

Department Chemie
Institut für Organische Chemie und Biochemie
Lehrstuhl für Biotechnologie

**Das Hefeprion Sup35p-NM:
Assemblierungsformen und der Einfluss zweiwertiger Metallionen**

Simone Hess

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Kai-Olaf Hinrichsen
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Johannes Buchner
2. Univ.-Prof. Dr. Matthias Rief

Die Dissertation wurde am 23. Mai 2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 26. Juni 2007 angenommen.

<u>1</u>	<u>Einleitung</u>	<u>1</u>
1.1	Amyloide Proteine	1
1.1.1	Strukturelle Eigenschaften von Amyloiden	1
1.1.2	Bildung amyloider Fibrillen und anderer Assemblierungsformen	2
1.1.3	Proteinfaltungskrankheiten	6
1.1.4	Funktionelle Amyloide	6
1.1.5	Ursachen der Amyloidentstehung	7
1.2	Prionen	9
1.2.1	Prionen in Säugetieren	9
	Eigenschaften	9
	PrP ^C und Kupfer	11
	PrP ^{Sc} und Kupfer	12
1.2.2	Prionen in Hefen und anderen Pilzen	13
	Eigenschaften und Funktionen	13
	Sup35p und [PSI ⁺]	14
1.3	Zielsetzung	17
<u>2</u>	<u>Material und Methoden</u>	<u>18</u>
2.1	Materialien	18
2.1.1	Chemikalien	18
2.1.2	Größenstandards und Kits	19
2.1.3	Proteine	19
2.1.4	Bakterienstämme und Plasmide	20
2.1.5	Sonstige Materialien	20
2.1.6	Geräte	21
2.1.7	Computerprogramme	22
2.1.8	Medien, Puffer und Lösungen	23
2.2	Molekularbiologische Arbeitstechniken	24
2.2.1	Anzucht und Aufbewahrung von <i>E. coli</i>	24
2.2.2	Transformation von <i>E. coli</i>	24
2.3	Expression und Reinigung	25
2.3.1	Anzucht, Induktion und Ernte der Bakterien	25
2.3.2	Proteinreinigung	25
2.4	Proteinanalytik	27
2.4.1	Konzentrationsbestimmung	27
	UV-Absorptionsspektroskopie	27
	Bradford Assay	28
2.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	28

2.4.3	Färbung von Proteingelen	29
	Coomassie-Färbung	29
	Färbung mit SYPRO® Ruby	29
2.4.4	Immunoblotting	30
2.4.5	Assemblierung amyloider Fibrillen	30
	Fibrillenbildung	30
	Herstellung von <i>Seeds</i>	31
2.4.6	Detektion amyloider Fibrillen	32
	Kongo Rot	32
	Thioflavin T	32
	Acrylodan	33
2.4.7	Filamentseparation	33
2.4.8	Saccharosegradient	34
2.4.9	Stabilitätsuntersuchungen	34
	SDS-Stabilität	34
	Proteasestabilität	35
2.4.10	Fluoreszenz-Spektroskopie	35
2.4.11	Circulardichroismus-Spektroskopie	36
2.4.12	Fourier-Transformierte Infrarot Spektroskopie	38
2.4.13	Ultraschall-Resonator-Technologie	38
2.4.14	Isotherme Titrationskalorimetrie	40
2.4.15	Elektronenspinresonanz	41
2.4.16	Flussfeldflussfraktionierung und statische Lichtstreuung	41
2.4.17	Rasterkraftmikroskopie	43
2.4.18	Transmissionselektronenmikroskopie	44
2.4.19	Röntgenbeugungsanalyse	44
3	<u>Ergebnisse</u>	46
3.1	Rasterkraftmikroskopische Charakterisierung amyloider PABPN1-Fibrillen	46
3.1.1	Einführung	46
3.1.2	Rasterkraftmikroskopische Untersuchung von N-WT- und N-(+7)Ala-Fibrillen	47
3.2	Untersuchung der Assemblierungseigenschaften und -formen der Hefepriondomäne Sup35p-NM	50
3.2.1	Lösliches Sup35p-NM	50
3.2.2	Amyloide Sup35p-NM-Fibrillen	52
	Fibrillenassemblierung	52
	Analyse der Sekundärstruktur der Fibrillen	55
	Analyse der Fibrillenmorphologie	56
	Struktureller Vergleich von amyloiden Sup35p-NM-Fibrillen mit Nanofibrillen synthetischer Spinnenseide	58

3.2.3	Sup35p-NM-Filamente	61
	Entdeckung	61
	Analyse der Sekundärstruktur der Filamente	63
	Stabilität der Filamente	65
	Assemblierungseigenschaften der Filamente	66
3.2.4	Einfluss zweiwertiger Metallionen	69
	Nachweis der Bindung von Metallionen an Sup35p-NM	69
	Einfluss von Metallionen auf die Fibrillenbildung	73
	Einfluss von Metallionen auf die Fibrillenstruktur	75
	Einfluss von Metallionen auf die Fibrillenstabilität	77
	Einfluss von Metallionen auf nicht-fibrilläre Assemblierungsformen	78
4	<u>Diskussion</u>	82
4.1	Rasterkraftmikroskopische Charakterisierung amyloider PAPBN1-Fibrillen	82
4.2	Struktureller Vergleich von amyloiden Sup35p-NM-Fibrillen mit Nanofibrillen synthetischer Spinnenseide	83
4.3	Charakterisierung von Sup35p-NM-Filamenten	84
4.4	Untersuchung des Einflusses zweiwertiger Metallionen auf Sup35p-NM	86
4.4.1	Bindung von Metallionen an Sup35p-NM	86
4.4.2	Einfluss von Metallionen auf die Assemblierungseigenschaften von Sup35p-NM	87
4.4.3	Mögliche Bindestellen für Metallionen an Sup35p-NM	90
	<u>Zusammenfassung</u>	92
	<u>Literatur</u>	94
	<u>Abkürzungen</u>	104
	<u>Publikationen</u>	106

