationen wurden bezüglich ihrer Protonenlagen mit den gemessenen ENDOR-Spektren verglichen. Drei dieser sechs Konfigurationen zeigen Linienlagen, die mit den gemessenen Spektren inkompatibel sind. Weitere drei Konfigurationen sind kompatibel mit den gemessenen ENDOR-Spektren. Die Konfiguration His2Nd-Gly3N-Gly4N-Gly4O ist dabei besonders hervorzuheben, sie zeigt die beste Anpassung an die gemessenen EXAFS-Spektren. Abb. 49 zeigt diese Anpassung. Besonders

im Vergleich zu den sonst üblichen Anpassungen, die lediglich auf Einfachstreubeiträgen basieren, stellt sie eine signifikante Verbesserung dar.

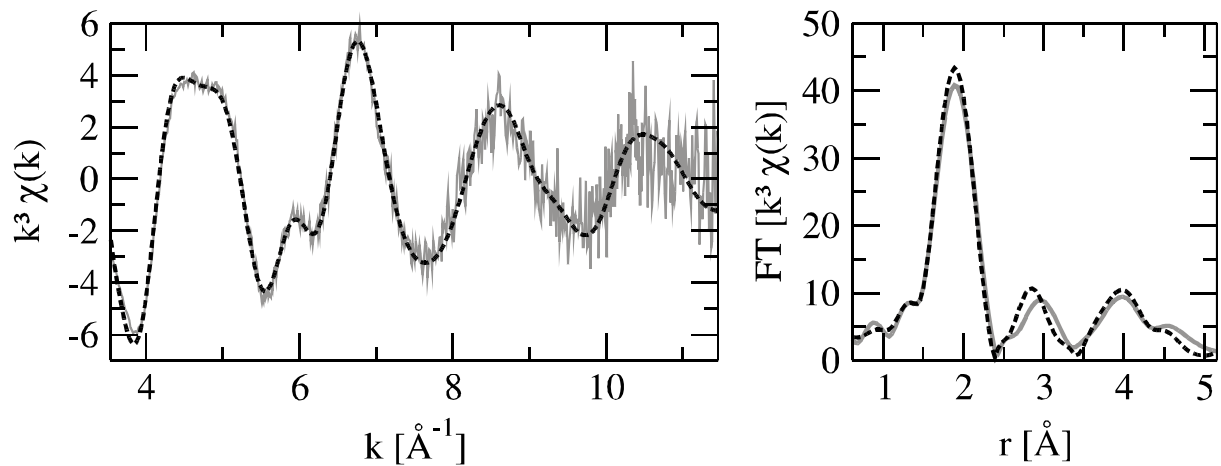


Abb. 49: EXAFS-Spektrum (grau, durchgezogen) der Probe 102.1 (Octarepeat in H_2O und NEM) und Anpassung des Spektrums (schwarz, gestrichelt) basierend auf einer Struktur mit der Konfiguration His2Nd-Gly3N-Gly4N-Gly4O. Auch Feinheiten des Spektrums können wiedergegeben werden.

Für diese Konfiguration ist auch eine Simulation von ENDOR-Spektren erstellt worden. Die Spektren aller neun Arbeitspunkte müssen mit einem einzigen Satz von Protonpositionen möglichst gut wiedergegeben werden. In Abb. 50 sind die simulierten ENDOR-Spektren zur Konfiguration His2Nd-Gly3N-Gly4N-Gly4O gezeigt.

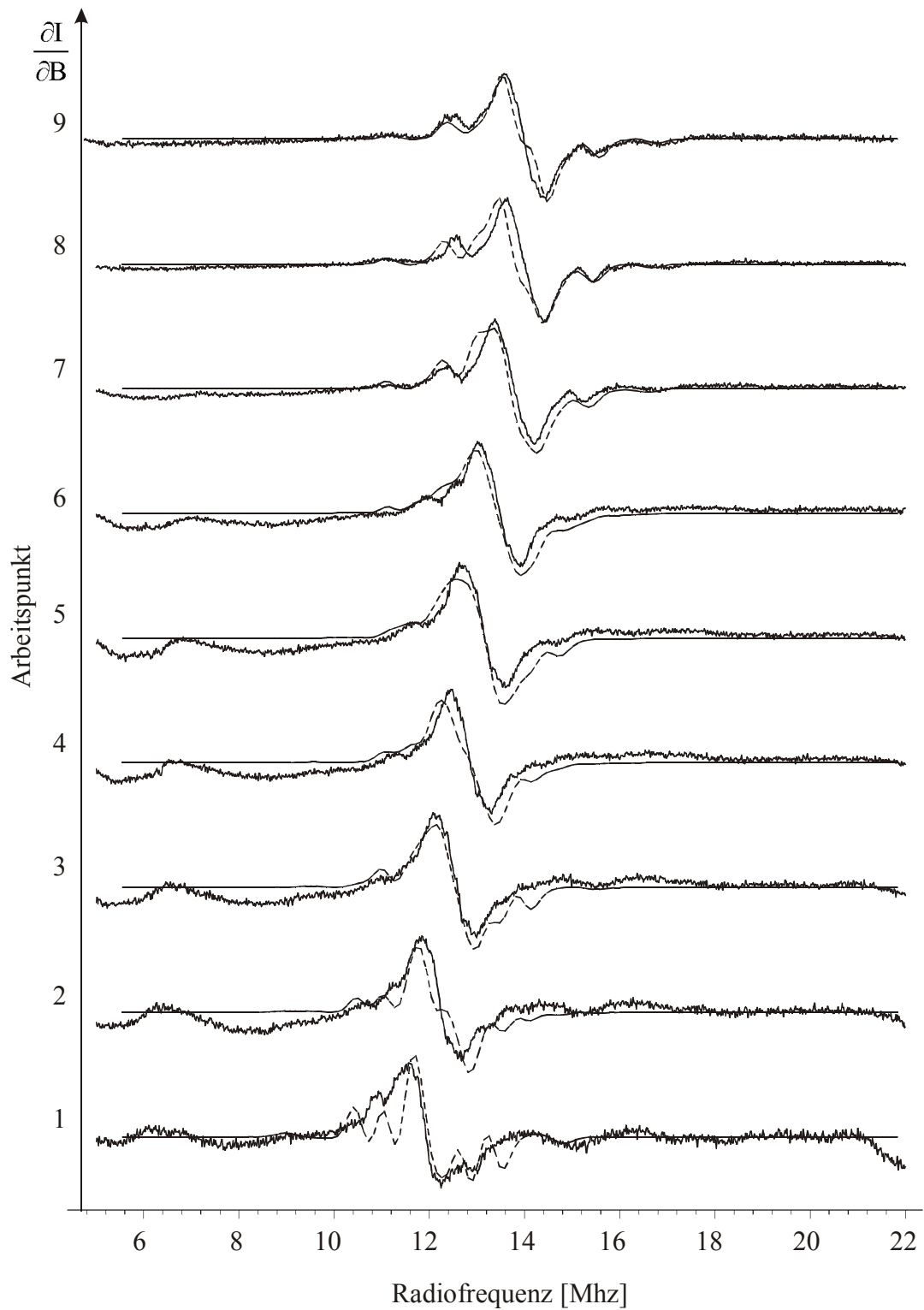


Abb. 50: Simulierte ENDOR Spektren auf Basis der Konfiguration His2Nd-Gly3N-Gly4N-Gly4O. Alle Spektren basieren auf demselben Satz von Protonen. Die Ziffern bezeichnen die zugehörigen Arbeitspunkte (Tab. 7).

In Abb. 51 ist die Struktur dargestellt, auf der die Spektren in Abb. 50 und Abb. 49 basieren. Das Cu wird von 3N und 1O planar koordiniert. Die Liganden sind His2Nd-Gly3N-Gly4N-Gly4O. Ein H₂O Molekül bildet einen schwachen Liganden in axialer Position. Das Kupfer ist also fünffach koordiniert. Die Seitenkette des Tryptophan befindet sich in unmittelbarer Nähe zum Cu-Zentrum.

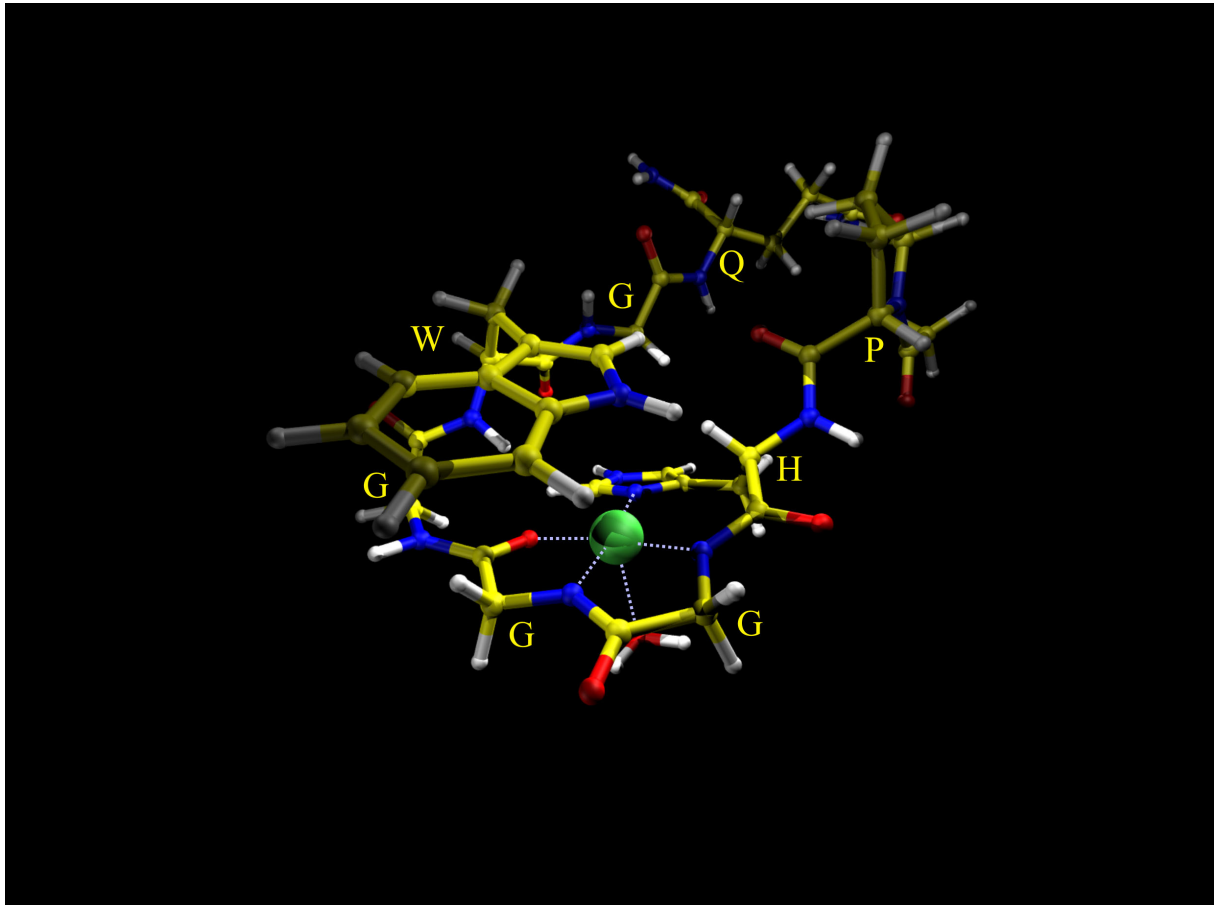


Abb. 51: Die Struktur des Octarepeat/Cu-Komplexes des Prion-Protein in NEM (Mentler et al. 2004). Es koordinieren das N_δ des His-Imidazolrings, die Rückgratstickstoffe der Residuen Gly3 und Gly4 und das Carbonylsauerstoffatom von Gly4. Diese Liganden befinden sich in einer Ebene. Den fünften Liganden bildet ein axiales Wassermolekül. Die Seitenkette des Trp6 befindet sich in unmittelbarer Nähe zum Cu-Atom.

8 Diskussion

8.1 Strukturbestimmung des Prion-Protein-Octarepeats in NEM

Für die Strukturbestimmung von Proteinen stehen im Wesentlichen die Methoden der Röntgenstrukturanalyse und die Methode der NMR-Strukturbestimmung zur Verfügung. Letztere ist die wichtigste Methode Strukturinformationen zu gewinnen, wenn kein Proteinkristall zur Verfügung steht (Wüthrich 2003). Sie beruht auf der Kombination von experimentell bestimmten Atomabständen und moleküldynamischen Simulationen, welche mittels der Informationen über Standardbindungsängen und Standardbindungswinkeln in Proteinen die Strukturbestimmung erst möglich macht. Computergestützte Simulated-Annealing-Verfahren werden verwendet, um das komplexe System aus Abstandsinformationen und Kraftfeldparametern so zu optimieren, dass am Ende eine dreidimensionale Struktur des Proteins entsteht. Besondere Schwierigkeiten ergeben sich dabei, wenn Proteine paramagnetische Metallzentren aufweisen. Abstandsinformationen, Basis der Moleküldynamischen Rechnungen, sind dann etwa in einem Radius von 7Å nicht mehr ohne weiteres gegeben. Für die Strukturbestimmung bedeutet das, dass ein blinder Fleck von 7Å Radius entsteht. Daher besteht ein Bedarf an alternativen Verfahren, um Protein- oder Peptidstrukturen in diesen Bereichen zu klären. Im Zuge dieser Arbeit sind verschiedene Methoden verwendet worden, um diese fehlenden Informationen zu ersetzen. Bezüglich reiner Abstandsinformationen sind das die EXAFS-Spektroskopie. ENDOR ermittelt neben Abständen von Protonen auch deren Lage relativ zur Molekülachse. Aufgrund der unterschiedlichen Natur der Abstandsinformationen war es notwendig auch eine neuartige Strategie für die Simulated-Annealing-Computeroptimierung zu entwickeln. Eine rein quantenmechanische Berechnung der Cu-Komplexierung am Prion-Protein-Octarepeat ist nicht möglich, da nicht soviel Rechenzeit zur Verfügung steht. Daher wird das Programm XPLOR, das auch zum Refinement von Röntgenstrukturdaten eingesetzt wird, verwendet, wobei Potentiale aus quantenmechanischen Rechnungen kleinerer Komplexe zum Einsatz kommen, die für den Einsatz in XPLOR parametrisiert werden.

Das Prion-Protein Octarepeat in NEM: Als Basis für die Berechnungen dienen Informationen über Art und Geometrie der Liganden. Die Atomarten der direkten Liganden wurden mittels EPR-Spektroskopie am Prion-Protein-Octarepeat (Kap. 5.1) und an kürzeren Peptidfragmenten (Miura et al. 1999; Aronoff-Spencer et al. 2000) bestimmt. Speziell bei dem auch von uns verwendeten pH-Wert von 7.15 gibt es wenig Zweifel daran, dass die das

Kupfer koordinierenden Atome 3N und 1O sind. Eine solche Ligandierung ist auch in Übereinstimmung mit Peisach-Blumberg Korrelationen (Peisach und Blumberg 1974).

Die Anordnung der das Cu koordinierenden Atome in einer Ebene ist eine weitere wesentliche Eigenschaft des Komplexes. Informationen darüber erhält man aus der Linienform des EPR Spektrums. Sie spricht für einen planaren Komplex mit axialer Symmetrie. Auch EXAFS Spektren favorisieren eine planare Umgebung. Der große Anteil der Vielfachstreuung am Spektrum der Probe 102.1 (Octarepeat in H₂O und NEM) kann nur durch 180°-Winkel zwischen Vielfachstreuungswegen zustande kommen. Das ist der Fall wenn Atome kollinear angeordnet sind, so wie in Abb. 23 dargestellt. Diese Bedingung kann nur bei planar angeordneten Liganden optimal erfüllt sein. Voll quantenmechanische Computersimulationen des Pentapeptids sind im Einklang mit dieser Annahme (Pushie und Rauk 2003).

Weiters ist bei der Berechnung der unterschiedlichen Konfigurationen vorausgesetzt worden, dass immer nur ein Histidin an das Cu koordiniert. Dies wird durch einige Publikationen gestützt. Zunächst gilt als sicher, dass His die am höchsten affine Bindungsstelle für das Cu-Atom besitzt, da die Stickstoffe des Imidazolrings am frühesten deprotonieren. Die Ligandierung eines His ist mit ESEEM- und EXAFS-Spektroskopie nachgewiesen worden (Aronoff-Spencer et al. 2000; Van Doorslaer et al. 2001). ESEEM-Experimente sprechen aufgrund der geringen Intensität der Signale bei 1.0 und 1.6 MHz (Abb. 33) eher für nur ein ligandierendes His pro Cu. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch EPR Titrationsexperimente (Aronoff-Spencer et al. 2000), die bis hin zu einem Cu-Komplex-Verhältnis von 1:1 eine lineare Zunahme der Intensität des EPR-Spektrums (doppeltes Integral des gemessenen Spektrums) feststellen. Daraus kann man schließen, dass es zu keiner Cu-His-Cu-Doppelkomplexbildung kommt, wie in Abb. 53 dargestellt. Bei einem solchen Komplex würde Spin-Spin-Austauschwechselwirkung zwischen den beiden Elektronenspins einsetzen. Ein einfacher linearer Zusammenhang zwischen Cu-Komplex-Konzentration und EPR-Signalintensität wäre dann nicht mehr gegeben.

Aus Raman-spektroskopischen Messungen geht hervor, dass nur das N_δ im Imidazolring des His für die Ligandierung am Kupfer in Frage kommt (Miura et al. 1996b; Miura et al. 1999). Die Röntgenstrukturanalyse am Pentapeptid HGGGW (Burns et al. 2002) ist im Einklang mit diesen Messungen. Damit ist ein Cu-Ligand eindeutig identifiziert. Das schränkt die Anzahl

der möglichen Konfigurationen erheblich ein. Die Untersuchung einer deuterierten Probe im Zuge dieser Arbeit liefert den eindeutigen Nachweis für ein axial ligandierendes H₂O. Austauschende Protonen in der Ebene der starken Liganden können nicht festgestellt werden (Abb. 32). Mit den hier vorgestellten Randbedingungen und mit Hilfe der in Kap. 7 vorgestellten Methode wurde für das Peptid Ac-PHGGGGWGQ-NH₂ die in Abb. 51 vorgestellte Struktur berechnet.