1 Einleitung

1.1 Amyloide Proteine

Der Begriff „amyloid“ wurde erstmals von Robert Virchow 1854 verwendet und beschreibt unlösliche fibrilläre Proteinaggregate. Der historische Ursprung des Wortes „amyloid“ basiert auf einem wissenschaftlichen Irrtum: amyloide Aggregate können wie Stärke mit Jod angefärbt werden und wurden daher fälschlicherweise als stärkeähnlich eingestuft (*amylon* = griech. für Stärke). Während früher der Ausdruck „amyloid“ nur für die bei vielen Krankheiten auftretenden extrazellulären Ablagerungen verwendet wurde, bezieht er sich heutzutage allgemein auf fibrillär strukturierte Proteine mit definierten Eigenschaften (Xing & Higuchi, 2002).

1.1.1 Strukturelle Eigenschaften von Amyloiden

Amyloide Fibrillen sind stabile, lang gestreckte und unverzweigte Proteinfasern mit einem Durchmesser von 6-12 nm. Sie bestehen in der Regel aus mehreren Protofilamenten (meist 2-6), die jeweils eine Höhe von 2-5 nm haben. Durch Röntgenbeugungsanalysen konnte die Struktur der Protofilamente und der amyloiden Fibrillen identifiziert werden. Die Struktur besteht aus einer β -Faltblatt-reichen *Cross- β* Konformation, bei der die β -Faltblätter parallel zur Fibrillenachse liegen, und die β -Stränge senkrecht zur Fibrillenachse angeordnet sind (Serpell *et al.*, 1997; Sunde *et al.*, 1997) (Abbildung 1-1). Gängige Nachweismethoden für amyloide Fibrillen sind die spezifische Bindung der Farbstoffe Thioflavin T und Kongo Rot und die durch letzteren unter polarisiertem Licht hervorgerufene apfelgrüne Doppelbrechung (Chiti & Dobson, 2006; Scheibel & Buchner, 2006).

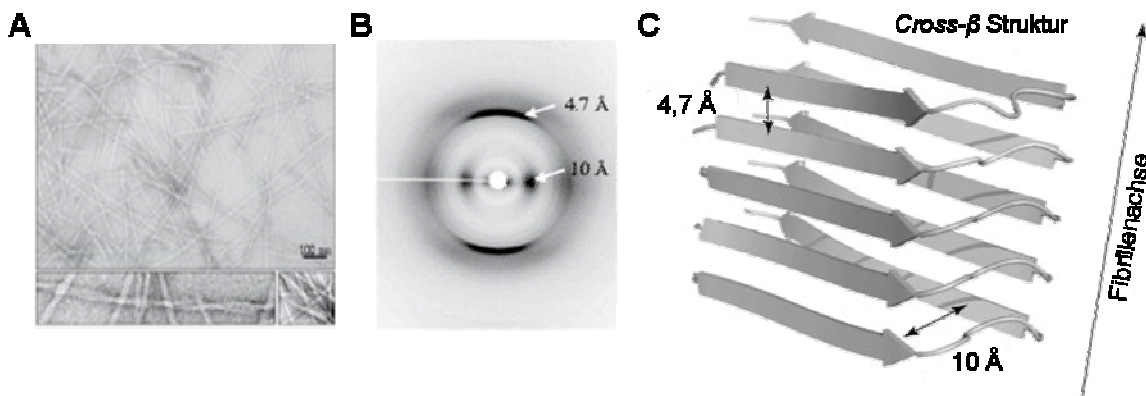


Abbildung 1-1 Struktur amyloider Fibrillen. (A) TEM-Aufnahme (Negativkontrastierung) von Fibrillen des Insel-Amyloid-Polypeptids (IAPP). Durch stärkere Vergrößerung können auch einzelne Protofilamente erkannt werden (unten). (B) Röntgenbeugungsmuster von Fibrillen des Alzheimer Peptids A β mit charakteristischen Reflexionen bei 4,7 und 10 Å. Die meridionale Reflexion bei 4,7 Å steht dabei für den Abstand zwischen den einzelnen β -Faltblattsträngen, die äquatoriale Reflexion bei 10 Å spiegelt den Abstand zwischen den einzelnen β -Faltblättern der *Cross- β* Struktur wider. (C) Modell der charakteristischen *Cross- β* Struktur von A β -Fibrillen (nach Fowler *et al.*, 2007).

1.1.2 Bildung amyloider Fibrillen und anderer Assemblierungsformen

Die genauen Bedingungen, die ein nativ gefaltetes Protein dazu veranlassen amyloide Strukturen zu bilden, sind noch weitgehend ungeklärt. Untersuchungen der letzten Jahre zufolge zeigen amyloide Fibrillen eine Konformation, die jedes Protein unter bestimmten Bedingungen aufgrund der Eigenschaften des Polypeptidrückgrats annehmen kann (Dobson, 2004; Guijarro *et al.*, 1998). Unterstützt wird diese Behauptung durch die Vielzahl und Vielfältigkeit bekannter Proteine und Peptide, die, trotz ihrer unterschiedlichen physiologischen Funktion, Größe, Aminosäuresequenz und nativen Struktur, amyloide Fibrillen mit gemeinsamen Eigenschaften bilden können (Dobson, 2004).

In den meisten Fällen handelt es sich bei amyloiden Fibrillen um assemblierte, nicht korrekt gefaltete Proteine. Die Faltung einer Polypeptidkette ist ein komplexer Vorgang. Durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, von hydrophoben und elektrostatischen Wechselwirkungen sowie von van-der-Waals Kräften versucht die Polypeptidkette eine thermodynamisch stabile Konformation mit einem Minimum an freier Energie zu erreichen. Die gesamte Information für die native dreidimensionale Struktur eines Proteins ist dabei intrinsisch durch die Eigenschaften der Aminosäuresequenz festgelegt (Anfinsen, 1973). Abbildung 1-2 zeigt ein Schema des Energieprofils der Proteinfaltung basierend auf dem Modell eines Faltungstrichters. Der Weg vom ungefalteten zum nativ gefalteten Protein (Abbildung 1-2, hellblauer Trichter) verläuft meist über verschiedene partiell stabilisierte

Faltungsintermediate. Unter bestimmten Bedingungen kann es jedoch zu Fehlfaltung und Aggregation des Proteins kommen (Abbildung 1-2, dunkelblauer Trichter). Die amyloide Fibrille stellt dabei global die thermodynamisch stabilste Form dar, die ein Protein erreichen kann. Die molekularen Mechanismen der Initiation der Fehlfaltung können vielfältig sein und sind noch nicht genau bekannt (Jahn & Radford, 2005).

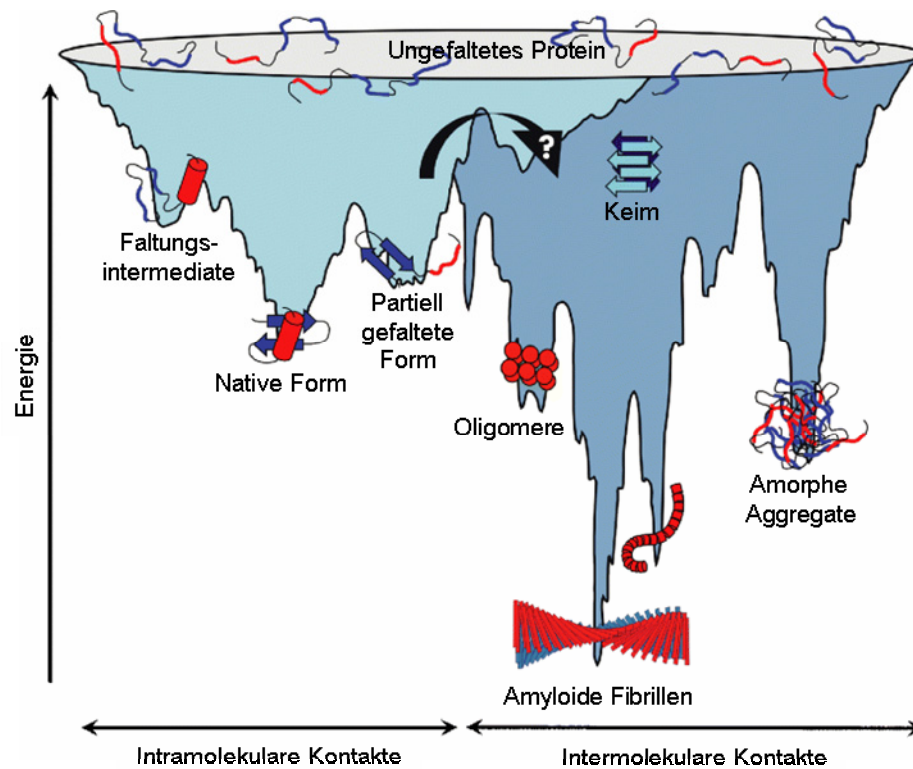


Abbildung 1-2 Energieprofil der Proteinfaltung und -aggregation basierend auf dem Modell eines Faltungstrichters. Ein ungefaltetes Protein hat eine Vielzahl von Faltungsmöglichkeiten. Durch intramolekulare Kontakte kommt es, oft über ein oder mehrere Intermediate, zur Ausbildung der kinetisch und energetisch stabilen nativen Konformation. Unter bestimmten (meist noch unbekannt) Bedingungen können sich durch intermolekulare Kontakte energetisch stabilere Strukturen bilden, zu denen auch amyloide Fibrillen gehören (nach Jahn & Radford, 2005).

Die Bildung amyloider Fibrillen ist ein mehrstufiger Prozess, bei dem ebenfalls verschiedene intermediäre Assemblierungsformen auftreten können. Zum besseren Verständnis ist die Nomenklatur aller Assemblierungsformen in Box 1-1 aufgeführt.

Amyloide Fibrille: Amyloide Fibrillen sind relativ gerade, unverzweigte Proteinfibrillen, mit einem Durchmesser von 6-12 nm. Sie bestehen meist aus mehreren Protofilamenten (s. u.), die sich um die Fibrillenachse winden. Sie zeichnen sich durch a) *Cross-β* Röntgenbeugungsmuster, b) β -Faltblatt-reiche CD- und FTIR-Spektren, c) hohe Stabilität und d) Bindung der Farbstoffe Thioflavin T und Kongo Rot aus.

Aggregationskeim (Nukleus): In dem gängigen Modell der Fibrillenbildung (*nucleated growth polymerization*), stellt der Nukleus einen selten vorkommenden instabilen Proteinübergangszustand dar, welcher die Kinetik der Amyloidbildung bestimmt.

Oligomer: Ein Oligomer ist ein initial gebildetes metastabiles Multimer eines Proteins. Obwohl einige Protofibrillen (s. u.) als Oligomere bezeichnet werden, ist der Ausdruck „Oligomer“ besser geeignet, um kleine nicht-fibrilläre Assemblate zu bezeichnen.

Protofibrille: Dieser Begriff wird für nicht-sphärische, filamentäre Strukturen verwendet, denen eine periodische Substruktur fehlt. Diese treten oft als Intermediate bei der Assemblierung amyloider Fibrillen auf. Da kurze amyloide Fibrillen fälschlicherweise für Protofibrillen gehalten werden können, sind neben morphologischen auch strukturelle Untersuchungen nötig, um diese Strukturen bestimmen zu können.