8.2 Vergleich mit Modellen aus der Literatur

Was die Kupfer-Komplexierung im Octarepeat in NEM betrifft, sind bereits einige Hypothesen veröffentlicht.

Referenz	Puffer	Peptide	Methoden
Stöckel et al.(1998)	NaAcetat (pH 4 und 5),MES MOPS (pH 6)	PrP (29-231); PrP (57-91); PrP (73-91)	CD, Fluoreszenz (Trp) Gleichgewichtsdialyse, Hitze-Denaturierung
Luczkowski et al. (2002)	---	PHGGGGWGQ, PHGGGGWQ	CD, pH Titration, NMR
Viles et al.(1999)	NEM	PrP(51-75), PrP(73-91), PrP(66-91), PrP(58-91)	EPR, CD, NMR
Aronoff-Spencer et al.(2000)	NEM	PrP(57-91), PrP(23-28, 57-91) PrP(23-28, 57-91 W → X) PrP(73-91) PrP(23-28, 73-91) PrP(73-80) PHGGGGWGQ CQPHGGGW CQPHGGG HGGGWG HGGGW HGGG HGG	CD, ESEEM, S-band EPR, X-Band EPR
Burns et al. (2003)	NEM	PrP(29-231) PrP(90-231) PrP(23-28,57-98) PrP(23-28,57-91) PrP(90-116) PrP(90-101) PrP(106-116) PrP(92-96)	CD, ESEEM, S-band EPR, X-Band EPR
Mentler et al. (2004)	NEM	PHGGGGWGQ	CD, NMR, ESEEM, EXAFS, ENDOR, EPR (X-Band)

Tab. 14: Übersicht über bereits veröffentlichte Modellvorschläge. Neben der Publikation (erste Spalte) sind auch die verwendeten Puffersysteme (zweite Spalte) und Methoden (vierte Spalte) angegeben. Die dritte Spalte gibt an welche Peptide untersucht wurden. Sie werden entweder explizit genannt, oder der untersuchte Ausschnitt aus dem Prion-Protein ist in Klammern definiert.

Tab. 14 gibt einen Überblick über die in der Literatur bereits vorhandenen Arbeiten, die im Folgenden diskutiert werden.

Die Untersuchungen von **Stöckel et al. (1998)** beruhen auf den Peptiden PrP (29-231), PrP (57-91) und PrP (73-91). Die Zahlen in Klammern geben den untersuchten Ausschnitt aus dem Prion-Protein an (Abb. 2). Im dem Modell wird das Kupfer von zwei Histidin-Imidazolringen koordiniert, die von zwei unterschiedlichen Octarepeats stammen. Die Stickstoffatome der Imidazolringe befinden sich in einer Ebene mit zwei Carbonyl-Sauerstoffatomen. Das Modell ist in Abb. 52 dargestellt. Mit Ausnahme eines Imidazol-Stickstoffatoms treten, verglichen mit der Struktur, die in dieser Arbeit vorgestellt wurde, vollständig andere Liganden auf. Über die Geometrie der Koordinierung, ob planar oder tetraedrisch, werden keine Aussagen gemacht.

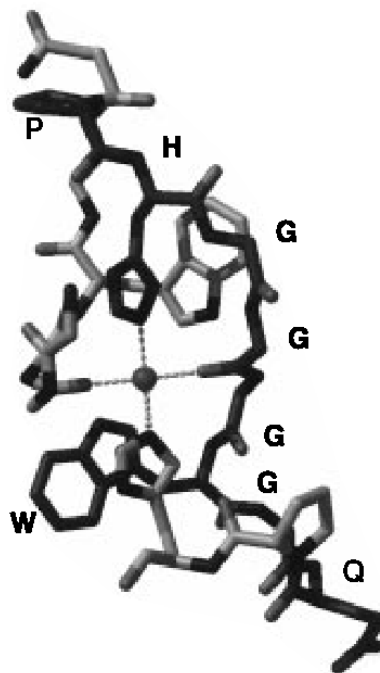


Abb. 52: Modell nach Stöckel et al. (1998). Cu wird von zwei Histidin-Imidazolringen unterschiedlicher Octarepeats koordiniert. Außerdem ligandieren zwei Carbonyl-Sauerstoffatome, die Koordinierung besteht aus 2N und 2O.

Eine derartige Ligandierung ist aus mehreren Gründen unwahrscheinlich. Zunächst setzt sie eine Koordinierung von 2N2O voraus und widerspricht damit den Peisach-Blumberg-Korrelationen. Außerdem widerspricht sie EPR-Titrationsexperimenten von Aronoff-Spencer et al. (2000), bei denen ein Peptid/Cu-Konzentrationsverhältnis von 1:1 ohne Cu-Cu-Doppelkomplexbildung nachgewiesen werden kann. Darüber hinaus ist das Modell nicht im Einklang mit den ESEEM-Messungen von Aronoff-Spencer et al. (2000) und dieser Arbeit, welche nur einen His-Liganden pro Kupfer unterstützen.

Die Arbeiten von **Viles et al. (1999)** basieren hauptsächlich auf Peptiden der Form PrP(51–75), PrP(73–91), PrP(66–91) und PrP(58–91). In dem Modell bilden die His-Imidazolringe eine Brücke von einem Kupfer zum nächsten. Auf diese Weise bildet sich ein $(\text{Cu-OCTA})_4$ -Komplex. Die Amidstickstoffe des His bilden den dritten Stickstoffliganden, ein von einem Wassermolekül stammendes Sauerstoffatom ist der vierte Ligand. Wieder besteht das Modell, mit Ausnahme des N_δ des Imidazolrings, aus vollständig anderen Liganden als die Struktur in dieser Arbeit.

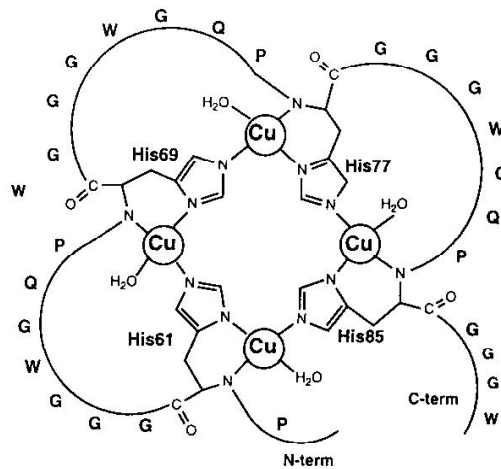


Abb. 53: Modell nach Viles et al. (1999): Je zwei Cu-Atome werden über His-Imidazolringe verbrückt. Der Amidstickstoff des His und ein Wassermolekül bilden den dritten und vierten Liganden. Es bildet sich ein $(\text{Cu-OCTA})_4$ -Komplex.

Aufgrund der $(\text{Cu-OCTA})_4$ -Komplex Formation kann ein Octapeptid/Cu-Verhältnis von 1:1 eingehalten werden. Das Modell ist in Abb. 53 dargestellt. Die eigenen Berechnungen ergaben, dass die Konfiguration sterisch möglich ist, und zwar auch dann, wenn gefordert wird, dass die 4 Liganden sich planar anordnen. Allerdings kann ein planarer H_2O -Ligand durch unsere ENDOR-Messungen ausgeschlossen werden, da der Vergleich der deuterierten Octapeptidprobe (117.2) mit der nicht-deuterierten (102.1) bei einem B-Feld, welches planare Protonen bevorzugt darstellt ($B=328.3\text{mT}$), keine signifikanten Unterschiede aufweist. Außerdem widerspricht dieses Modell, wenn man wieder mit Aronoff-Spencer (2000) und Van Doorslaer (2001) vergleicht, den Ergebnissen der ESEEM-Spektroskopie. Die Arbeit von Viles et al. (1999) liegt Experimenten zugrunde, die nicht an einzelnen Octarepeats, sondern an längeren Peptiden ausgeführt worden ist. Möglicherweise resultieren daraus auch die unterschiedlichen Ergebnisse.

Aronoff-Spencer et al. (2000) haben ein Bindungsmodell veröffentlicht, welches hauptsächlich auf EPR- und CD-Spektroskopie basiert (Abb. 54). Untersucht wurden mehrere Peptidfragmente (PrP(57-91), PrP(23-28, 57-91) PrP(73-91) PrP(23-28, 73-91) PrP(73-80) PHGGGWGQ CQPHGGGW, CQPHGGG, HGGGWG, HGGGW, HGGG, HGGG), darunter auch das Prion-Protein Octarepeat (PHGGGWGQ). Da ebenfalls NEM als Puffer verwendet wurde, ist diese Probe identisch mit der Probe 102.1 (Octarepeat in H₂O und NEM) in dieser Arbeit. Die erste Koordinationsschale besteht im Modell von Aronoff-Spencer et al. (2000) aus drei Stickstoff- und einem Sauerstoffatom. Diese Ligandierung wird von S-Band und X-Band EPR-Messungen bestätigt. Das Kupfer wird ligandiert vom δ -Stickstoff des Imidazolrings und den Rückgratstickstoffen von Gly3 und Gly4. Soweit stimmt das Modell mit der in dieser Arbeit vorgestellten Struktur überein. Im Gegensatz zu unserer Struktur, bei der der Carbonylsauerstoff des Gly4 koordiniert, ligandiert bei Aronoff-Spencer et al. (2000) der Carbonylsauerstoff des Trp6. Das Modell ist in Abb. 54 dargestellt.

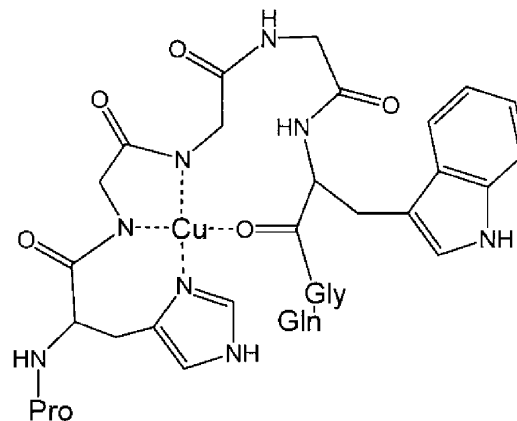


Abb. 54: Modell nach Aronoff-Spencer et al. (2000): Es ligandieren das N_δ des Imidazolrings, die Rückgratstickstoffe des Gly3 und Gly4 und der Carbonylsauerstoff des Trp6, also insgesamt 3N und 1O.

Da in diesem Modell der Carbonylsauerstoff des Trp6 den vierten planaren Liganden bildet, ergibt sich eine Geometrie, bei der die Trp6-Seitenkette vom Komplex wegzeigt. Dies ist nicht in Übereinstimmung mit Fluoreszenzmessungen. (Hornshaw et al. 1995; Stöckel et al. 1998). Es widerspricht auch NMR-spektroskopischen Untersuchungen, bei denen aus verbreiterten Trp6-Linien ein geringer Abstand zum paramagnetischen Zentrum gefolgert wird (Luczkowski et al. 2002). Bei der Struktur der vorliegenden Arbeit ist der geforderte geringe Abstand der Trp6 Seitenkette zum Kupfer problemlos möglich. Der vierte Ligand, das Gly4 Carbonyl-Sauerstoff-Atom, ermöglicht es der Trp-Seitenkette sich in unmittelbarer

Nähe zum Cu aufzuhalten, ohne dass das Proteinrückgrat Spannungen ausgesetzt wird. Im Zuge unserer kombinatorischen Modellrechnungen ist das Modell von Aronoff-Spencer et al. (2000) näher untersucht worden. Im Vergleich zu unserer Struktur weist es relativ hohe Energien in den Bindungswinkeln auf. Diese Konfiguration ist daher aufgrund der Auswahlkriterien in Kap. 7.3 ausgeschlossen worden.

Es existiert auch ein auf NMR-Spektroskopie basierender Strukturvorschlag von **Luczkowski et al. (2002)**. Untersucht wurde das Prion-Protein-Octarepeat und das um das C-Terminale Gln verkürzte Peptid in Lösung (PHGGGWGQ, PHGGGWG). In diesem Modell koordinieren nicht fünf sondern sechs Atome das Kupfer. Stickstoffliganden werden vom His N_δ, und den Rückgratstickstoffen des Gly3 und des Gly4 gebildet. Drei weitere H₂O-Moleküle ligandieren das Cu, zwei in planarer und eins in axialer Position.

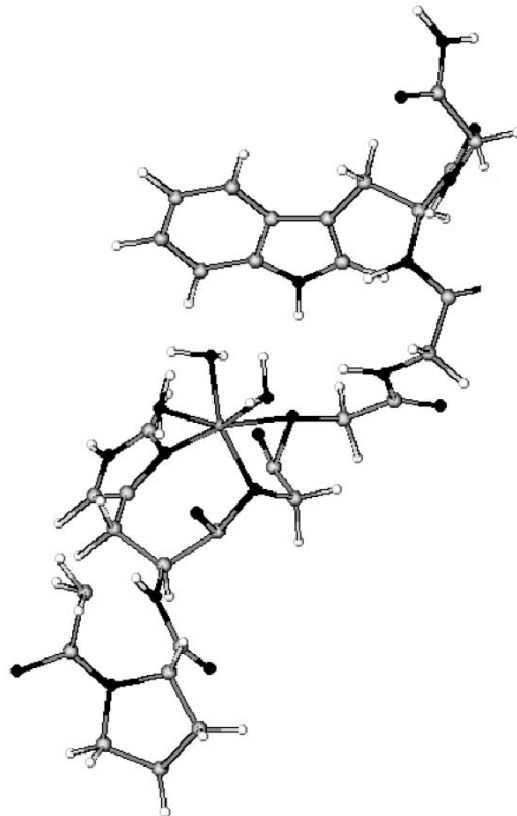


Abb. 55: NMR-Struktur nach Luczkowski et al. (2002): Das Cu wird von 6 Atomen koordiniert. N_δ und die Rückgratstickstoffe des Gly3 und des Gly4 bilden die Stickstoffliganden, drei H₂O-Moleküle ligandieren das Cu, zwei in planarer und eins in axialer Position. Der Komplex hat tetragonale Geometrie.

Abb. 55 zeigt den Strukturvorschlag. Die drei Stickstoffliganden entsprechen denen in unserer Struktur, aber der Stickstoff des Imidazolrings ist nicht planar, sondern axial koordiniert. Der Komplex hat tetragonale Geometrie. Die Trp6-Seitenkette ist nahe am Cu-Zentrum

positioniert, ähnlich wie bei unserer Struktur. Der Strukturvorschlag von Luczkowski et al. (2002) ist nicht kompatibel mit EPR-Messungen, die für eine planare Koordination von 3N und 1O sprechen (Aronoff-Spencer et al. 2000, diese Arbeit). Außerdem kann mit Hilfe unserer ENDOR-Messungen ausgeschlossen werden, dass planar zwei H₂O-Moleküle ligandieren, denn beide Proben, deuterierte (117.2) und nicht-deuterierte (102.1), zeigen dieselben ENDOR-Resonanzen bei der relevanten Feldposition von 328.3mT (Arbeitspunkt 8). Ein Grund für die Diskrepanz zwischen unseren Messergebnissen und denen von Luczkowski et al. (2002) könnte sein, dass letztere in Abwesenheit von NEM oder ähnlichen Puffern ausgeführt wurden. (Information aus privater Konversation). Unserer Erfahrung nach spielt dies eine ganz erhebliche Rolle (Kap. 5.1, Tab. 6).

Eine 3N1O Ligandierung tritt auch in der Kristallstruktur des Pentapeptid-Komplexes HGGGW/Cu von **Burns et al. (2002)** auf. Sie ist in Abb. 56 dargestellt.

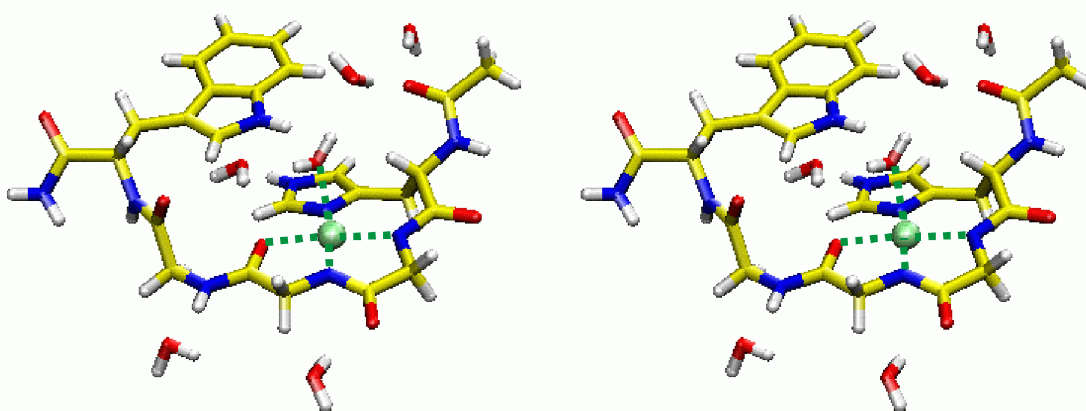


Abb. 56: Stereobild der Kristallstruktur des Pentapeptids HGGGW (Burns et al. 2002): N₈ des Imidazolrings und die Rückgrat-Stickstoffe von Gly3 und Gly4 bilden planare Stickstoffliganden, vierter Ligand ist der Carbonylsauerstoff des Gly4. Axial koordiniert ein H₂O. Es wird durch eine Wasserstoffbrückenbindung zur Trp-Seitenkette stabilisiert.

Das Cu-Zentrum ist mit geringer Abweichung planar koordiniert. Das N₈ des Imidazolrings und die beiden Rückgrat-Stickstoffe von Gly3 und Gly4 bilden die planaren Stickstoffliganden. Der vierte planare Ligand ist der Carbonylsauerstoff des Gly4. In axialer Position wird das Cu von einem Wassermolekül koordiniert. Dieses wird zusätzlich vom

Indol der Seitenkette des Trp6 stabilisiert. Diese Art der Ligandierung entspricht unserem Modell. Ein Vergleich unserer Struktur mit der Kristallstruktur des Pentapeptid-Komplexes zeigt vor allem in planarer Position große Übereinstimmung, auch die Konformation der His2-Ligandierung ist dieselbe. Die Seitenkette des Trp6 ist in unserer Struktur allerdings um 180° geklappt, ein Effekt, der davon herrühren könnte, dass unsere Struktur in Lösung gemessen worden ist. Außerdem basiert die vorliegende Arbeit auf einer längeren Peptidkette, was natürlich ebenfalls zu einer veränderten Komplexierung des Cu führen kann.

Morante et al. (2003) haben EXAFS eingesetzt, um die Bindungsgeometrie eines KKRPKPWGQPHGGGWGQ-Cu-Komplexes zu untersuchen. Das Peptid wurde im die Aminosäuren KKRPKPWGQ verlängert, um die Löslichkeit zu erhöhen. Die Autoren verwenden als Grundlage ihres Strukturrefinements aber bereits die Kristallstruktur von Burns et al. (2002) (Abb. 56), es wird lediglich eine lokale Optimierung der Cu-Liganden-Bindungsabstände vorgenommen. Dadurch sind die verschiedenen Möglichkeiten der Komplexbildung bereits in unzulässiger Weise eingeschränkt. Die Tatsache, dass auch das EXAFS-Spektrum von Morante et al. (2003) anders aussieht, lässt auf einen Einfluß der zusätzlich vorhandenen Aminosäuren KKRPKPWGQ schließen.

8.3 Struktur des Octarepeats in DPC-Micellen

Die EPR-Spektren der dominanten Spezies der Octarepeat/Cu-Komplexe in DPC-Micellen sind denen in NEM sehr ähnlich. Dieser Umstand ist bemerkenswert, da Spektren derartiger Komplexe in unterschiedlichen Lösungsmitteln teilweise erheblich voneinander abweichen (Abb. 26). Man kann also davon ausgehen, dass DPC-Micellen denselben Komplex stabilisieren wie NEM oder ähnliche Puffersysteme, allerdings in deutlich realitätsnäherer Umgebung.

In den EPR-Spektren von Komplexen in DPC-Micellen ist deutlich eine zweite Spezies sichtbar, deren Intensität ist allerdings wesentlich geringer. Daraus kann geschlossen werden, dass ihre Konzentration in der Probe ebenfalls wesentlich geringer ist, da zusätzliche Relaxationseffekte, welche die Intensität dieser Spezies weiter beeinflussen könnten, unwahrscheinlich sind. Die aufgenommenen Spektren geben darauf jedenfalls keinen Hinweis. Dennoch muß erwähnt werden, dass die Natur dieser zweiten Spezies und deren Herkunft weiter ungeklärt sind.

Aufgrund der erheblichen Intensitätsunterschiede der ersten und der zweiten Spezies in EPR-Spektren kann man davon ausgehen, dass die gemessenen ENDOR-Spektren nahezu ausschließlich von der ersten, dominanten Spezies herrühren. Dieser Schluß ist gerechtfertigt, weil ENDOR eine Doppelresonanzmethode darstellt, und hohe Signalintensitäten nur unter Bedingungen beobachtet werden können, bei denen auch große Mikrowellenabsorption herrscht. Trägt eine Spezies in der Probe nicht oder nur in Spuren zur Mikrowellenabsorption bei, so sieht man auch im zugehörigen ENDOR-Spektrum nur Spuren von dieser Spezies.

Beim Vergleich der ENDOR-Spektren von Probe 102.1 (Octarepeat/Cu in H₂O und NEM) und der Probe 111.1/115.1 (Octarepeat/Cu in DPC-Micellen in H₂O) fällt auf, dass sich die Spektren bei Arbeitspunkt 8 (Abb. 35) praktisch nicht unterscheiden. Da dieser Arbeitspunkt nahezu ausschließlich Protonen zeigt, die nahe der Ebene der Liganden sind, kann daraus geschlossen werden, dass die planare Ligandenstruktur bezüglich der Protonen sehr ähnlich ist. Das bedeutet, dass insbesondere die Protonen an den C_α-Atomen der mit ihren Rückgratstickstoffen ligandierenden Aminosäuren dieselbe Lage haben müssen, wie die der Probe 102.1, für die eine Struktur in Lösung bekannt ist (Abb. 51). Das wiederum bedeutet, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit dieselben Stickstoffliganden das Cu koordinieren, weil eine andere Ligandenstruktur auch eine andere Position der Protonen zur Folge hätte. Aussagen über die Koordinierung des Sauerstoffs sind auf Basis dieser Messungen nicht möglich, da sich kein Proton in der Nähe des Sauerstoffatoms befindet.

Der Vergleich der ENDOR Spektren bei Arbeitspunkt 8 in Abb. 35 zeigt, dass die beiden mit H₂O markierten Linien im Spektrum der Probe 102.1 im korrespondierenden Spektrum von 111.1/115.1 (Octarepeat/Cu in DPC-Micellen in H₂O) nicht sichtbar sind (Abb. 35). Es ligandiert also kein axiales Wasser, wenn sich in der Lösung DPC-Micellen befinden. Offensichtlich ist die axiale Struktur der Probe 111.1/115.1 (Octarepeat/Cu in DPC-Micellen) nicht dieselbe wie die der Probe 102.1 (Octarepeat/Cu in NEM).

Eine rein phänomenologische Interpretation der EXAFS-Daten der Probe 111.1/115.1 (Octarepeat/Cu in Micellen) ist zu diesem Zeitpunkt wenig aussagekräftig. Ein System zum Strukturrefinement analog zu dem der Probe 102.1 (Kap. 7) ist noch nicht implementiert worden. Das in Kap. 7 für die Probe 102.1 verwendete Basismodell scheint auch für diese Probe sinnvoll zu sein, eine weitergehende Interpretation der EXAFS-Spektren mit dem Auge

ist aber nicht sinnvoll. Ohne Computersimulation können an dieser Stelle keine weiteren Informationen aus den aufgezeichneten EXAFS-Spektren gewonnen werden.

Dennoch kann festgehalten werden, dass die Anwesenheit von DPC-Micellen den Octarepeat/Cu-Komplex in einer ähnlichen Art und Weise stabilisiert wie NEM. Eine stabilisierende Wirkung von Membranoberflächen auf die Komplexbildung ist auch bereits mit anderen Mitteln beobachtet worden (Zahn 2003; Renner et al. 2004). Die beim NMR Strukturrefinement des Prion-Proteins in Lösung beobachtete unstrukturierte N-terminale Domäne (Zahn et al. 2000) weist in Anwesenheit einer Membran eine etwas definiertere Struktur auf (Zahn 2003; Renner et al. 2004). Die vorliegenden Untersuchungen können dies bestätigen. Membranen haben einen unter Umständen erheblichen Einfluß auf die Struktur der Octarepeatsequenz.

8.4 Der Einfluß der Umgebung

Die Struktur des Prion-Protein Octarepeats ist nicht nur sehr stark vom pH-Wert abhängig, sondern auch von der Natur des Lösungsmittels. Das am besten untersuchte System ist dabei mit großem Abstand die wässrige Lösung aus N-Ethyl-Morpholin (NEM), es werden aber auch eine Reihe strukturell mit NEM eng verwandter Stoffe verwendet.

Tab. 14 gibt einen Überblick über alle bereits in der Literatur vorhandenen Arbeiten über Peptidfragmente aus dem Prion-Protein. Nahezu alle dort angeführten Experimente sind mit NEM oder ähnlich gepufferten Proben ausgeführt worden. Bei NEM handelt es sich um eine Substanz, die puffernde Eigenschaften besitzt, denn sie kann ein Proton aufnehmen. Sie kann aber nicht als ein richtiger Puffer bezeichnet werden, da sie nicht als Protondonor arbeitet. Außerdem kommt sie in Säugetieren nicht vor. Das bedeutet, dass man mit derartigen wässrigen Lösungen immer an künstlichen Systemen arbeitet. Wie aus Kap. 5.1, Abb. 26 und Tab. 6 hervorgeht, besitzen diese Komplexe aber die größte Homogenität und die höchste Stabilität, obwohl eine direkte Ligandierung dieser Puffermoleküle ausgeschlossen werden kann. Abb. 57 zeigt die Strukturen der häufig verwendeten komplexstabilisierenden Substanzen.

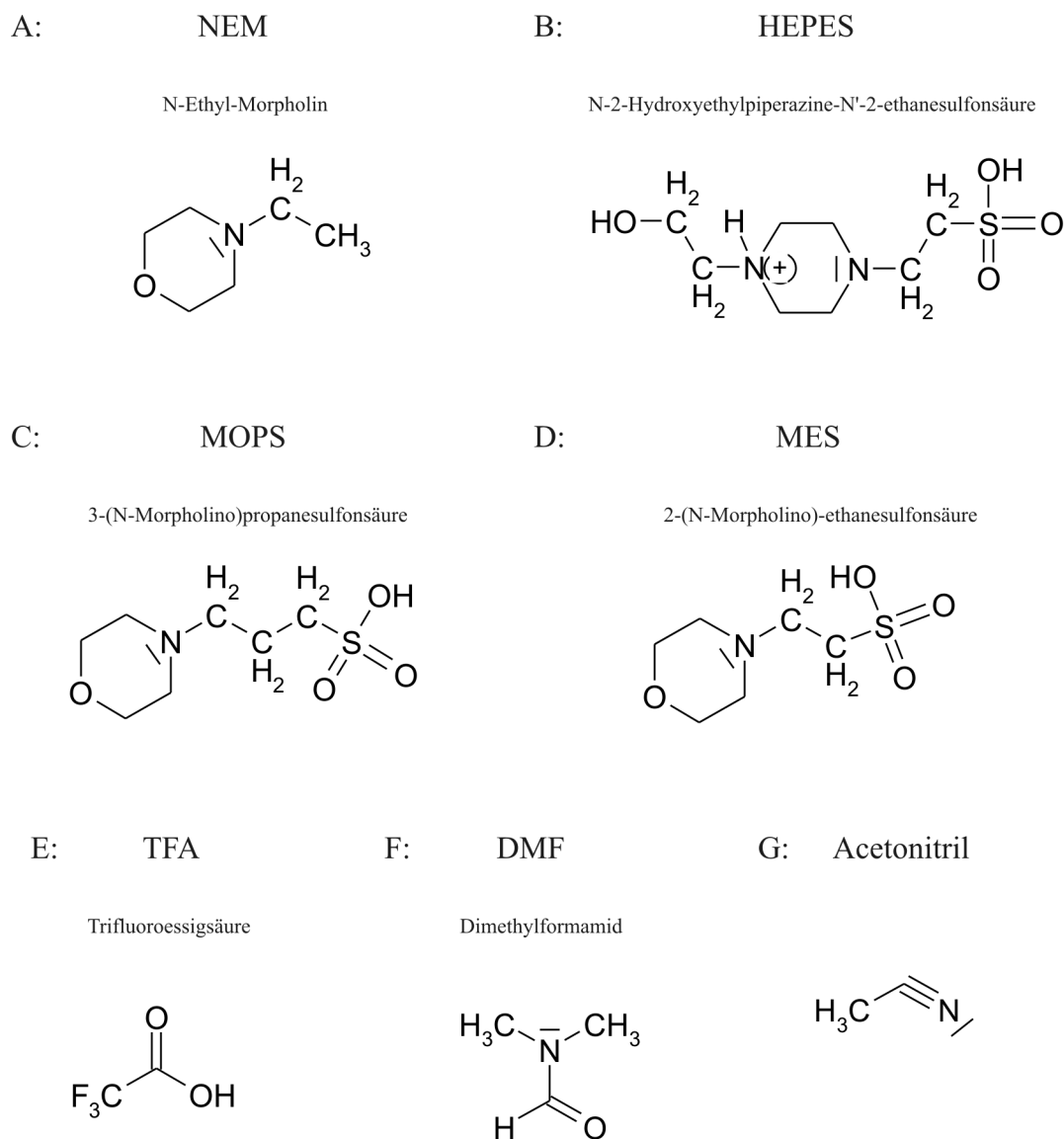


Abb. 57: Struktur von N-Ethyl-Morpholin und ähnlicher, oft als Puffer verwendeter Substanzen

Alle in Abb. 57 dargestellten Verbindungen können ein freies Elektronenpaar zur Verfügung stellen. So wäre es beispielsweise denkbar, dass eine Cu-Cu-Doppelkomplexbildung, wie etwa von Viles et al. (1999) postuliert, verhindert wird, indem das Proton am N_e des Imidazolrings von einem freien Elektronenpaar eines Puffermoleküls stabilisiert wird, ähnlich einer Wasserstoff-Brücken-Bindung. Entsprechende experimentelle Hinweise darauf gibt es in den Arbeiten von Miura et al. (1996a) und Miura et al. (1999).

Beste Homogenität der Proben ergibt sich in zusätzlicher Anwesenheit von Glycerin als Kryoprotektor.

8.5 Der Kupfer-Bindungsplatz im humanen Prion-Protein

Die Interpretation der Spektren von Cu-beladenen Prion-Proteinen gestaltet sich erheblich schwieriger als die von Octarpeat/Cu-Komplexen. In einem Prion-Protein gibt es mehr als einen hochaffinen Cu-spezifischen Bindungsplatz. Zunächst befindet sich im N-terminalen Teil die Octarepeat-Sequenz, die maximal vier Cu binden kann. Darüber hinaus existiert noch mindestens ein hochaffiner Bindungsplatz in der Region PrP(92-120). Bei welchen pH-Werten und auf welche Weise diese Bindungsplätze alle besetzt werden, wird momentan noch diskutiert (Burns et al. 2003).

Das EPR-Spektrum in Abb. 39 zeigt deutlich zwei verschiedene Spezies in der Probe 202.2 bei pH 7. Das legt nahe, dass zwei verschiedenartige Cu-Bindungsplätze bestehen. Dieses Resultat wird von Burns et al. (2003) bestätigt. Welcher der beiden möglichen Bindungsplätze besetzt wird, wird dort von der Konzentration des Cu abhängig gemacht. Bei niedrigen Konzentrationen ist nur Spezies 1 (minor) besetzt, bei voller Kupferbeladung dagegen hauptsächlich Spezies 2 (major).

Bei Probe 204.1 (pH 8) (Abb. 40) fällt die zu $M_{CuI} = -1/2$ gehörende Resonanz auf, sie scheint in 2 unterschiedliche Resonanzen aufgespalten. Da keine dieser aufgespaltenen Linien dann aber zu den $M_{CuI} = +1/2$ und $M_{CuI} = -1/2$ -Linien passen würde ist eine andere Situation wahrscheinlicher. Eine um eine halbe Linienbreite zu kleineren Magnetfeldern verschobene einzelne Linie könnte optisch einen Effekt verursachen, der aussieht wie eine weitere Linienaufspaltung. Eine Ursache für diese einzelne Linie bei $B=305.0\text{mT}$ ist nicht bekannt. Es besteht die Möglichkeit, dass bei höheren pH-Werten weitere Bindungsplätze im Prion-Protein besetzt werden. Diese könnten auch ein anderes charakteristisches Spektrum aufweisen und einen solchen Effekt hervorrufen. Denkbar ist auch die Formation eines Doppelkomplexes.

Während eine Doppelkomplexbildung in der Probe bei pH 7.4 also mit hoher Sicherheit nicht auftritt, so kann sie bei pH 8 nicht ausgeschlossen werden. Die zur Klärung notwendigen ESEEM-Spektren sind aufgrund der niedrigen Probenintensität nicht möglich. Es bleiben daher nur EPR-Titrationsexperimente, um die Formation von Doppelkomplexen auszuschließen. Um diesen Effekt zu erklären sind weitere Untersuchungen notwendig.

ENDOR-Spektren (Abb. 41) der Probe 202.2 (pH 7) zeigen bei Arbeitspunkt 8 praktisch dieselbe Lage von Protonresonanzen. Daraus kann man schließen, dass die Protonen in der Ebene der Liganden mit ihren gebundenen C_α-Atomen dieselbe Geometrie besitzen wie die der Probe 102.1. Das bedeutet, dass die ligandierenden Stickstoffatome eine ähnliche Geometrie besitzen müssen wie die der Probe 102.1. Der in dieser Probe ligandierende Sauerstoff ist nicht direkt an ein Proton gekoppelt, was bedeutet, dass sich eine andere Geometrie der Sauerstoffbindung nicht in den ENDOR-Spektren bemerkbar machen würde. Ein entsprechender Vergleich der Resonanzlinien ist in Abb. 41 dargestellt. Bei Arbeitspunkt 4 unterscheiden sich die ENDOR-Spektren. Die zentrale Linie, verursacht durch weit entfernte Protonen, erscheint schmaler, etwa so wie die der deuterierten Octapeptidprobe 117.2. Die benachbarten Resonanzen dagegen treten mit umso höherer Intensität auf. Noch stärker tritt dieser Effekt bei Arbeitspunkt 1 auf. Offensichtlich gibt es eine geringere Anzahl von weit entfernten Protonen (>5Å) im kupferbeladenen humanen Prion-Protein (202.2) als im Octarepeat/Cu-Komplex (102.1). Die Struktur ist also durch die längere Peptidkette stärker gegen das Lösungsmittel abgeschlossen.