Protofilament: Als Protofilamente werden die elektronenmikroskopisch sichtbaren Untereinheiten von amyloiden Fibrillen bezeichnet, die sich als Einzelstränge um die Fibrillenachse winden.

Seed: *Seeds* sind stabile Assemblate (in der Regel kurze amyloide Fibrillen), die als Wachstumskeim für amyloide Fibrillen dienen.

Box 1-1 Nomenklatur der Assemblierungsformen amyloider Proteine (nach Kodali & Wetzel, 2007).

Es wird postuliert, dass es sich bei der Amyloidassemblierung um eine keimbildungsabhängige Polymerisation (*nucleated growth polymerization*) handelt. Zu Beginn der Assemblierungsreaktion ändert sich die Konformation des Monomers von seiner nativen zu einer (teilweise) fehlgefalteten Struktur, was die Bildung von instabilen Aggregationskeimen zur Folge hat (Abbildung 1-3). Die Keime induzieren durch Anlagerung von weiterem monomerem Protein die Assemblierung amyloider Fibrillen. Die Keimbildung stellt den Geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Amyloidassemblierung dar. Sobald Keime vorhanden sind wird die Fibrillenbildung initiiert. Durch die Fragmentierung von Fibrillen können *Seeds* entstehen, die die Fibrillenbildung als zusätzliche „Keime“ beschleunigen (Caughey & Lansbury, 2003; Harper & Lansbury, 1997; Kodali & Wetzel, 2007; Wetzel, 2006; Xing & Higuchi, 2002).

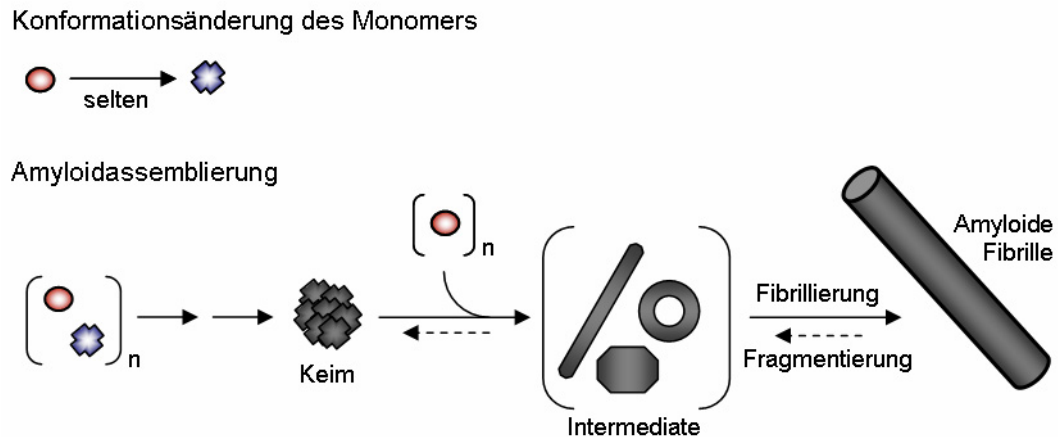


Abbildung 1-3 Modell des Mechanismus der Amyloidbildung. Nach einer Konformationsänderung von nativem monomerem Protein kommt es zur Ausbildung eines Aggregationskeimes. Dieser induziert in Anwesenheit von weiterem löslichem Protein die Fibrillenassemblierung. Der Fibrillierung kann dabei die Bildung von einem oder mehreren Intermediaten vorausgehen. Weitere als „Keime“ fungierende *Seeds* können auch durch die Fragmentierung bereits bestehender Fibrillen gebildet werden (modifiziert nach Caughey & Lansbury, 2003; Wetzel, 2006; Xing & Higuchi, 2002).

Für viele Amyloide wurden Intermediate beschrieben, die in verschiedenen Formen vorliegen können, als filamentäre, globuläre oder auch ringförmige Strukturen (Caughey & Lansbury, 2003, Chiti & Dobson, 2006). Die filamentären Intermediate, welche Protofibrillen genannt werden, gehören zu den am besten charakterisierten intermediären Assemblierungsformen. Sie besitzen wie amyloide Fibrillen β -Faltblatt-Struktur und haben einen Durchmesser von 2-8 nm, sind aber meist kürzer und weniger stabil (Harper *et al.*, 1997; Kheterpal *et al.*, 2006; Serpell, 2000; Walsh *et al.*, 1997).

Neben den Protofibrillen wurden auch Faltungsintermediate amyloider Proteine beschrieben, die nicht zu amyloiden Fibrillen führen, also *off-pathway*, entstehen (Baskakov *et al.* 2002; Collins *et al.* 2004; Gosal *et al.*, 2005). Diese Intermediate können in fibrillärer Form vorliegen, unterscheiden sich aber in ihren Eigenschaften signifikant sowohl von Protofibrillen als auch von amyloiden Fibrillen (Baskakov *et al.*, 2002; Gosal *et al.*, 2005).

Lange wurde angenommen, dass es sich bei amyloiden Fibrillen um die toxische Proteinform handelt, die für die Entstehung bestimmter Proteinfaltungskrankheiten, den sog. Amyloidosen, verantwortlich ist. In letzter Zeit verdichten sich allerdings die Hinweise, dass nicht die amyloiden Fibrillen, sondern Protofibrillen für die Zellen toxisch sind (Lashuel & Lansbury, 2006). So konnte zum Beispiel mit konformationsspezifischen Antikörpern gegen protofibrilläres A β dessen Toxizität, und auch die anderer protofibrillärer Proteine, unterdrückt werden (Kayed *et al.*, 2003).

1.1.3 Proteinfaltungskrankheiten

Die Fehlfaltung von Proteinen wird *in vivo* normalerweise durch die komplexe Proteinfaltungsmaschinerie der Zelle verhindert. Eine Vielzahl von molekularen Faltungshelfern, den Chaperonen, ist dafür verantwortlich, dass Polypeptidketten korrekt gefaltet werden. Sie schützen vor Aggregation, erleichtern die Rückfaltung oder unterstützen den proteolytischen Abbau von irreparablen Proteinen. Durch Fehler in der zellulären Proteinqualitätskontrolle kann es zu Fehlfaltungen und Funktionsverlust von Proteinen kommen, was zu intra- oder extrazellulären Ablagerungen aggregierter Proteine führen kann. Bei Amyloidosen konnten Ablagerungen amyloider Fibrillen detektiert werden. Zu den bekanntesten Amyloidosen gehören die Alzheimer Krankheit, Parkinson Krankheit, Typ II Diabetes, Chorea Huntington oder die Prionkrankheiten (Jahn & Radford, 2005; Scheibel & Buchner, 2006).

In vielen Fällen führt nicht nur ein Defekt der Proteinqualitätskontrolle zur Ausbildung amyloider Fibrillen, auch extrazelluläre Faktoren oder Mutationen können dabei eine Rolle spielen. So wird zum Beispiel die okulopharyngeale Muskeldystrophie (OPMD), eine autosomal-dominant vererbte Krankheit, von einer kurzen GCG-Trinukleotid-Expansion im aminoterminalen Teil des Poly(A)-bindenden Proteins 1 (PABPN1) verursacht. Die natürliche Polyalaninsequenz (bestehend aus zehn Alaninen) liegt dabei um bis zu sieben Alanine verlängert vor. Intranukleäre fibrilläre Aggregate, bestehend aus PABPN1, wurden bei OPMD-Patienten gefunden. Folgen von OPMD sind vor allem Schluckprobleme, herabhängende Augenlider und Muskelschwäche der Gliedmaßen (Scheuermann *et al.*, 2003).

1.1.4 Funktionelle Amyloide

Neben den pathogenen Amyloiden werden immer mehr Proteine identifiziert, die amyloide Fibrillen mit biologischer Funktion ausbilden. Solche amyloiden Proteine kommen sowohl bei Bakterien, Pilzen und Insekten, als auch beim Menschen vor. Sie werden meist als strukturelle oder regulatorische Komponenten oder zur Übertragung von genetischer Information auf nicht-Mendelschem Weg (funktionelle Prionen) verwendet. Die bekanntesten funktionellen Amyloide sind zusammen mit ihrer biologischen Funktion in Tabelle 1-2 zusammen gefasst.

Protein	Organismus	Funktion
Curlin	Bakterien (<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella spp.</i>)	Bildung von Biofilm, Bindung an Oberflächenproteine des Wirts
Chaplin	Bakterien (<i>Streptomyces coelicolor</i>)	Erniedrigung der Oberflächenspannung des umgebenden Wassers zur Ausbildung eines Luftmycel
Ure2p	Hefen (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Regulation des Stickstoffkatabolismus (Prion)
Sup35p	Hefen (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Regulation des Überlesens von Stopp-Codons während der Proteinbiosynthese (Prion)
Hydrophobin	Pilze (<i>Neurospora crassa</i>)	Erniedrigung der Oberflächenspannung des umgebenden Wassers zur Ausbildung eines Luftmycel
Het-s	Pilze (<i>Podospora anserina</i>)	Regulation der Heterokaryoninkompatibilität (Prion)
CPEP	Meeresschnecke (<i>Aplysia californica</i>)	Förderung der Langzeiterhaltung synaptischer Änderungen zur Gedächtnisbildung (Prion)
Chorion Proteine	Insekten und Fische	Strukturelle und schützende Funktion in der Eihülle
Spidroin	Spinnen (<i>Nephila edulis</i>)	Bestandteil von Seidenfäden
Pmel17	Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	Bildung von fibrillären Strukturen zur Assemblierung von Melanin granula in Melanosomen

Tabelle 1-1 Funktionelle Amyloide (nach Fowler *et al.*, 2007; Chiti & Dobson, 2006).

Aufgrund der möglichen Toxizität amyloider Fibrillen und ihrer intermediären Vorstufen muss die zelluläre Herstellung funktioneller Amyloide genau reguliert werden. Dabei haben verschiedene Organismen unterschiedliche Mechanismen entwickelt. Hefen regulieren die Prionassemblierung mit Hilfe von molekularen Chaperonen (Uptain & Lindquist, 2002), während Pmel17 beim Menschen erst nach proteolytischer Spaltung des Volllängenproteins zu Fibrillen assemblieren kann (Fowler *et al.*, 2007). Eine kontrollierte schnelle Fibrillenbildungsreaktion kann zudem die Konzentration möglicher Intermediate verringern und dadurch toxische Nebenwirkungen verhindern (Fowler *et al.*, 2006).

1.1.5 Ursachen der Amyloidentstehung

Obwohl die Ausbildung amyloider Strukturen primär von den Eigenschaften des Polypeptidrückgrats, die für alle Peptide und Proteine gleich sind, abhängt (Dobson, 2004; Guijarro *et al.* 1998), wurden nur bestimmte Proteine als Amyloide *in vivo* identifiziert. Die genauen molekularen Mechanismen der Induktion der Amyloidentstehung sind noch weitgehend unbekannt. Essentiell dafür scheinen aber entfaltete Regionen zu sein, die entweder schon in der nativen Struktur des Proteins vorkommen oder durch Destabilisierung

der nativen Form aufgrund von Mutationen oder äußeren Faktoren entstehen (Uversky & Fink, 2004). Aber nicht nur die partielle Entfaltung von Proteinen, sondern auch eine Induktion der Aggregation kann durch äußere Faktoren und Mutationen hervorgerufen werden.