Es existieren einige Untersuchungen über den Cu-Bindungsplatz an vollständigen humanen Prion-Proteinen. Morante et al (2003) haben kupferbeladenes PrP(24-242) und mehrere Peptid/Cu-Komplexe mittels EXAFS-Spektroskopie vermessen. Es sind zwei verschiedene Koordinationen ermittelt worden, die sich an der Anzahl der an das Cu bindenden His-Seitenketten unterscheiden. Komplexe, die ein oder zwei Octarepeat-Sequenzen beinhalten zeigen EXAFS Spektren, die kompatibel sind mit einer gebundenen Histidin-Seitenkette pro Cu in Übereinstimmung mit Burns et al. (2003) und Mentler et al. (2004). Proben die vier Octarepeatsequenzen beinhalten, also Tetraoctarepeats und vollständige Prion-Proteine, zeigen nach Morante et al (2003) hingegen EXAFS-Spektren, die nur durch zwei Spezies interpretierbar sind. Eine mit einer Koordination von zwei Imidazol-Ringen pro Cu, und eine andere mit einer Koordination von einem Imidazol-Ring pro Cu, derselben Spezies, die bei einfachen und Doppel-Octarepeats auftritt. Die durchschnittliche Cu-Beladung pro Octarepeat liegt maximal bei 0.8. Aus diesen Informationen ergeben sich zwei typische Szenarien für die Cu-Komplexierung: Einmal kann es sein, dass sich in jedem Octarepeat drei 1:1-Komplexe ausbilden (Cu-Beladung 0.75) und das restliche Cu in inter-Peptid bzw Protein-Komplexen koordiniert wird. In diesem Fall würden also zwei Octarepeats aus unterschiedlichen Peptiden bzw. Proteinen dasselbe Cu komplexieren. Diese Cu-Komplexe hätten dann eine Cu-Beladung von durchschnittlich 0.05. Es kann aber auch sein, dass bestimmte Peptide bzw.

Proteine ausschließlich 1:1-Komplexe ausbilden, wohingegen die andere Gruppe von Proteinen bzw. Komplexen Cu mit mehr als einem His koordinieren. Intra-Komplex-Formationen sind auf diese Weise ebenfalls möglich. Diese sind messtechnisch aber ohnehin nicht gesondert beobachtbar. Letztere Möglichkeit scheint aufgrund der bereits beobachteten Kooperativität der Cu-Bindung die wahrscheinlichere.

Unsere Daten unterscheiden sich von den bereits veröffentlichten in erster Linie hinsichtlich der Konzentrationsverteilung auf die einzelnen Spezies. Wie Abb. 39 zeigt sind zwar zwei Spezies sichtbar, jedoch ist Spezies 1 (major) wesentlich stärker vertreten als in der Arbeit von Burns et al (2003), auf die sich auch Morante et al (2003) stützen. Wie Abb. 58 in Anhang D zeigt, deuten die g_{\parallel} - und A_{\parallel} - Faktoren beider Spezies auch eher auf eine Komplexierung durch 4N-Atome und nicht, so wie bisher von Burns et al (2003) angenommen, auf eine durch 3N und 1O Atom.

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass die EPR-Parameter der Probe 112.1 (Tetraoctarepeat/Cu in DPC-Micellen) nicht mit denen der Probe 202.2 (hPrP in MOPS, pH 7.0) übereinstimmen, sondern praktisch identisch sind mit denen der Proben 102.1 (Octarepeat/Cu in NEM) und 111.1/115.1 (Octarepeat/Cu in DPC-Micellen). Auch hier unterscheiden sich unsere Messergebnisse von Morante et al (2003), die für Tetraoctarepeat-Cu-Komplexe ähnliche Spektren erhalten wie für Cu-komplexierte vollständige Prion-Proteine. Eine Ursache dafür kann sein, dass sich die Probenpräparation unterscheidet. Morante et al (2003) verwenden kein DPC-Micellen-System, sondern ein normales Puffersystem mit NEM.

Zentrales Problem für die Interpretation unserer Daten ist die Unkenntnis, ob ein oder mehrere His-Imidazolringe an der Komplexierung teilnehmen. ESEEM Messungen, die genau dieses zum Ziel hatten, sind aufgrund der geringen Proteinkonzentration in den Proben gescheitert (Tab. 8). Bereits gemessene Daten anderer Gruppen decken sich nur teilweise mit denen in dieser Arbeit. So stimmen wir mit Burns et al. (2003) zwar darin überein, dass es zwei Spezies gibt, und auch mit den EPR-Parametern dieser Spezies, jedoch nicht mit der Konzentrationsverteilung. Man kann die Daten anderer Gruppen daher nur unter Vorbehalt zur Interpretation der eigenen heranziehen. Offensichtlich ist die Komplexformation, so wie bei den Octarepeats bereits beobachtet, stark abhängig von der Präparation der Proben, etwa von der Art des verwendeten Puffers.

Literaturverzeichnis

- Aguzzi A, Polymenidou M (2004) "One century of evolving concepts" *Cell Biology International* 116: 313-327
- Aronoff-Spencer E, Burns CS, Avdievich NI, Gerfen GJ, Peisach J, Antholine WE, Ball HL, Cohen FE, Prusiner SB, Millhauser GL (2000) "Identification of the Cu²⁺ binding sites in the N-terminal domain of the prion protein by EPR and CD spectroscopy" *Biochemistry* 39: 13760-13771
- Bellinger-Kawahar C, Diener TO, McKinley MP, Groth DF, Smith DR, Prusiner SB (1987) "Purified scrapie prions resist inactivation by procedures that hydrolyze, modify, or shear nucleic acids" *virology* 160: 271-274
- Bellinger-Kawahar CG, Kempner E, Groth D, Gabizon R, Prusiner SB (1988) "Scrapie prion liposomes and rods exhibit target sizes of 55,000 Da." *Virology* 164: 537-541
- Bertini I, Ciurli S, Dikiy A, Gasanov R, Luchinat C, Martini G, Safarov N (1999) "High-field NMR studies of oxidized blue copper proteins: the case of spinach plastocyanin" *J. Am Chem. Soc.* 121: 2037-2046
- Bertini I, Ciurli S, Dikiy A, Fernández CO, Luchinat C, Safarov N, Shumilin S, Vila AJ (2001) "The first solution structure of a paramagnetic copper(II) protein: the case of oxidized plastocyanin from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803" *J. Am Chem. Soc.* 123: 2405-2413
- Brown DR, Herms J, Kretschmar HA (1994) "Mouse cortical cells lacking cellular PrP survive in culture with a neurotoxic PrP fragment" *Neuroreport* 5: 2057-2060
- Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, Fraser PE, Kruck T, Bohlen Av, Schulz-Schaeffer W, Giese A, Westaway D, Kretschmar H (1997a) "The cellular prion protein binds copper in vivo" *Nature* 390: 684-687
- Brown DR, Schluz-Schaeffer WJ, Schmidt B, Kretschmar HA (1997b) "Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity" *Experimental Neurology* 146: 104-112
- Budka H (2003) "Neuropathology of prion diseases" *Br. Med. Bull.* 66: 121-130
- Burns CS, Aronoff-Spencer E, Dunham CM, Lario P, Avdievich NI, Antholine WE, Olmstead MM, Vrielink A, Gerfen GJ, Peisach J, Scott WF, Millhauser GL (2002) "Molecular features of the copper binding sites in the octarepeat domain of the prion protein" *Biochemistry* 41: 3991-4001
- Burns CS, Aronoff-Spencer E, Legname G, Prusiner SB, Antholine WE, Gerfen GJ, Peisach J, Millhauser GL (2003) "Copper coordination in the full-length, recombinant prion protein" *Biochemistry* 42: 6794-6803
- Caughey B, Kocisko DA, Raymond GJ, Lansbury PTJ (1995) "Aggregates of scrapie-associated prion protein induce the cell-free conversion of protease-sensitive prion protein to the protease-resistant state" *Chemistry & Biology* 2: 807-817
- Collinge J, Whittington MA, Sidle KC, Smith CJ, Palmers MS, Clarke AR, Jefferys JG (1994) "Prion protein is necessary for normal synaptic function" *Nature* 370: 295-297
- Come JH, Fraser PE, Lansbury PT (1993) "A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding" *Proc. Nat. Ac. Sci (USA)* 90: 5959-5963
- Diringer H, Beekes M, Oberdieck U (1994) "The nature of the scrapie agent: the virus theory" *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 724: 246-258
- Doh-ura K, Tateishi J, Sasaki H, Kitamoto T, Sakaki Y (1989) "Pro----leu change at position 102 of prion protein is the most common but not the sole mutation related to Gerstmann-Straussler syndrome" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163: 974-979
- Eigen M (1996) "Prionics or the kinetic basis of prion diseases" *Biophysical Chemistry* 63: A1-A18

- Fournier JG, Escaig-Haye F, Billette de Villemeur T, Robain O (1995) "Ultrastructural localization of cellular prion protein (PrP_c) in synaptic boutons of normal hamster hippocampus" *C. R. Acad. Sc. Paris* 318: 339-344
- Gajdusek DC, Gibbs CJ, Alpers M (1966) "Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees" *Nature* 209: 794-796
- Grantner K (2003) "Strukturuntersuchungen an Metallproteinen mit Hilfe der Röntgenabsorptionsspektroskopie: das Kupferbindungs-zentrum in Prion-Proteinen, die Dynamik von Eisen-Schwefel-Clustern in HiPIPs und Untersuchungen am modifizierten Photosystem II" Physik-Department E17. TUM
- Harris DA, Falls DL, Johnson FA, Fischbach GD (1991) "A prion-like protein from chicken brain copurifies with an acetylcholine receptor-inducing activity" *Proc. Nat. Ac. Sci (USA)* 88: 7664-7668
- Hartsough GR, Burger D (1965) "Encephalopathy of mink. I. Epizootiologic and clinical observations" *J. Infect. Dis.* 115: 387-392
- Herms JW, Madlung A, Brown DR, Kretzschmar HA (1997) "Increase of intracellular free Ca²⁺ in microglia activated by prion protein fragment" *Glia* 21: 253-257
- Herms JW, Korte S, Gall S, Schneider I, Dunker S, Kretzschmar HA (2000) "Altered intracellular calcium homeostasis in cerebellar granule cells of prion protein-deficient mice" *J. Neurochem.* 75: 1487-1492
- Herms JW, Tings T, Dunker S, Kretzschmar HA (2001) "Prion protein affects Ca²⁺-activated K⁺ currents in cerebellar purkinje cells" *Neurobiology of Disease* 8: 324-330
- Hopt A, Korte S, Fink H, Panne U, Niessner R, Jahn R, Kretzschmar H, Herms J (2003) "Methodes for studying synaptosomal copper release" *J. Neurosci. Methods* 128: 159-172
- Hornshaw MP, McDermott JR, Candy JM, Lakey JH (1995) "Copper binding to the N-terminal tandem repeat region of mammalian and avian prion protein: structural studies using synthetic peptides" *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 214: 993-999
- Hsiao K, Baker HF, Crow TJ, Poulter M, Owen F, Terwilliger JD, Westaway D, Ott J, Prusiner SB (1989) "Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome" *Nature* 338: 342-345
- Hurst GC, Henderson TA, Kreilick RW (1985) "Angle-selected ENDOR spectroscopy. 1. Theoretical interpretation of ENDOR shifts from randomly orientated transition-metal complexes" *J Am Chem Soc* 107: 7294-7299
- Kaneko K, Zulianello L, Scott M, Cooper CM, Wallace AC, James TL, Cohen FE, Prusiner SB (1997) "Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation" *Proc. Nat. Ac. Sci (USA)* 94: 10069-10074
- Kovács GG, Budka H (2002) "Aging, the brain and human prion disease" *Experimental Gerontology* 37: 603-605
- Kovács GG, Zerbi P, Voigtländer T, Strohschneider M, Trabattoni G, Hainfellner JA, Budka H (2002) "The prion protein in human neurodegenerative disorders" *Neuroscience Letters* 329: 269-272
- Kramer ML, Kratzin HD, Schmidt B, Römer A, Windl O, Liemann S, Hornemann S, Kretzschmar H (2001) "Prion protein binds copper within the physiological concentration range" *J. Biol. Chem.* 276: 16711-16719
- Kretzschmar HA, Giese A, Brown DR, Herms J, Keller B, Schmidt B, Groschup M (1997) "Cell death in prion disease" *J. Neural Transm. Suppl.* 50: 191-210
- Kretzschmar HA, Tings T, Madlung A, Giese A, Herms J (2000) "Function of PrP(C) as a copper-binding protein at the synapse" *Arch. Virol. Suppl.* 2000: 239-249
- Kretzschmar HA (2002a) "Etiology, pathology and diagnosis of prion diseases in humans" *Internist (Berl)* 43: 724-730

- Kretzschmar HA (2002b) "Human prion diseases" *Pathologie* 23: 241-251
- Kretzschmar HA (2003) "Diagnosis of prion diseases" *Clin. Lab. Med.* 23: 109-128
- Lehmann S (2002) "Metal ions and prion diseases" *Current Opinion in Chemical Biology* 6: 187-192
- Lledo PM, Tremblay P, DeArmond SJ, Prusiner SB, Nicoll RA (1996) "Mice deficient for prion protein exhibit normal neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus" *Proc. Nat. Ac. Sci (USA)* 93: 2403-2407
- Luczkowski M, Kozłowski H, Stawikowski M, Rolka K, Gagelli E, Valensin D, Valensin G (2002) "Is the monomeric prion octapeptide repeat PHGGWGQ a specific ligand for Cu^{2+} ions?" *J. Chem. Soc., Dalton Trans.:* 2269-2274
- MacKerell Jr. AD, Bashford D, Bellott M, Dunbrack Jr. RL, Evanseck J, Field MJ, Fischer S, Gao J, Guo H, Ha, S., , Joseph D, Kuchnir L, Kuczera K, Lau FTK, Mattos C, Michnick S, Ngo T, Nguyen DT, Prodhom B, Reiher I, W. E., Roux B, Schlenkrich M, Smith J, Stote R, Straub J, Watanabe M, Wiorkiewicz-Kuczera, J. Y, D., Karplus M (1998) "All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins" *J. Phys. Chem.* 102: 3586-3616
- Magliozzo RS, Peisach J (1993) "Evaluation of nitrogen nuclear hyperfine and quadrupole coupling parameters for the proximal imidazole in myoglobin-azide, -cyanide, and -mercaptoethanol complexes by electron spin echo envelope modulation spectroscopy" *Biochemistry* 32: 8446-8456
- Manson JC, Hope J, Clarke AR, Johnston A, Black C, MacLeod N (1995) "PrP gene dosage and long term potentiation" *Neurodegeneration* 4: 113-114
- Mentler M, Weiss A, Grantner K, Del Pino P, Deluca D, Fiori S, Renner C, Meyer-Klaucke W, Moroder L, Bertsch U, Kretzschmar HA, Tavan P, Parak FG (2004) "A new method to determine the structure of the metal environment in metalloproteins: investigation of the prion octapeptide repeat Cu^{2+} -complex" *Europ. Biophysics Journal*, submitted:
- Miura M, Micca PL, Fisher CD, Heinrichs JC, Donaldson JA (1996a) "Synthesis of a nickel tetracarboranylphenylporphyrin for boron neutron-capture therapy: biodistribution and toxicity in tumor-bearing mice" *Int. J. Cancer* 68: 114-119
- Miura T, Hori-i A, Takeuchi H (1996b) "Metal-dependent alpha-helix formation promoted by the glycine-rich octapeptide region of prion protein" *FEBS Lett.* 396: 248-252
- Miura T, Hori-i A, Mototani H, Takeuchi H (1999) "Raman spectroscopic study on the copper(II) binding mode of prion octapeptide and its pH dependence" *Biochemistry* 38: 11560-11569
- Morante S, González-Iglesias R, Potrich C, Meneghini C, Meyer-Klaucke W, Menestrina G, Gasset M (2003) "Inter- and intra-octarepeat Cu(II) site geometries in the prion protein: implications in Cu(II) binding cooperativity and Cu(II) -mediated assemblies" *The Journal of Biological Chemistry* 279: 11753-11759
- Palmer MS, Dryden AJ, Hughes JT, Collinge J (1991) "Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease" *Nature* 351: 340-342
- Pan K-M, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, Prusiner SB (1993) "Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10962-10966
- Pattison IH (1966) "The relative susceptibility of sheep, goats and mice to two types of the goat scrapie agent" *Res. Vet. Sci.* 7: 207-212
- Peisach J, Blumberg WE (1974) "Structural implications derived from the analysis of electron paramagnetic resonance spectra of natural and artificial copper proteins" *ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS* 165: 691-708

- Prusiner SB (1982) "Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie" *Science* 216: 136-144
- Pushie J, Rauk A (2003) "Computational studies of Cu(II)[peptide] binding motifs: Cu[HGGG] and Cu[HG] as models for Cu(II) binding to the prion protein octarepeat region" *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 8: 53-65
- Renner C, Fiori S, Fiorino F, Landgraf D, Deluca D, Mentler M, Grantner K, Parak FG, Kretzschmar H, Moroder L (2004) "Micellar environments induce structuring of the N-terminal tail of the prion protein" *Biopolymers* 73: 421-433
- Safar J, Roller PP, Gajdusek DC, Gibbs CJJ (1993) "Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein" *J. Biol. Chem.* 268: 20276-20284
- Schätzl H, DaCosta M, Taylor L, Cohen FE, Prusiner SB (1995) "Prion protein gene variation among primates" *J. Mol. Biol.* 245:
- Stöckel J, Safar J, Wallace AC, Cohen FE, Prusiner SB (1998) "Prion protein selectively binds copper(II) ions" *Biochemistry* 37: 7185-7193
- Telling GC, Scott M, Hsiao KK, Foster D, Yang SL, Torchia M, Sidle KC, Collinge J, DeArmond SJ, Prusiner SB (1994) "Transmission of Creutzfeld-Jakob disease from humans to transgenic mice expressing chimeric human-mouse prion protein" *Proc. Nat. Ac. Sci (USA)* 91: 9936-9940
- Telling GC, Scott M, Mastrianni J, Gabizon R, Torchia M, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB (1995) "Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein" *Cell.* 83: 79-90
- Tobler I, Gaus SE, Deboer T (1996) "Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein" *Nature* 380: 639-642
- Tobler I, Deboer T, Fischer M (1997) "Sleep and sleep regulation in normal and prion protein-deficient mice" *J. Neurosci.* 17: 1869-1879
- Van Doorslaer S, Cereghetti GM, Glockshuber R, Schweiger A (2001) "Unraveling the Cu²⁺ binding sites in the C-terminal domain of the murine prion protein: a pulse EPR and ENDOR study" *J. Phys. Chem. B* 105: 1631-1639
- Viles JH, Cohen FE, Prusiner SB, Goodin DB, Wright PE (1999) "Copper binding to the prion protein: Structural implications of four identical cooperative binding sites" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 2042-2047
- Weiss A (2005) private Mitteilung. LMU München
- Whittington MA, Sidle KC, Gowland I, Meads J, Hill AF, Palmer MS, Jeffery JG, Collinge J (1995) "Rescue of neurophysiological phenotype seen in PrP null mice by transgene encoding human prion protein" *Nat Genet* 9: 197-201
- Wüthrich K (2003) "NMR studies of structure and function of biological macromolecules" *Biosci. Reports* 23: 119-153
- Zahn R, Liu A, Lührs T, Riek R, Schroeter von C, Lopez Garcia F, Billeter M, Calzolari L, Wider G, Wüthrich K (2000) "NMR solution structure of the human prion protein" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:
- Zahn R (2003) "The octapeptide repeats in mammalian prion protein constitute a pH-dependent folding and aggregation site" *J. Mol. Biol.* 334: 477-488

Anhang A: Maple Skript zur Berechnung von Spinmatrizen

```

> restart;
> with (linalg):with (linalg):
> Splus:= proc(SState)
local Result,a_s,M_s;
Result := SState;
if (SState[3]<=(SState[2]-1)) then
    a_s := SState[1] * sqrt ((SState[2] *
(SState[2] + 1) - SState[3] * (SState[3] + 1)));
    M_s := SState[3] + 1;
    Result[1]:=a_s;
    Result[3]:=M_s;
else
    Result[1]:=0;
end if;
RETURN (Result);
end:
> Sminus:= proc(SState)
local Result,a_s,M_s;
Result := SState;
if (SState[3]>=(-SState[2]+1)) then
    a_s := SState[1] * sqrt ((SState[2] *
(SState[2] + 1) - SState[3] * (SState[3] - 1)));
    M_s := SState[3] - 1;
    Result[1]:=a_s;
    Result[3]:=M_s;
else
    Result[1]:=0;
end if;
RETURN (Result);
end:
> Iplus:= proc(SState)
local Result,a_s,M_i;
Result := SState;
if (SState[5]<=(SState[4]-1)) then
    a_s := SState[1] * sqrt ((SState[4] *
(SState[4] + 1) - SState[5] * (SState[5] + 1)));
    M_i := SState[5] + 1;
    Result[1]:=a_s;
    Result[5]:=M_i;
else
    Result[1]:=0;
end if;
RETURN (Result);
end:
> Iminus:= proc(SState)
local Result,a_s,M_i;
Result := SState;
if (SState[5]>=(-SState[4]+1)) then
    a_s := SState[1] * sqrt ((SState[4] *
(SState[4] + 1) - SState[5] * (SState[5] - 1)));
    M_i := SState[5] - 1;
    Result[1]:=a_s;
    Result[5]:=M_i;
else
    Result[1]:=0;
end if;
RETURN (Result);
end:
> Iz:= proc(SState)
local Result;
Result:=SState;
Result[1]:=Result[1]*SState[5];
RETURN (Result);
end:
> Sz:= proc(SState)
local Result;
Result:=SState;
Result[1]:=Result[1]*SState[3];
RETURN (Result);
end:
> S1S2mult:=proc(SState1, SState2)
if ((SState1[3] = SState2[3]) and (SState1[5] =
SState2[5])) then
    RETURN (SState1[1]*SState2[1]);
else
    RETURN (0);
end if;
end:
> S1S2Rfdip:=proc(SState1, SState2)
if ((SState1[5] = SState2[5]-1) or (SState1[5] =
SState2[5]+1)and(SState1[3] = SState2[3])) then
    RETURN (1);
else
    RETURN (0);
end if;
end:
> Atot:=proc (SState1, SState2, A_iso, Theta,
theta, phi, r_abs)
local A_s;
#A_s :=
evalf((mu_0*g_1H*beta_N*g_angle(theta,phi)*beta_e
*(3*cos(Theta)^2-
1)/(2*4*Pi*r_abs^3*h_Planck))+A_iso);
A_s := (SState1[3]*S1S2mult(SState1,
SState2)*A_iso*SState1[5])+
1/2*A_iso*(S1S2mult(SState1,
Sminus(Iplus(SState2))))+
1/2*A_iso*(S1S2mult(SState1,
Iminus(Splus(SState2)))));
RETURN (A_s);
end:
> G14Ntot:=proc (SState1, SState2, H_0)
local G_s;
G_s:= g_1H*beta_N*H_0/(h_Planck)*SState1[5];
RETURN (S1S2mult(SState1, SState2)*G_s);
end:
> Qtot:=proc (SState1, SState2, P, nu)
local sum1, sum2, sum3, sum4;
sum1 := 3 * S1S2mult(SState1, Iz(Iz(SState2)));
sum2 := -(SState1[4]*(SState1[4]+1))*
S1S2mult(SState1,SState2);
sum3 := 0.5 * nu *S1S2mult(SState1, Iplus( Iplus
(SState2)));
sum4 := 0.5 * nu *S1S2mult(SState1, Iminus(
Iminus (SState2)));
RETURN (P * (sum1+sum2+sum3+sum4));
end:
> SpinControlMat:=Matrix(8,8):
AtotMat:=Matrix(8,8):
G14NtotMat:=Matrix(8,8):
QtotMat:=Matrix(8,8):
RfdipMat:=Matrix(8,8):
for i from 1 by 1 to 2 do
    for j from 1 by 1 to 2 do
        for k from 1 by 1 to 4 do
            for l from 1 by 1 to 4 do
                SState1 := [1,1/2,i-
3/2,3/2,k-5/2];
                SState2 := [1,1/2,j-
3/2,3/2,l-5/2];
                #print (k+((i-
1)*4),l+((j-
1)*4),SState1,SState2,S1S2mult(SState1,SState2));
                G14NtotMat[k+((i-
1)*4),l+((j-1)*4)]:=G14Ntot(SState1, SState2,
H_0);
                #QtotMat[k+((i-
1)*4),l+((j-1)*4)]:=Qtot(SState1, SState2,P,nu);
                #SpinControlMat[k+((i-1)*4),l+((j-1)*4)] :=
S1S2mult(SState1,SState2);
                RfdipMat[k+((i-
1)*4),l+((j-1)*4)] := S1S2Rfdip(SState1,SState2);
                AtotMat[k+((i-
1)*4),l+((j-1)*4)]:=
                Atot(SState1,SState2,A_iso,Gamma,theta,phi,r_abs)
                ;
            end do;
        end do;
    end do;
end do;
#HamiltonMatrix := evalm
(QtotMat+G14NtotMat+AtotMat);
#HamiltonMatrix := evalm
(QtotMat+AtotMat);
#HamiltonMatrix := evalm
(AtotMat+G14NtotMat);
HamiltonMatrix := (AtotMat);
#EigenV:=[eigenvects(HamiltonMatrix)];
#EigenVec:=[ seq ( seq
(EigenV[m,3,n],n=1..EigenV[m,2]))
,m=1..nops(EigenV)];
#EigenVal:=[ seq ( seq
(EigenV[m,1],n=1..EigenV[m,2]))
,m=1..nops(EigenV)];

```



```

strcat(chtest, pathnam);
strcat(chtest, filnam);
strcat(chtest, "Power=");
strcat(chtest, micropower);
strcat(chtest, "T=");
strcat(chtest, temperature);
strcat(chtest, ".");
strcat(chtest, "B=");
strcat(chtest, bfield[bindex]);
strcat(chtest, ".");
strcat(chtest, i);
strcat(chtest, ".ascii");
println(chtest);
execCmd(chtest);

endif
bindex = bindex + 1;

endwhile;
micropower = micropower + powerattenstepwidth;
endwhile;
temperature = temperature + tempstepwidth;
endwhile;
#-----#
-----#
oto 100;
#-----#
-----#

aqMbcStandby(experimentP);
println("Acquisition done");
println("-----");

return(TRUE);

```

Anhang C: Vergleich der g- und A-Tensorwerte gefitteter EPR Spektren

Probe	102.1	105.1	117.2
Linienbreite	0.026413	0.158821	0.028548
L/G-Verhältnis	49.646055	48.762552	48.824867
gx	2.061651	2.070061	2.061570
gy	2.069050	2.065888	2.066418
gz	2.249741	2.293293	2.250793
Ax	9.223221	38.669741	9.801250
Ay	25.965933	13.833539	30.299102
Az	477.485842	498.008257	477.700193
Verfahren	simplex	simplex	simplex

Probe	111.1/115.1	112.1
Linienbreite	0.300000	0.500000
L/G-Verhältnis	57.000000	55.000000
gx	2.065300	2.066800
gy	2.065300	2.066800
gz	2.245000	2.245000
Ax	32.675340	32.675340
Ay	32.675340	32.675340
Az	467.768522	467.768522
Verfahren	manuell	manuell

Probe	202.2 major	202.2 minor
Linienbreite	0.300000	0.300000
L/G-Verhältnis	50.000000	50.000000
gx	2.060000	2.060000
gy	2.060000	2.060000
gz	2.256900	2.226500
Ax	4.072905	4.072905
Ay	4.072905	4.072905
Az	563.7859	513.38590
Verfahren	manuell	manuell

Tab. 15 Auswertung von EPR-Spektren mittels Xemr. Parameter aus den Anpassungender EPR-Spektren dach der Methode der derinsten quadratischen Abweichung.

Anhang D: Aufschlüsselung einer Auswahl von Proben nach Peisach-Blumberg-Korrelationen

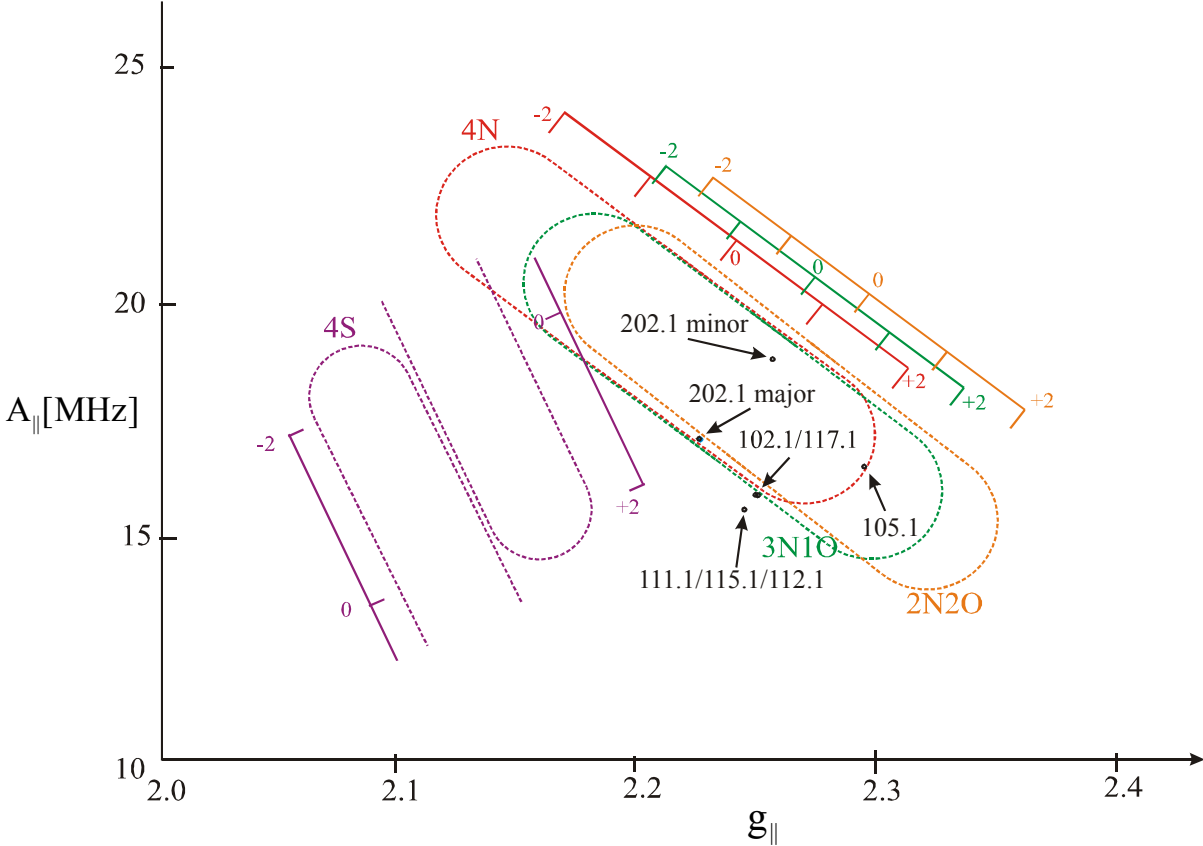


Abb. 58 Aufschlüsselung einer Auswahl von Proben nach Peisach-Blumberg-Korrelationen.

Anhang E: Tabelle der den Peisach-Blumberg-Korrelationen zugrundeliegenden Komplexe

AAO	<i>Cucumis sativus</i> ascorbate oxidase
ACA	bis Acetylacetonate
AP	<i>E. coli</i> alkaline phosphatase: 1: without phosphate; 2: with phosphate
AQ	Hexaquo ion: 1: pH 1; 2: pH 3; 3: pH 14
AZN	Azurin: 1: <i>Pseudomonas fluorescens</i> 2: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 3: <i>Bordetella</i>
BAO	Pig plasma benzylamine oxidase
BIP	Bipyridyl: 1: tris; 2: mono
BIU	his Biuret, pH 12
Br4	Square planar CuBr ₄ in K ₂ Pd(Cu)Br ₄
BTS	bis Butyraldehydethiosemicarbazone: 1: neutral; 2: dipositive
CA	Carbonic anhydrase: 1: human B; 2: human C; 3: bovine B
CCO	Bovine cytochrome c oxidase
Cl4	Square planar CuCl ₄ in K ₂ Pd(Cu)Cl ₄
CP	Bovine pancreas carboxypeptidase A
CPN	Human ceruloplasmin
CYS	bis Cysteine
DAO	Pig kidney diamine oxidase
DAB	1,2,4,5 - tetra(β - diacetylvinyl)-aminobenzene
DBH	Bovine adrenal dopamine-β-hydroxylase
DIG	bis Glycylglycine 1, 2, 3: single crystal species 4: solution pH 3
DMG	bis Dimethylglyoxime
DTC	bis Diethyldithiocarbamate
EN	bis Ethylenediamine, aqueous pH 8
FDT	bis Fulvene-6,6-dithiol
GLY	bis Glycine
GO	<i>Dactyrium dendroides</i> galactose oxidase
HB	Human hemoglobin A
IM	tetra Imidazole
INS	Insulin
KTS	2-Ketobutyraldehyde bis(thio-semicarbazone)
LF1	<i>Polyporus versicolor</i> laccase monofluoride
LF2	<i>Polyporus versicolor</i> laccase difluoride
LPX	<i>Polyporus versicolor</i> laccase hydroperoxide
MAO	<i>Aspergillus niger</i> monoamine oxidase
MB	Sperm whale myoglobin: 1: pH 10.4; 2: pH 6.4
MBO	1,1,1-Trifluoro-4-mercapto-4-(2-thienyl)-but-3-en-2-one
MPO	3-Mercapto-1,3-diphenyl-prop-2-en-1-one
OX	bis Oxalate
PEN	bis Penicillamine
PLN	<i>Chenopodium album</i> plastocyanin
PVL	<i>Polyporus versicolor</i> laccase
RDC	Spinach ribulose diphosphate carboxylase
RSL	<i>Rhus succedanea</i> laccase
RVL	<i>Rhus vernicifera</i> laccase: 1: pH 10-12; 2: pH 3-8
SAI	bis Salicylaldimine
SOD	Bovine erythrocyte superoxide dismutase
STN	<i>Rhus vernicifera</i> stellacyanin
TEG	(Glycyl) ₃ glycine: 1: pH 8; 2: pH 4
TFN	Human transferrin: 1: without bicarbonate; 2: with bicarbonate
TRG	(Glycyl) ₂ glycine: 1: pH 11; 2: pH 8; 3: pH 7; 4: pH 6; 5: pH 4; 6: pH 3
TRN	Bovine trypsin: 1: pH 7.5; 2: pH 3.5
UMN	Horseradish umecyanin
URO	Uroporphyrin III