Eine große Rolle bei der Amyloidentstehung spielt die Aminosäuresequenz. Eine Reihe amyloider Krankheiten wird von Trinukleotidexpansionen verursacht. Sie resultieren in der Verlängerung einer Polyaminosäuresequenz in dem entsprechenden Protein. Bei den bisher bekannten Krankheiten sind die Triplets der Aminosäuren Alanin und Glutamin betroffen. Prominentestes Beispiel ist die Verlängerung einer Polyglutaminsequenz des Proteins Huntingtin, das die Krankheit Chorea Huntington verursacht (Everett & Wood, 2004). Eine expandierte Polyalaninsequenz wird u. a. bei der OPMD als Krankheitsursache vermutet (Scheuermann *et al.*, 2003). Polyalaninmotive sind auch in Spinnenseidenproteinen vorhanden und sind für die Ausbildung stabiler β -Faltblatt-reicher Strukturen verantwortlich (Vollrath & Knight, 2001). Neben Trinukleotidexpansionen können auch Bereiche mit hydrophoben oder ungeladenen Aminosäuren zur Aggregation eines Proteins beitragen. Dagegen wirken Aminosäuren wie Glycin und Prolin der Amyloidbildung entgegen (Chiti & Dobson, 2006).

Bei Prionen in Hefen ist eine Glutamin- und Asparagin-reiche Region, z. T. in Verbindung mit Oligopeptidwiederholungen (s. a. 1.2.2), für die Amyloidentstehung verantwortlich. Dabei scheint vor allem die Aminosäurezusammensetzung und weniger die Sequenz eine Rolle zu spielen (Ross *et al.*, 2005).

Neben intrinsischen Faktoren, wie der Aminosäuresequenz und -zusammensetzung, können auch externe Faktoren die Amyloidbildung beeinflussen. Metallionen scheinen dabei eine wichtige Rolle zu spielen. Die Fähigkeit spezifisch Metallionen zu komplexieren ist eine Eigenschaft verschiedener amyloider Proteine und wird oft einer möglichen physiologischen Funktion zugeschrieben. Der Einfluss der Metallbindung auf das Aggregationsverhalten amyloider Proteine wird seit einiger Zeit u. a. bei Prionkrankheiten, der Alzheimer Krankheit oder der Parkinson Krankheit diskutiert. Allerdings konnte noch nicht eindeutig geklärt werden, ob Metallionen die Amyloidbildung positiv oder negativ beeinflussen (Brown & Kozlowski, 2004; Cerpa, 2005).

1.2 Prionen

Zu einer besonderen Form der Amyloidosen gehören die Prionkrankheiten. Auch als transmissible spongiforme Enzephalopathien (TSE) bekannt sind sie im Gegensatz zu den anderen amyloiden Krankheiten zusätzlich infektiös. Zu den TSEs gehört die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) bei Rindern, Scrapie bei Schafen oder die neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (nvCJK) beim Menschen. Diese Krankheiten zeichnen sich durch fortschreitende Demenz, Ataxie, spongiformer Degeneration des Gehirns, Astrogliose und der Bildung amyloider Plaques aus (Prusiner, 1998; Scheibel & Buchner, 2006). Schon 1967 hatte Griffith das infektiöse Agens von Scrapie als Protein bestimmt (Griffith, 1967). Doch erst 1982 konnte Prusiner zeigen, dass das pathogene Protein in den infizierten Organismen zusammen mit einem zelleigenen Protein mit derselben Primärstruktur, jedoch in einer anderen Isoform, existierte. Sowohl für das zelluläre Protein als auch das infektiöse prägte er den Begriff „Prion“ für „*proteinaceous infectious particle*“ und postulierte den „*protein-only*“-Mechanismus der Prionenerkrankungen, der für das übertragene infektiöse Pathogen die Beteiligung weiterer Komponenten wie Nukleinsäuren ausschließt (Prusiner, 1982). Mittlerweile sind auch nicht-infektiöse Prionkrankheiten bekannt, die spontan auftreten (sporadische CJK) oder durch Mutationen in dem Gen, welches das Prionprotein codiert, verursacht werden (familiäre CJK, fatale familiäre Insomnie, Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom).

1.2.1 Prionen in Säugetieren

Eigenschaften

Das Säugerprion PrP ist ein membrangebundenes extrazelluläres Glykoprotein, das vor allem im zentralen Nervensystem vorkommt (Prusiner, 1998). Durch posttranslationale Modifikationen wird das Sekretionssignalpeptid, bestehend aus den ersten 22 Aminosäuren, entfernt und das reife PrP (Aminosäuren 23-231) gebildet (Abbildung 1-4). PrP₂₃₋₂₃₁ ist über ein Glykosylphosphatidylinositol am Carboxyterminus an der äußeren Zellmembran verankert. Die normale zelluläre Form von PrP wird als PrP^C (C von *cellular*), und die pathogene für TSE verantwortliche Form als PrP^{Sc} (Sc von Scrapie) bezeichnet. PrP^C unterscheidet sich von PrP^{Sc} nur bezüglich seiner strukturellen Konformation. NMR-Untersuchungen von rekombinantem humanem PrP^C zeigten, dass die carboxyterminale Region, beginnend mit Aminosäure 120, mit drei α -Helices und zwei kurzen β -Faltblättern

eine globuläre α -helikale Faltung aufweist (Zahn *et al.*, 2000). Im Gegensatz zum carboxyterminalen Bereich ist der aminoterminal bis Aminosäure 110 unstrukturiert (Donne *et al.*, 1997). Diese aminoterminal Domäne beinhaltet 4-5 Wiederholungen der Aminosäuresequenz PHGGGWGQ, die sich zwischen den Aminosäuren 51-90 befinden. Interessanterweise ist diese Region der in allen Organismen am stärksten konservierte Bereich des Prionproteins (Wopfner *et al.*, 1999).