Anhang F: ENDOR-Spektren der Probe 102.1

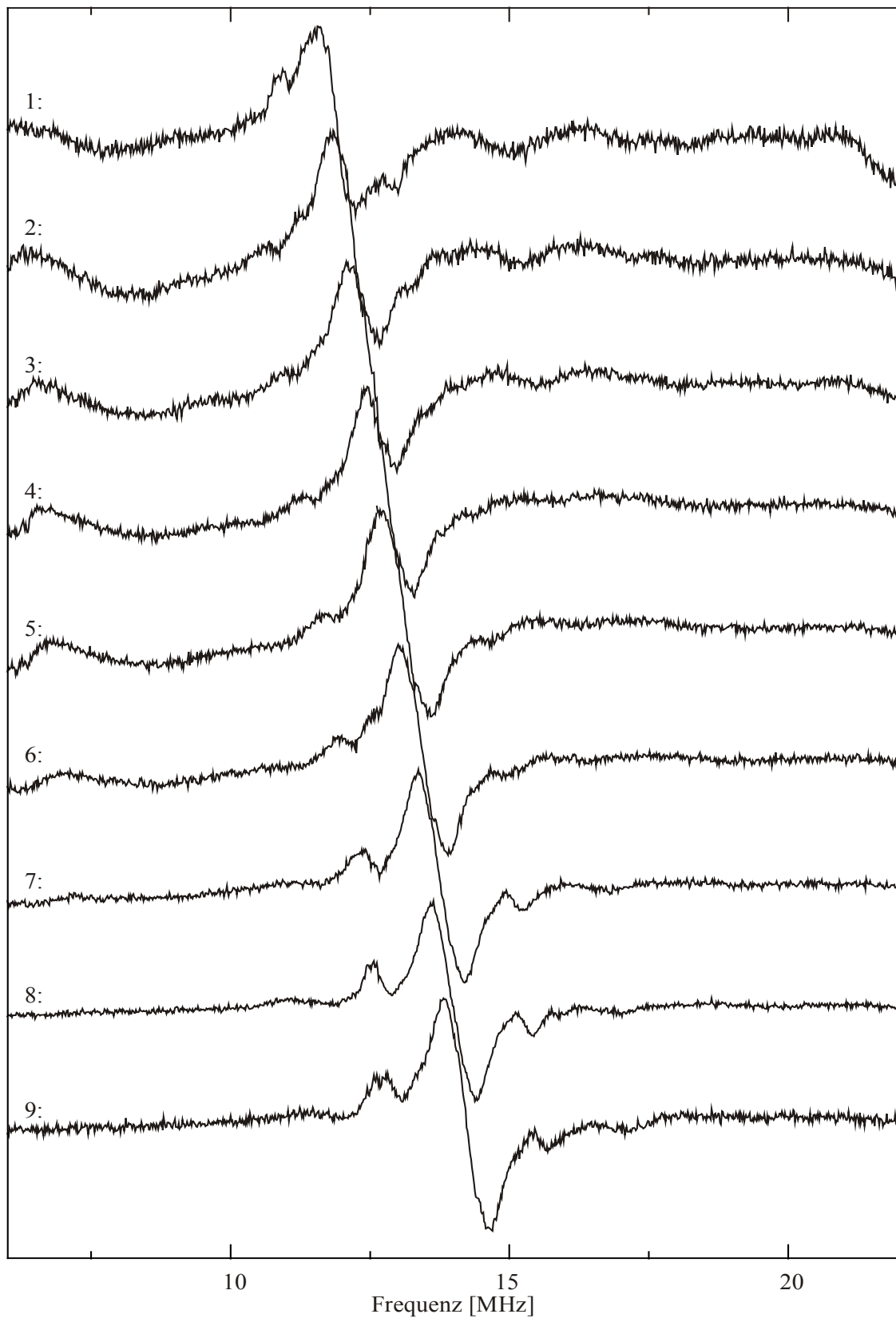


Abb. 59: Alle aufgezeichneten ENDOR-Spektren der Probe 102.1 (Octarepeat in H₂O und NEM). Die Ziffern bezeichnen die Arbeitspunkte 1-9 (Tab. 7).

Anhang G: ENDOR-Spektren der Probe 117.2

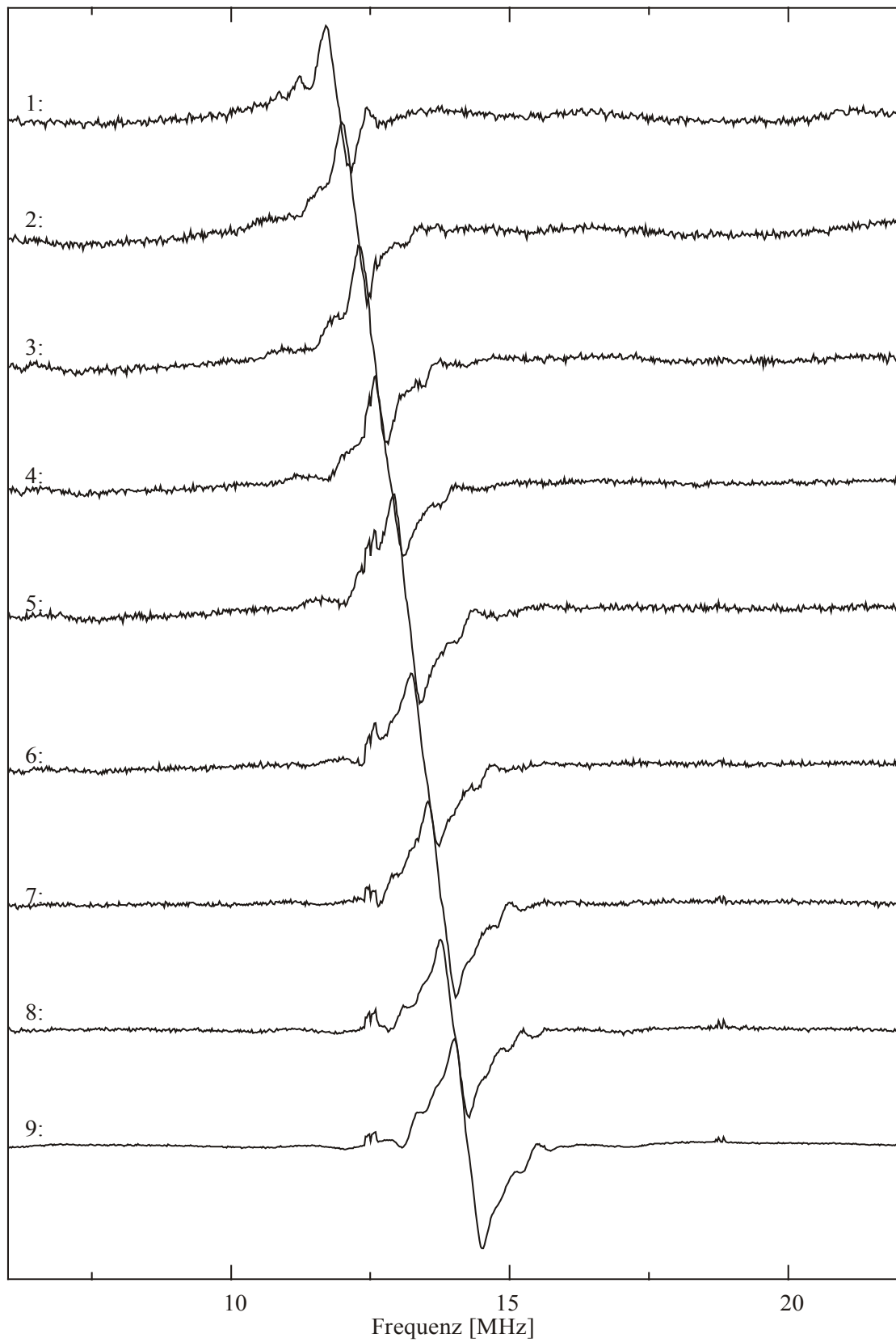


Abb. 60: Alle aufgezeichneten ENDOR-Spektren der Probe 117.2 (Octarepeat in H₂O und NEM). Die Ziffern bezeichnen die Arbeitspunkte 1-9 (Tab. 7).

Anhang H: ENDOR-Spektren der Probe 111.1/115.1

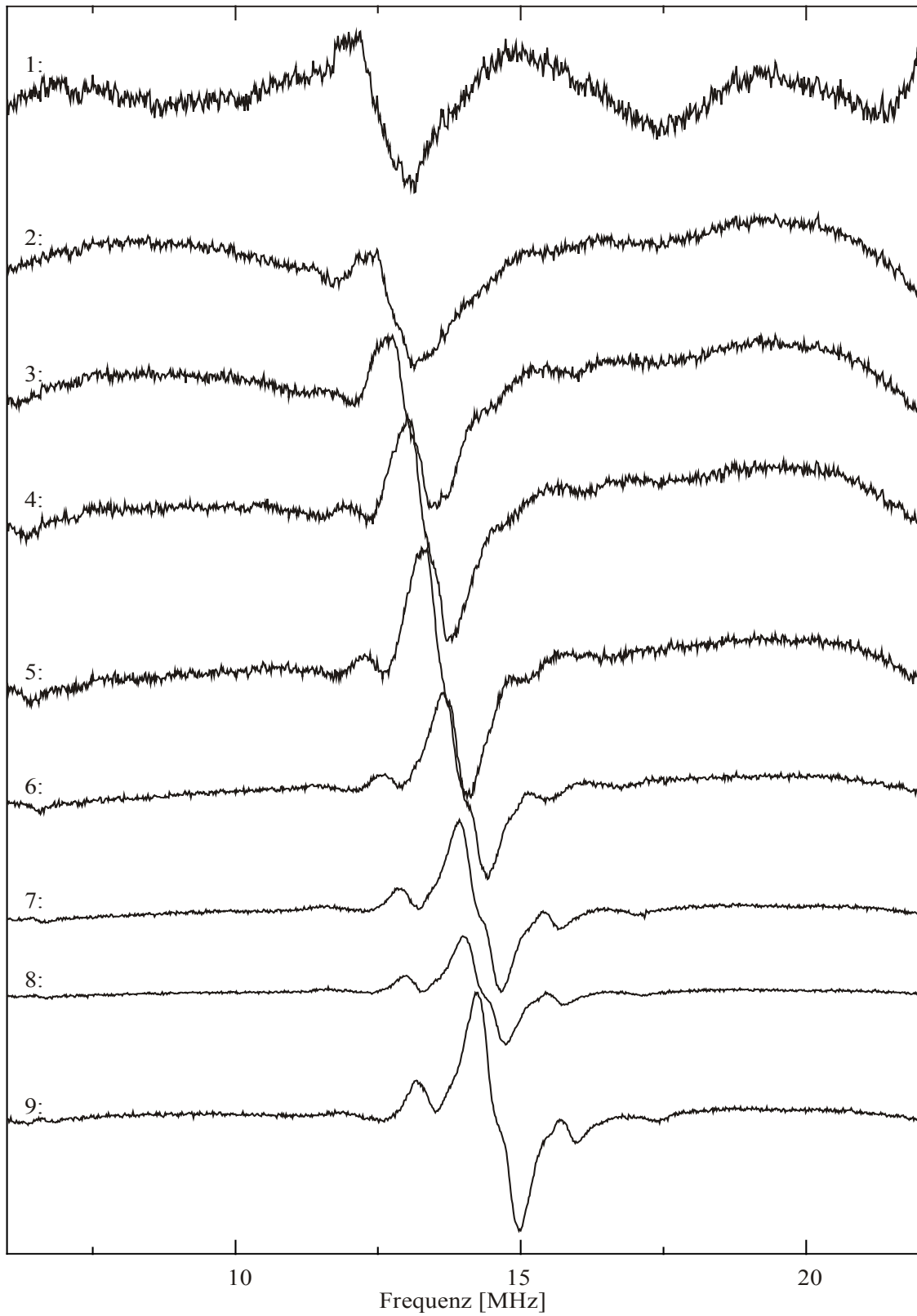


Abb. 61: Alle aufgezeichneten ENDOR-Spektren der Probe 111.1/115.1 (Octarepeat in H₂O und NEM). Die Ziffern bezeichnen die Arbeitspunkte 1-9 (Tab. 7).

Anhang I: ENDOR-Spektren der Probe 202.2

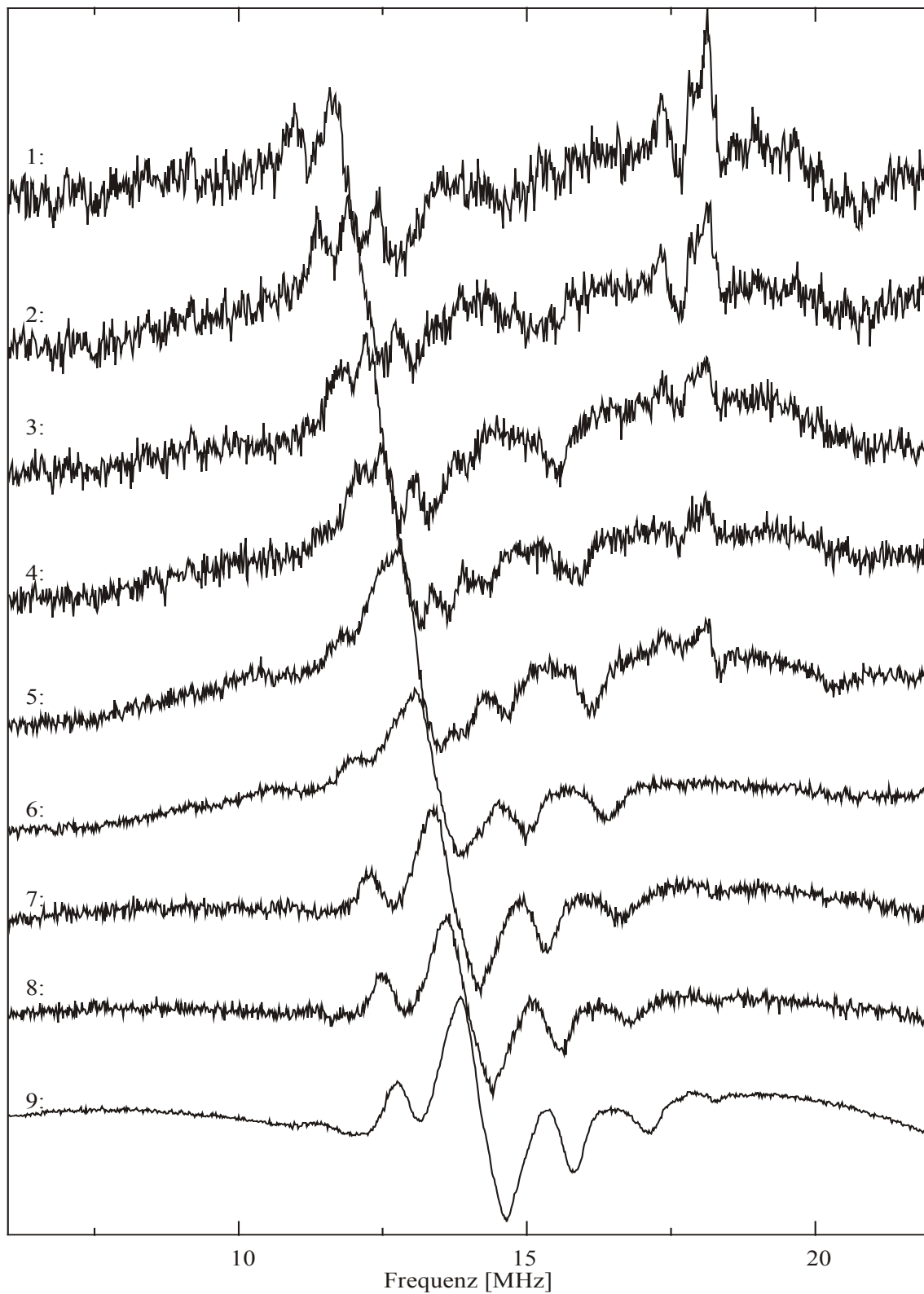


Abb. 62: Alle aufgezeichneten ENDOR-Spektren der Probe 202.2 (Octarepeat in H₂O und NEM). Die Ziffern bezeichnen die Arbeitspunkte 1-9 (Tab. 7).

Anhang J: Koordinaten des Octarepeat/Cu-Komplexes im PDB Format

```
REMARK FILENAME="E_-206.115_E_.pdb"
REMARK water models available: TIP3P model
REMARK DATE:18 Nov 03 08:34:49 created by user: weiss
ATOM 1 N PRO 1 3.445 3.586 -2.350 0.00 0.00
ATOM 2 CA PRO 1 1.988 3.665 -2.413 0.00 0.00
ATOM 3 HA PRO 1 1.673 4.665 -2.149 0.00 0.00
ATOM 4 CD PRO 1 4.035 3.207 -3.633 0.00 0.00
ATOM 5 1HD PRO 1 4.376 4.129 -4.156 0.00 0.00
ATOM 6 2HD PRO 1 4.889 2.508 -3.504 0.00 0.00
ATOM 7 CAY PRO 1 5.623 3.956 -1.361 0.00 0.00
ATOM 8 HY1 PRO 1 6.014 4.325 -0.390 0.00 0.00
ATOM 9 HY2 PRO 1 5.990 4.620 -2.170 0.00 0.00
ATOM 10 HY3 PRO 1 5.988 2.922 -1.527 0.00 0.00
ATOM 11 CY PRO 1 4.147 3.979 -1.300 0.00 0.00
ATOM 12 OY PRO 1 3.600 4.366 -0.273 0.00 0.00
ATOM 13 CB PRO 1 1.661 3.344 -3.889 0.00 0.00
ATOM 14 1HB PRO 1 1.610 4.301 -4.453 0.00 0.00
ATOM 15 2HB PRO 1 0.701 2.797 -4.029 0.00 0.00
ATOM 16 CG PRO 1 2.878 2.552 -4.389 0.00 0.00
ATOM 17 1HG PRO 1 2.778 1.499 -4.043 0.00 0.00
ATOM 18 2HG PRO 1 3.003 2.569 -5.493 0.00 0.00
ATOM 19 C PRO 1 1.290 2.713 -1.449 0.00 0.00
ATOM 20 O PRO 1 1.350 1.495 -1.611 0.00 0.00
ATOM 21 N HSE 2 0.597 3.261 -0.441 0.00 0.00
ATOM 22 H HSE 2 0.556 4.251 -0.316 0.00 0.00
ATOM 23 CA HSE 2 -0.198 2.501 0.495 0.00 0.00
ATOM 24 HA HSE 2 -0.592 1.634 -0.015 0.00 0.00
ATOM 25 NE2 HSE 2 0.422 -1.339 2.925 0.00 0.00
ATOM 26 HE2 HSE 2 0.725 -2.255 3.185 0.00 0.00
ATOM 27 CD2 HSE 2 1.210 -0.235 2.685 0.00 0.00
ATOM 28 HD2 HSE 2 2.276 -0.178 2.869 0.00 0.00
ATOM 29 ND1 HSE 2 -0.905 0.210 2.099 0.00 0.00
ATOM 30 CG HSE 2 0.371 0.704 2.178 0.00 0.00
ATOM 31 CE1 HSE 2 -0.839 -1.019 2.559 0.00 0.00
ATOM 32 HE1 HSE 2 -1.647 -1.754 2.620 0.00 0.00
ATOM 33 CB HSE 2 0.637 2.100 1.734 0.00 0.00
ATOM 34 1HB HSE 2 0.488 2.797 2.586 0.00 0.00
ATOM 35 2HB HSE 2 1.711 2.141 1.455 0.00 0.00
ATOM 36 C HSE 2 -1.373 3.378 0.891 0.00 0.00
ATOM 37 O HSE 2 -1.355 4.567 0.591 0.00 0.00
ATOM 38 N GLY 3 -2.437 2.879 1.537 0.00 0.00
ATOM 39 CA GLY 3 -3.629 3.700 1.694 0.00 0.00
ATOM 40 1HA GLY 3 -3.845 4.229 0.776 0.00 0.00
ATOM 41 2HA GLY 3 -3.510 4.345 2.552 0.00 0.00
ATOM 42 C GLY 3 -4.785 2.797 1.950 0.00 0.00
ATOM 43 O GLY 3 -5.937 3.208 2.008 0.00 0.00
ATOM 44 N GLY 4 -4.508 1.505 2.106 0.00 0.00
ATOM 45 CA GLY 4 -5.482 0.475 2.335 0.00 0.00
ATOM 46 1HA GLY 4 -6.146 0.414 1.486 0.00 0.00
ATOM 47 2HA GLY 4 -5.964 0.639 3.288 0.00 0.00
ATOM 48 C GLY 4 -4.663 -0.761 2.408 0.00 0.00
ATOM 49 O GLY 4 -3.455 -0.691 2.569 0.00 0.00
ATOM 50 N GLY 5 -5.299 -1.940 2.272 0.00 0.00
ATOM 51 H GLY 5 -6.278 -1.939 2.087 0.00 0.00
ATOM 52 CA GLY 5 -4.648 -3.245 2.402 0.00 0.00
ATOM 53 1HA GLY 5 -5.413 -3.969 2.638 0.00 0.00
ATOM 54 2HA GLY 5 -3.885 -3.186 3.166 0.00 0.00
ATOM 55 C GLY 5 -3.983 -3.731 1.143 0.00 0.00
ATOM 56 O GLY 5 -4.244 -4.829 0.669 0.00 0.00
ATOM 57 N TRP 6 -3.091 -2.909 0.584 0.00 0.00
ATOM 58 H TRP 6 -2.974 -2.002 0.981 0.00 0.00
ATOM 59 CA TRP 6 -2.261 -3.238 -0.556 0.00 0.00
ATOM 60 HA TRP 6 -2.305 -4.304 -0.743 0.00 0.00
ATOM 61 CB TRP 6 -2.754 -2.481 -1.828 0.00 0.00
ATOM 62 1HB TRP 6 -3.670 -3.017 -2.156 0.00 0.00
ATOM 63 2HB TRP 6 -2.037 -2.563 -2.673 0.00 0.00
ATOM 64 CG TRP 6 -3.158 -1.023 -1.617 0.00 0.00
ATOM 65 CD2 TRP 6 -4.523 -0.597 -1.449 0.00 0.00
ATOM 66 CD1 TRP 6 -2.391 0.112 -1.556 0.00 0.00
ATOM 67 HD1 TRP 6 -1.316 0.139 -1.676 0.00 0.00
ATOM 68 NE1 TRP 6 -3.192 1.216 -1.341 0.00 0.00
ATOM 69 HE1 TRP 6 -2.916 2.151 -1.257 0.00 0.00
ATOM 70 CE2 TRP 6 -4.503 0.806 -1.297 0.00 0.00
ATOM 71 CE3 TRP 6 -5.725 -1.309 -1.430 0.00 0.00
ATOM 72 HE3 TRP 6 -5.764 -2.383 -1.542 0.00 0.00
ATOM 73 CZ2 TRP 6 -5.680 1.525 -1.141 0.00 0.00
ATOM 74 HZ2 TRP 6 -5.673 2.597 -1.012 0.00 0.00
ATOM 75 CZ3 TRP 6 -6.916 -0.581 -1.268 0.00 0.00
ATOM 76 HZ3 TRP 6 -7.863 -1.102 -1.260 0.00 0.00
ATOM 77 CH2 TRP 6 -6.895 0.818 -1.129 0.00 0.00
ATOM 78 HH2 TRP 6 -7.821 1.362 -1.000 0.00 0.00
ATOM 79 C TRP 6 -0.809 -2.948 -0.198 0.00 0.00
ATOM 80 O TRP 6 -0.325 -3.352 0.857 0.00 0.00
ATOM 81 N GLY 7 -0.065 -2.240 -1.063 0.00 0.00
ATOM 82 H GLY 7 -0.434 -1.971 -1.949 0.00 0.00
ATOM 83 CA GLY 7 1.299 -1.821 -0.795 0.00 0.00
ATOM 84 1HA GLY 7 1.264 -0.834 -0.356 0.00 0.00
```

ATOM	85	2HA	GLY	7	1.794	-2.562	-0.183	0.00	0.00	
ATOM	86	C	GLY	7	2.050	-1.728	-2.087	0.00	0.00	
ATOM	87	O	GLY	7	1.508	-1.980	-3.161	0.00	0.00	
ATOM	88	N	GLN	8	3.346	-1.387	-2.023	0.00	0.00	
ATOM	89	H	GLN	8	3.761	-1.154	-1.152	0.00	0.00	
ATOM	90	CA	GLN	8	4.199	-1.303	-3.195	0.00	0.00	
ATOM	91	HA	GLN	8	3.647	-0.811	-3.986	0.00	0.00	
ATOM	92	NT	GLN	8	3.716	-3.513	-4.276	1.00	0.00	
ATOM	93	HT1	GLN	8	2.758	-3.227	-4.228	1.00	0.00	
ATOM	94	HT2	GLN	8	4.015	-4.402	-4.610	1.00	0.00	
ATOM	95	CB	GLN	8	5.443	-0.441	-2.873	0.00	0.00	
ATOM	96	1HB	GLN	8	5.091	0.486	-2.367	0.00	0.00	
ATOM	97	2HB	GLN	8	6.088	-0.992	-2.151	0.00	0.00	
ATOM	98	CG	GLN	8	6.264	-0.031	-4.124	0.00	0.00	
ATOM	99	1HG	GLN	8	5.645	0.583	-4.811	0.00	0.00	
ATOM	100	2HG	GLN	8	6.628	-0.918	-4.685	0.00	0.00	
ATOM	101	CD	GLN	8	7.452	0.822	-3.729	0.00	0.00	
ATOM	102	OE1	GLN	8	7.397	2.040	-3.688	0.00	0.00	
ATOM	103	NE2	GLN	8	8.591	0.203	-3.405	0.00	0.00	
ATOM	104	1HE2	GLN	8	9.358	0.787	-3.157	0.00	0.00	
ATOM	105	2HE2	GLN	8	8.639	-0.790	-3.432	0.00	0.00	
ATOM	106	C	GLN	8	4.650	-2.713	-3.735	0.00	0.00	
ATOM	107	O	GLN	8	5.798	-3.136	-3.699	0.00	0.00	
ATOM	108	I	ICU	9	-2.639	1.026	2.052	0.00	0.00	
ATOM	109	OH2	TIP3	10	-2.609	1.900	4.295	0.00	0.00	S100
ATOM	110	H1	TIP3	10	-2.324	2.783	4.033	0.00	0.00	S100
ATOM	111	H2	TIP3	10	-3.569	1.989	4.331	0.00	0.00	S100
END										

Anhang K: Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Verschiedene Amplifikationsmodelle, basierend auf der Protein-Only-Hypothese. A: Heterodimermodell nach Prusiner. Bildung eines PrP ^{Sc} -PrP ^C -Dimers, begünstigt durch Protein X (Katalysator). Modellrechnungen ergeben realitätsferne Epidemiologie. B: Kooperatives Modell von Prusiner nach Eigen (Eigen 1996). mehrere Moleküle PrP ^{Sc} wirken zusammen um neues PrP ^{Sc} zu erzeugen. C: Modell der linearen Kristallisation nach Lansbury (Come et al. 1993; Caughey et al. 1995): Oligomere PrP ^{Sc} _n bilden sich mit abnehmender Wahrscheinlichkeit. Ab Zustand PrP ^{Sc} _N überwiegt das Wachstum, nicht der Zerfall. Modelle B und C zeigen realistischere Epidemiologie.	6
Abb. 2: A: Schematischer Aufbau des Prion-Proteins; B: : NMR Struktur der C-terminalen Domäne des humanen Prion-Proteins	7
Abb. 3: Aufspaltung zweier EPR-Energieniveaus eines S=1/2 Systems im Magnetfeld \vec{B}_{ext}	11
Abb. 4: Energieniveaus des Zeemaneffektes und der Hyperfeinaufspaltung in Abhängigkeit des Magnetfeldes. Für den Spezialfall S=1/2, I=3/2 ergeben sich 4 hyperfein-aufgespaltene Linien. $M_{I\text{Cu}}$ bezeichnet die Magnetquantenzahl des Cu-Kernspins.	14
Abb. 5: Die Wahrscheinlichkeit, dass das Protein mit seiner ausgezeichneten Achse normal zum externen Magnetfeld steht, ist wesentlich größer als die Wahrscheinlichkeit, dass es parallel steht.	16
Abb. 6: Das Zustandekommen eines EPR-Spektrums einer Probe in wässriger Lösung. Über alle Positionen der Moleküle relativ zum äußeren magnetischen Feld muß gemittelt werden. Durch Bildung der Ableitung des Spektrums treten die extremalen Positionen der untersuchten Komplexe (parallel und normal zum magnetischen Feld) deutlicher hervor.	17
Abb. 7: A: Die Dipol-Dipol-Wechselwirkung und ihre relevanten Parameter; B: Die Übergangsenergien für einen A-Tensor der Form $A_{\text{HF } ^1\text{H}} = A_{\text{Kern-Zeeman } ^1\text{H}} + A_{\text{Dipol } ^1\text{H}}$. Das Zahlenbeispiel gilt für ein benachbartes Proton X= ¹ H im Abstand von 3Å.	20
Abb. 8: Modell des Systems, für das die isotrope Hyperfeinwechselwirkung mittels Molekülorbitalrechnungen (Weiss 2005) ermittelt worden ist. δ bezeichnet den dihedralen Winkel, von dem A_{Fermi} abhängt, für den Fall, dass diese durch ein σ -Bindungssystem übertragen wird.	22
Abb. 9: Abhängigkeit der isotropen Hyperfeinwechselwirkung von dem dihedralen Winkel δ (Abb. 8). Die Kurve kann parametrisiert werden mit $A_{\text{Fermi}} = C \sin^2(\delta - \delta_0)$ und den Variablen $C=0.97$, $\delta_0=-27^\circ$	23
Abb. 10: Darstellung der EPR- und NMR-Übergänge bei ENDOR-Spektroskopie, zusätzlich sind die beiden „Cross-Relaxations“ Kanäle eingezeichnet, die durch Einstrahlung von Radiowellen „aktiviert“ werden können. Mit A, B, C und D sind jeweils die Übergänge für $M_{I\text{Cu}}=3/2, 1/2, -1/2$ und $-3/2$ bezeichnet.	24
Abb. 11: Molekülfestes Koordinatensystem, Definition der Polaren Winkel Θ , Θ_N , Φ und Φ_N . X bezeichnet ein Atom, entweder ¹⁵ N oder ¹ H	26
Abb. 12: A: Beispiel eines EPR Spektrums eines Cu-Komplexes (theoretisch berechnet). B. : Abhängigkeit der Resonanzposition vom Winkel θ . Sowohl der Schwerpunkt der Resonanzen als auch die Größe der Linienaufspaltung ändern sich mit dem Winkel θ . Bei einer kleinen Störung der axialen Symmetrie vergrößert sich auch die Linienbreite mit zunehmendem θ	27
Abb. 13: ENDOR-Protonresonanzen jeweils für $\Theta_N < \Theta$ (linke Spalte), und $\Theta_N > \Theta$ (rechte Spalte). Die Erklärung befindet sich im Text (Kap.2.2.6)	28

Abb. 14: Effekt eines Mikrowellenpulses auf ein Spinsystem: Klappen von Einzelspins in das energiereiche Niveau und gleichzeitige Phasenfokussierung von Einzelspins bezüglich der Präzessionsbewegung.....	30
Abb. 15: mit Larmorfrequenz rotierendes Koordinatensystem (gestrichelt)	31
Abb. 16: Klappen der Magnetisierung. A: mittels eines resonanten Mikrowellenpulses B: mittels eines nichtresonanten Mikrowellenpulses.....	32
Abb. 17: A: Der Effekt der Spin-Gitter Relaxation: Spins klappen aus dem energiereichen, parallelen Niveau zurück in das energieärmere antiparallele, solange bis das thermische Gleichgewicht, d.h. die Boltzmannpopulation nach Gl. (5) wiederhergestellt ist. B: Der Effekt der Spin-Spin Relaxation: Die durch einen Puls hervorgerufene Phasenfokussierung verschwindet wieder, entsprechend nimmt das transversale magnetische Moment ab.....	34
Abb. 18: Die Spin-Echo Pulsfolge: A beschreibt das Verhalten des Spinsystems, B die Pulsfolge, bzw. die Position des Echos auf der Zeitachse. B stellt die exponentielle Abnahme des Echos bei Verlängerung der Zeit τ zwischen den Pulsen dar.	36
Abb. 19: Die 2-Puls ESEEM-Pulsfolge entspricht im Wesentlichen der Spin-Echo-Pulsfolge, es ist lediglich darauf zu achten, dass eine möglichst große spektrale Breite der Pulse, gewährleistet ist. Die Einhüllende der Pulse ist aufgrund schwacher hyperfeinwechselwirkung moduliert.....	38
Abb. 20: Struktur von Röntgenabsorptionsspektren im Bereich der K-Kante, in Fluoreszenz gemessen. Quelle: Grantner (2003).....	39
Abb. 21: Schematische Darstellung der Interferenz zwischen ein- und auslaufender Wellenfunktion. Quelle: Grantner (2003)	39
Abb. 22: Schematische Darstellung der Mehrfachstreuung. A: Absorberatom, 1, 2: Streuatome. A: Einfachstreuung; B: Zweifachstreuung. . Quelle: Grantner (2003).....	40
Abb. 23: Vielfachstreubeiträge $\chi(s)$ bei nahezu kollinearer Anordnung. In grau sind einige wichtige Streupfade für A-C-O (A) und Histidin (B) eingezeichnet. Quelle: Grantner (2003)	40
Abb. 24 Aus vorgegebener Geometrie berechnetes theoretisches EXAFS-Spektrum (A) und seine Fourier-Transformierte (B) , wobei zwischen Cu-N _δ -N _ε ein Winkel von 180 Grad besteht und der Abstand Cu-N _δ bei 1.91 Å liegt. Die durchgezogene Linie zeigt eine Rechnung mit Mehrfachstreuung, die gestrichelte Linie eine Rechnung ohne MehrfachstreuungQuelle: Grantner (2003)	41
Abb. 25: Schema des Messplatzes an der EMBL EXAFS beam line D2.	43
Abb. 26: EPR-Spektren des Prion-Protein-Octapeptids bei verschiedenen Puffer- und Salzkonzentrationen. A: 102.1 (Octarepeat in H ₂ O und NEM); B: 117.2 (Octarepeat in D ₂ O und NEM); C: 111.1/115.1 (Octarepeat in H ₂ O und DPC Micellen; D: 105.1 (Octarepeat in H ₂ O und SDS Micellen; E: 108.1 (Octa in H ₂ O und Phosphatpuffer); F: 104.1 (Octa in H ₂ O)	50
Abb. 27: EPR-Spektrum (durchgezogen, grau) und Anpassung nach der Methode der kleinsten quadratischen Abweichung (gestrichelt, schwarz) der Probe 102.1 (Octarepeat/Cu in H ₂ O und NEM): $g_x=2.057$, $g_y=2.073$, $g_z=2.248$, $A_x=7.8G$, $A_y=7.8G$, $A_z=165 G$, Linienbreite = 49.1G, Lorentz/Gauss = 0.26	53
Abb. 28: Korrelation der Werte für die g- und A- Tensoren mit der Art der Ligandierung für Cu-Komplexe. Grundlage der Zuordnung bilden die EPR-Spektren der eingezeichneten Komplexe mit bekannter Geometrie. Eine Tabelle der Abkürzungen befindet sich in Anhang E: Abbildung modifiziert nach Peisach und Blumberg (1974).	54
Abb. 29: EPR-Spektren (durchgezogen, grau) von Probe 111.1/115.1 (Octarepeat/Cu in DPC-Micellen) und Standardanpassung (gestrichelt, schwarz). 1 und 2 bezeichnen Resonanzen der beiden Spezies. Spezies1: $g_x= 2.0653$, $g_y= 2.0653$, $g_z= 2.2450$, $A_x= 32.6 MHz$, $A_y= 32.6 MHz$, $A_z= 467.7 MHz$, Linienbreite = 57.0G, Lorentz/Gauss = 0.3; Spezies 2 ist nur	