Die Oktapeptidregion scheint allerdings nicht direkt an der Amyloidbildung beteiligt zu sein. Nur das Fragment PrP₉₀₋₂₃₀ ist in infektiösem PrP gegen proteolytischen Verdau mit Proteinase K resistent. Für die strukturelle Anordnung dieses Fragments in amyloiden Fibrillen wurden verschiedene Modelle postuliert, die alle die Hypothese unterstützen, dass der Bereich, in dem die erste Helix liegt, für die Konformationsänderung von PrP^C zu PrP^{Sc} verantwortlich ist (Govaerts *et al.*, 2004; Lee & Eisenberg, 2003; Vendrely & Scheibel, 2006). Inwieweit die Ausbildung der Disulfidbrücke zwischen der zweiten und dritten Helix für die Fibrillenbildung benötigt wird, ist noch nicht vollständig geklärt (Lee & Eisenberg, 2003; Welker *et al.*, 2002).

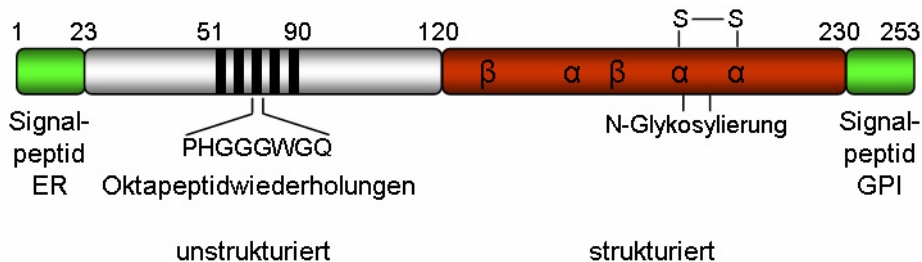


Abbildung 1-4 Schema des Säugetierprions PrP. Der strukturierte carboxyterminale Bereich von PrP (rot; Aminosäure 121-230) besitzt drei α -helikal gefaltete Regionen, zwei kurze β -Faltblätter, eine Disulfidbrücke und zwei Glykosylierungsstellen. Im unstrukturierten aminoterminalen Bereich (grau; Aminosäure 23-120) befinden sich Oktapeptidwiederholungen. Die amino- und carboxyterminalen Signalpeptide, welche im Verlauf der zellulären Prozessierung abgespalten werden, sind grün dargestellt.

Eine physiologische Funktion von PrP^C ist allerdings noch nicht bekannt, wobei besonders die Kupferbindung kontrovers diskutiert wird.

PrP^C und Kupfer

Die Interaktion von zweiwertigen Kupferionen mit PrP^C findet vor allem in der stark konservierten aminoterminalen Oktapeptidregion statt (Brown *et al.*, 1997; Hornshaw *et al.*, 1995; Viles *et al.*, 1999) (Abbildung 1-5A). Dabei kann pro Oktapeptid maximal ein Kupferion komplexiert werden. Die Kupferkoordination ist abhängig von der Kupferkonzentration. Bei hoher Kupferkonzentration wird ein Cu²⁺ über ein Stickstoffatom des Imidazolrings des Histidins, und über zwei weitere Stickstoffatome und einem Sauerstoffatom der folgenden Glycine mit einer Dissoziationskonstanten (K_D) von 7-12 μM komplexiert. Die für diese Bindung benötigte minimale Sequenz ist HGGGW (Burns *et al.*, 2002; Chattopadhyay *et al.*, 2005). Bei mittlerer Kupferkonzentration wird jedes Cu²⁺ von zwei Histidinen angrenzender Oktapeptide gebunden, wobei sich zwischen den Histidinen große „Schlaufen“ ausbilden. Ist die Kupferkonzentration niedrig, sind mehrere Histidin-Seitenketten an der Komplexierung beteiligt, wobei ein K_D von 0,12 nM erreicht wird (Chattopadhyay *et al.*, 2005) (Abbildung 1-5B).

Neben diesen Oktapeptid-Bindestellen sind noch zwei weitere Kupferbindestellen, die His 96 und His 111 beinhalten, detektiert worden (Burns *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2005a). Im Gegensatz zur Oktapeptidregion, welche hoch spezifisch für Cu²⁺ ist (Garnett & Viles, 2003; Stockel *et al.*, 1998), werden hier auch andere zweiwertige Metallionen wie Nickel, Zink und Mangan unter Beteiligung des Imidazolrings des entsprechenden Histidins und des Aminoterminus komplexiert (Brown *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2005a).