- in Spuren vorhanden. Sie wurde nicht angepasst. Die durchgezogenen Pfeile markieren Resonanzen für $M_{I\text{Cu}}=3/2$ ($\Theta=0$), die beiden gestrichelten Pfeile die Resonanzen für $M_{I\text{Cu}}=1/2$ ($\Theta=0$)..... 55
- Abb. 30: EPR-Spektren (durchgezogen, grau) von Probe 112.1 (Tetraoctarepeat/Cu in DPC-Micellen) und Standardanpassung (gestrichelt, schwarz):). 1 und 2 bezeichnen Resonanzen der beiden Spezies. Spezies 1: $g_x=2.0668$, $g_y=2.0668$, $g_z=2.2450$, $A_x=32.7$ MHz, $A_y=32.7$ MHz, $A_z=467.7$ MHz, Linienbreite = 55.0G, Lorentz/Gauss = 0.5; Spezies 2 ist nur in Spuren vorhanden. Sie wurde nicht angepasst..... 57
- Abb. 31: Darstellung der ENDOR-Arbeitspunkte für die Winkelselektion nach θ . A: EPR-Spektrum der Probe 102.1 bzw 117.2 (Octarepeat/Cu in H_2O bzw. D_2O und NEM); B: Darstellung der Resonanzpositionen und der Linienbreiten in Abhängigkeit des Winkels θ . Die Arbeitspunkte sind nicht äquidistant gewählt. Sie liegen an jeweils besonders markanten Winkelpositionen (Arbeitspunkte 1, 3, 5, 7, 8 und 9) und schließen einige Zwischenwerte mit ein (Arbeitspunkte 2, 4 und 6)..... 58
- Abb. 32: 3 exemplarische ENDOR-Spektren an den 3 ENDOR-Arbeitspunkten 1, 4 und 8 (siehe Tab. 7). A: 102.1 (Octa in H_2O und NEM); B: 117.2 (Octa in D_2O und NEM); Die durchgezogenen Pfeile bezeichnen Resonanzen austauschbarer Protonen. Gepunktete und gestrichelte Pfeile markieren Stickstoffresonanzen. Aufgrund des schlechten Signal/Rausch-Verhältnisses werden sie nicht weiter interpretiert..... 60
- Abb. 33: 2-Puls ESEEM-Spektrum der Probe 102.1 (Octarepeat/Cu in H_2O und NEM). Parasitäre Signale können nicht unterdrückt werden. Die beiden Pfeile bezeichnen die Resonanzen, die dem His N_ϵ zugeordnet werden..... 62
- Abb. 34: Korrektur von ENDOR-Spektren, die durch resonatorinterne Resonanzen überlagert sind, hier demonstriert für das Spektrum des Arbeitspunktes 6. Das gemessene Spektrum ist mit A bezeichnet (durchgezogen), nach Abzug resonatorinterner Resonanzen (gestrichelt) ergibt sich das korrigierte Spektrum (B)..... 63
- Abb. 35: Auswahl von ENDOR-Spektren: B bezeichnet Spektren der Probe 111.1/115.1 (Octarepeat/Cu in DPC-Micellen) und A die der Probe 102.1 (Octarepeat in H_2O und NEM). Es werden jeweils die Arbeitspunkte 1, 4 und 8 verglichen. Die Pfeile bezeichnen die Resonanzen der Probe 102.1, die einem axialen Wasserliganden zugeordnet werden. Diese Resonanzen sind in den Spektren der Probe 111.1/115.1 nicht sichtbar. 64
- Abb. 36: I: A: experimentelles EXAFS-Spektrum (durchgezogene Linie, grau) und eine Standardanpassung (gestrichelt, schwarz) der Probe 102.1 (Octarepeat/Cu in H_2O und NEM) B: Fourier-Transformierte des EXAFS-Spektrums (durchgezogene Linie, grau) und der Standardanpassung (gestrichelt, schwarz); II: A: EXAFS-Spektrum der Probe 111.1/115.1 (Octarepeat/Cu in DPC-Micellen) B: Fourier-Transformierte des Spektrums 65
- Abb. 37: Einfaches Modell eines Cu-Komplexes, auf dessen Basis eine EXAFS-Anpassung des Spektrums der Probe 102.1 (Octarepeat in H_2O und NEM) versucht wurde. Die Abstände der Liganden vom Cu-Zentrum (schwarze Doppelpfeile) sind Parameter der Anpassung. 66
- Abb. 38: EPR-Spektren von Prion-Protein-Proben. B: 202.2 (HPrP in H_2O und MOPS, pH 7); C: 204.1 (HPrP in H_2O und HEPES, pH 8); zum Vergleich ist auch das Spektrum des Cu-komplexierten Octarepeats in H_2O und NEM (102.1) dargestellt (A)..... 68
- Abb. 39: A: EPR-Spektrum der Probe 202.2 hPrP in H_2O und MOPS. Es ist versucht worden, das Spektrum mit zwei Spezies anzupassen (bezeichnet mit 1 und 2). Spezies 1 tritt mit deutlich höherer Konzentration auf. Durchgezogene bzw. punktierte Pfeile markieren die zu $M_{I\text{Cu}}=3/2$ bzw. die $M_{I\text{Cu}}=1/2$ gehörenden Resonanzen ($\theta=0^\circ$). Die mit gestrichelten Pfeilen bezeichneten Resonanzen stammen von größeren A_\perp -Werten des Hyperfein-Wechselwirkungstensors (siehe auch Abb. 6). B: Aus einer Standardanpassung ergeben sich für Spezies 1 die Parameter: $g_x=2.0600$, $g_y=2.0600$, $g_z=2.2569$, $A_x=4.07$ MHz,

	$A_y = 4.07$ MHz, $A_z = 563.8$ MHz, Linienbreite = 50.0G, Lorentz/Gauss = 0.3, und für Spezies 2 $g_x = 2.0600$, $g_y = 2.0600$, $g_z = 2.2265$, $A_x = 4.07$ MHz, $A_y = 4.07$ MHz, $A_z = 513.3$ MHz, Linienbreite = 50.0G, Lorentz/Gauss = 0.3	69
Abb. 40:	A: EPR-Spektrum (durchgezogen, grau) der Probe 204.1 und Standardanpassung (gestrichelt, schwarz). Die Übereinstimmung ist nicht befriedigend. B: Die Differenz von experimentellem und theoretisch berechnetem Spektrum.....	70
Abb. 41:	^1H ENDOR-Resonanzen der Prion-Protein-Probe 202.2 (HsPrP in H_2O und MOPS) bei den Arbeitspunkten 1, 4 und 8, bezeichnet mit C. Zum Vergleich sind auch die Spektren von 102.2 (Octarepeat in H_2O und NEM), Spektren A, und 117.2 (Octarepeat in D_2O und NEM), Spektren B, dargestellt. Die mit schwarzen Pfeilen markierten Resonanzen werden einem axialen Wassermolekül zugeordnet.....	72
Abb. 42:	A: Vergleich der experimentellen EXAFS-Spektren der beiden humanen Prion-Protein-Proben 202.2 bei pH 7 (gestrichelt) und 204.1 bei pH 8 (durchgezogen); B: Die Fourier-Transformierte der EXAFS-Spektren 202.2 (gestrichelt) und 204.1 (durchgezogen).....	73
Abb. 43:	die Polypeptidkette des Prion-Protein Octapeptids. Bindungen, um die gedreht werden kann, sind fett gezeichnet.	74
Abb. 44:	Basismodell nach Auswertung der EPR-, EXAFS- und ESEEM-Spektren.....	76
Abb. 45:	EXAFS-Spektrum (grau, durchgezogen) der Probe 102.1 und Anpassung (schwarz, gestrichelt) basierend auf den Daten des Basismodells (Abb. 44). Feinheiten des Spektrums, insbesondere das kleine Maximum bei 6\AA^{-1} , können nicht wiedergegeben werden.	76
Abb. 46:	Alle möglichen Stickstoff- und Sauerstoffliganden im Octapeptid des Prion-Proteins mit Ausnahme des als sicher geltenden Liganden N_δ der His-Seitenkette. Die in Frage kommenden Sauerstoffatome sind dunkel unterlegt, die Stickstoffatome hell.	77
Abb. 47:	Alle zur Proteinrückgratgeometrie zusätzlich eingeführten Potentiale. A-F: Darstellung der in Tab. 10 angeführten Potentiale. A: Grobe Einschränkung auf die durch EXAFS gewonnenen Abstände; B: Die Liganden müssen in einer Ebene liegen; C: Auch das Cu-Zentrum darf sich nicht zu weit aus der Ebene entfernen; D: EXAFS-Spektren können nur bei korrektem Winkel $\text{Cu-N}_\delta\text{-N}_\epsilon$ wiedergegeben werden; E: Um die partielle Doppelbindung des Proteinrückgrats kann nicht frei gedreht werden; F: Die Bindungorbitale der sp^2 -hybridisierten Stickstoffe geben einen Bindungswinkel von 120° vor; G: Bei gleichzeitiger Darstellung aller Potentiale wird deutlich, wie stark mögliche Geometrien eingeschränkt werden.	80
Abb. 48:	Dargestellt ist der schematische Ablauf der Modellgeneration exemplarisch für eine der insgesamt 189 möglichen Konfigurationen des Octarepeat/Cu-Komplexes. Die Darstellung des Peptids und des zentralen Cu-Atoms ist nicht maßstabsgerecht.	82
Abb. 49:	EXAFS-Spektrum (grau, durchgezogen) der Probe 102.1 (Octarepeat in H_2O und NEM) und Anpassung des Spektrums (schwarz, gestrichelt) basierend auf einer Struktur mit der Konfiguration His2Nd-Gly3N-Gly4N-Gly4O. Auch Feinheiten des Spektrums können wiedergegeben werden.	86
Abb. 50:	Simulierte ENDOR Spektren auf Basis der Konfiguration His2Nd-Gly3N-Gly4N-Gly4O. Alle Spektren basieren auf demselben Satz von Protonen. Die Ziffern bezeichnen die zugehörigen Arbeitspunkte (Tab. 7).....	87
Abb. 51:	Die Struktur des Octarepeat/Cu-Komplexes des Prion-Protein in NEM (Mentler et al. 2004). Es koordinieren das N_δ des His-Imidazolrings, die Rückgratstickstoffe der Residuen Gly3 und Gly4 und das Carbonylsauerstoffatom von Gly4. Diese Liganden befinden sich in einer Ebene. Den fünften Liganden bildet ein axiales Wassermolekül. Die Seitenkette des Trp6 befindet sich in unmittelbarer Nähe zum Cu-Atom.....	88

Abb. 52: Modell nach Stöckel et al. (1998). Cu wird von zwei Histidin-Imidazolringen unterschiedlicher Octarepeats koordiniert. Außerdem ligandieren zwei Carbonyl-Sauerstoffatome, die Koordinierung besteht aus 2N und 2O.....	92
Abb. 53: Modell nach Viles et al. (1999): Je zwei Cu-Atome werden über His-Imidazolringe verbrückt. Der Amidstickstoff des His und ein Wassermolekül bilden den dritten und vierten Liganden. Es bildet sich ein (Cu-OCTA) ₄ -Komplex.	93
Abb. 54: Modell nach Aronoff-Spencer et al. (2000): Es ligandieren das N _δ des Imidazolrings, die Rückgratstickstoffe des Gly3 und Gly4 und der Carbonylsauerstoff des Trp6, also insgesamt 3N und 1O.	94
Abb. 55: NMR-Struktur nach Luczkowski et al. (2002): Das Cu wird von 6 Atomen koordiniert. N _δ und die Rückgratstickstoffe des Gly3 und des Gly4 bilden die Stickstoffliganden, drei H ₂ O-Moleküle ligandieren das Cu, zwei in planarer eins in axialer Position. Der Komplex hat tetragonale Geometrie.	95
Abb. 56: Stereobild der Kristallstruktur des Pentapeptids HGGGW (Burns et al. 2002): N _δ des Imidazolrings und die Rückgrat-Stickstoffe von Gly3 und Gly4 bilden planare Stickstoffliganden, vierter Ligand ist der Carbonylsauerstoff des Gly4. Axial koordiniert ein H ₂ O. Es wird durch eine Wasserstoffbrückenbindung zur Trp-Seitenkette stabilisiert.	96
Abb. 57: Struktur von N-Ethyl-Morpholin und ähnlicher, oft als Puffer verwendeter Substanzen.....	100
Abb. 58 Aufschlüsselung einer Auswahl von Proben nach Peisach-Blumberg-Korrelationen	112
Abb. 59: Alle aufgezeichneten ENDOR-Spektren der Probe 102.1 (Octarepeat in H ₂ O und NEM). Die Ziffern bezeichnen die Arbeitspunkte 1-9 (Tab. 7).....	114
Abb. 60: Alle aufgezeichneten ENDOR-Spektren der Probe 117.2 (Octarepeat in H ₂ O und NEM). Die Ziffern bezeichnen die Arbeitspunkte 1-9 (Tab. 7).....	115
Abb. 61: Alle aufgezeichneten ENDOR-Spektren der Probe 111.1/115.1 (Octarepeat in H ₂ O und NEM). Die Ziffern bezeichnen die Arbeitspunkte 1-9 (Tab. 7).....	116
Abb. 62: Alle aufgezeichneten ENDOR-Spektren der Probe 202.2 (Octarepeat in H ₂ O und NEM). Die Ziffern bezeichnen die Arbeitspunkte 1-9 (Tab. 7).....	117

Anhang L: Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Überblick über die Formen der Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien (TSE)	2
Tab. 2: Anzahl der BSE-Fälle in Deutschland nach Bundesländern.....	3
Tab. 3: Die verschiedenen Formen der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit. Aufgrund ihrer ähnlichen Pathologie sind sie schwierig voneinander abzugrenzen (Budka 2003; Kretzschmar 2003).....	4
Tab. 4: Literaturwerte für die isotrope Hyperfeinwechselwirkung von Histidin-ligandiertem Cu	21
Tab. 5: Komponenten, die für die EPR-basierten Messungen verwendet wurden.	42
Tab. 6: Übersicht über alle Octapeptidproben, deren chemische Umgebung, die Messungen, die an ihnen ausgeführt worden sind, und der Grund ihrer Präparation bzw. Messung. Die Symbole bedeuten: ✓ :mit guter Statistik gemessen; s:messbar, aber schlechte Statistik, n:Messung nicht möglich, beispielsweise bei zu schnellen Relaxationszeiten bei ENDOR-Spektroskopie.....	52
Tab. 7: Die Arbeitspunkte, deren Magnetfelder und die zugehörige Winkelauswahl nach θ ..	59
Tab. 8: Tabelle der kupferbeladenen humanen Prion-Protein-Proben und Übersicht über alle vorhandenen Messungen. ✓ : mit guter Statistik gemessen; s: messbar, aber schlechte Statistik, o: Messung ist noch nicht durchgeführt; n: Messung aufgrund zu geringer Probenkonzentration nicht durchführbar.....	67
Tab. 9: Einige der verwendeten Potentiale und deren Ursprung.....	78
Tab. 10: Zusätzlich eingeführte Potentiale, welche die Geometrie des Proteinerückgrats und die Symmetrie des Komplexes gewährleisten.....	79
Tab. 11: Ladung Kupferbindungspartner des Octarepeat/Cu-Komplexes zu Beginn der Simulation	81
Tab. 12 Werte der Kraftkonstanten vor und nach dem Temperatursenkungsprozeß.....	83
Tab. 13: Die nach Analyse der EXAFS-Vielfachstreubeiträge mit dem experimentellen EXAFS-Spektrum kompatiblen Konfigurationen.....	85
Tab. 14: Übersicht über bereits veröffentlichte Modellvorschläge. Neben der Publikation (erste Spalte) sind auch die verwendeten Puffersysteme (zweite Spalte) und Methoden (vierte Spalte) angegeben. Die dritte Spalte gibt an welche Peptide untersucht wurden. Sie werden entweder explizit genannt, oder der untersuchte Ausschnitt aus dem Prion-Protein ist in Klammern definiert.....	91
Tab. 15 Auswertung von EPR-Spektren mittels Xemr.	111

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Fritz Parak herzlich für seine stete und konstruktive Unterstützung. Sein Interesse und seine ständige Diskussionsbereitschaft sowie die hervorragenden Arbeitsbedingungen haben viel zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Bei Herrn Prof. Dr. Luis Moroder, Dr. Dominga Deluca, Dr. Stella Fiori und Dr. Christian Renner bedanke ich mich für die Herstellung der Peptidproben. Die wechselseitigen Besuche im Rahmen der Kooperation waren stets durch interessante Diskussionen geprägt.

Prof. Dr. Paul Tavan und Andreas Weiss danke ich für die äußerst fruchtbare Zusammenarbeit bei der Implementation des iterativen Verfahrens zur Strukturverfeinerung.

Mein Dank gilt darüber hinaus Prof. Dr. Hans Kretzschmar und Dr. Uwe Bertsch für die Herstellung der Prion-Protein-Proben und für viele gewinnbringende Diskussionen.

Bei Dr. Wolfram Meyer-Klaucke möchte ich mich für die hervorragende Betreuung und apparative Unterstützung bei den Messzeiten in Hamburg bedanken.

Bei Klaus Grantner und Pablo del Pino bedanke ich mich für das Anfertigen und die Auswertung der EXAFS-Spektren. Sie waren mir nicht nur während der Dienstzeit höchst angenehme Kollegen und Freunde.

Das Arbeitsklima war geprägt von Hilfsbereitschaft und Kooperation. Unter den Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern danke ich besonders Klaus Achterhold, Andreas Ostermann, Andreas Dilg, Alexandra Huenges, Michael Reiner, Christian Zach, Walter Gutscher, Simonetta Croci und Marius Schmidt.

Herzlich danken möchte ich auch Johanna Zotz und Agnes Hann für ihre selbstlose Unterstützung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Manuela Kofelenz, Dagmar Berwanger, Marc Hauchwitz, Eva Greger, Katrin Santer, Wolfgang Woerl, Michael Wolf, Michael Strober und Federica Fratini.

Meinem Vater Dr. Hans Herbert Mentler und meinem Bruder Bernhard danke ich für ihre uneingeschränkte Unterstützung während dieser Zeit.

Lebenslauf

Name: Mentler

Vorname: Matthias

Geburtsort: Füssen

Staatsangehörigkeit: österreichisch

Eltern: Dr. Hans Herbert Mentler und Margit Mentler-Sauerer

Familienstand: ledig, keine Kinder

Bildungsweg:

1979 – 1983	Volksschule Stanzach
1983 - 1992	Bundesrealgymnasium Reutte, Matura
1992-1999	Studium der Technischen Physik an der TU München, Diplom
Seit 1999	Promotion am Lehrstuhl E17 für molekulare Biophysik am Physik-Department der TU München bei Prof. F. G. Parak