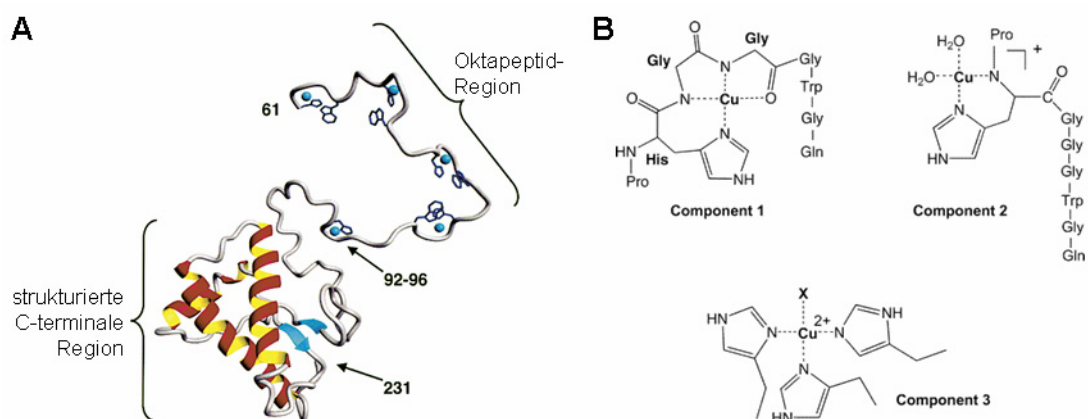


Abbildung 1-5 Kupferbindung an PrP. (A) Strukturelles Modell von Cu²⁺-komplexierendem PrP. Jedes Oktapeptid bindet ein Cu²⁺ (hellblaue Kugel). Zusätzlich kann Cu²⁺ außerhalb der Oktapeptidregion von His 96 (und His 111; hier nicht gezeigt) komplexiert werden (Burns *et al.*, 2003). (B) Verschiedene Cu²⁺-Bindemotive der Oktapeptidregion in Abhängigkeit von der Cu²⁺-Konzentration: *Component 1* liegt bei Cu²⁺-Sättigung, *Component 2* bei etwas niedrigeren Cu²⁺-Konzentrationen und *Component 3* bei geringer Cu²⁺-Verfügbarkeit vor (Chattopadhyay *et al.*, 2005).

Viele Forschungsergebnisse der letzten Jahre deuten darauf hin, dass die Fähigkeit von PrP^C spezifisch Kupfer zu binden zum Schutz von Neuronen benötigt wird. So sind Wildtyp-Nervenzellen im Vergleich zu PrP-Knockout-Zellen sehr viel resistenter gegenüber schädlichen Oxidationsreaktionen, die von Kupfer oder reaktiven Sauerstoffspezies hervorgerufen werden. Transgene Mäuse, denen PrP fehlt, zeigen im Alter großflächige Gewebeschäden, welche vor allem auf Oxidation von Proteinen und Lipiden zurückzuführen sind. Dennoch ist die genaue Funktion von PrP^C, die zum Schutz von Neuronen führt, noch nicht genau geklärt. Es wurde von Daniels und Brown postuliert, dass PrP^C als neuronale Superoxiddismutase (SOD) fungiert, welche O²⁻ zu Peroxid und O₂ umwandelt (Daniels & Brown, 2002). Allerdings konnte dies von anderen Laboratorien nicht bestätigt werden (Hutter *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2005b). Es wurde für PrP auch eine Beteiligung am endozytotischen Transport von Kupfer, an der Kupfer-Pufferung, Signaltransduktion, Apoptos suppression, Kupfer-Reduktion und an der Nervenzellentwicklung beschrieben (Millhauser, 2007), die genaue physiologische Funktion wurde jedoch noch nicht geklärt.

PrP^{Sc} und Kupfer

Untersuchungen, die klären sollten, ob es eine Verbindung zwischen der Kupferbindung und der strukturellen Umwandlung von PrP^C zu PrP^{Sc} gibt, lieferten kontroverse Ergebnisse. Zum Beispiel ist die Bindung von Kupfer an die Oktapeptidregion für die Infektiosität der Prionen nicht zwingend notwendig (Flehsig *et al.*, 2000). Die Behandlung von extrahiertem PrP^C mit Kupfer führt jedoch zur Ausbildung einer proteaseresistenten PrP-Form, möglicherweise eine Übergangsform während der Assemblierung von PrP^{Sc} (Quaglio *et al.*, 2001). Andererseits verlangsamt die Zugabe von Kupfer *in vitro* die Amyloidbildung stark, was auf eine Hemmung der PrP^{Sc}-Bildung hinweist (Bocharova *et al.*, 2005).

Nicht nur der Effekt von Kupfer, auch der Einfluss anderer zweiwertiger Metallionen, wie Zink und Mangan, auf das Aggregationsverhalten von PrP wurde untersucht. Aber auch für diese wurde sowohl eine Induktion als auch eine Hemmung der Aggregation beobachtet (Giese *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005; Orem *et al.*, 2006; Ricchelli *et al.*, 2006).

Die Wirkungsweise von Kupfer und anderen zweiwertigen Metallionen auf PrP ist möglicherweise komplex und hängt stark von den experimentellen Bedingungen ab.

1.2.2 Prionen in Hefen und anderen Pilzen

Schon mehr als 15 Jahre vor der Postulierung der „Prion-Hypothese“ durch Stanley Prusiner, wurde ein nukleinsäurefreies übertragbares epigenetisches Element der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), [PSI⁺], beschrieben (Cox, 1965), das 1994 von Reed Wickner als Prion identifiziert werden konnte. Er erkannte, dass [PSI⁺] und ein weiterer epigenetischer Faktor, [URE3], auf nicht-Mendelschem Weg durch die aggregierte Prionform verschiedener zellulärer Proteine auf Tochterzellen übertragen werden können (Wickner, 1994).

Eigenschaften und Funktionen

Die Hefepriionen sind im Gegensatz zu den Prionen in Säugern nicht schädlich für die Zellen, sondern können durch die Modifikation von bestimmten zellulären Funktionen den Phänotyp verändern. Mittlerweile konnten mehrere „funktionelle“ Prionen in Hefen und anderen Pilzen identifiziert werden, deren Eigenschaften und Funktionen in Tabelle 1-2 dargestellt sind.

Protein	Organismus	Prionform	Q/N Region	Oligopeptid-region	Unstrukturierte Region	Zelluläre Funktion	Prionphänotyp
Sup35p	<i>S. cerevisiae</i>	[PSI ⁺]	+	+	+	Translations-termination	Überlesen von Stopp-Codons
Ure2p	<i>S. cerevisiae</i>	[URE3]	+	-	+	Transkriptions-repression	Wachstum trotz Stickstoffmangel
Rnq1	<i>S. cerevisiae</i>	[RNQ ⁺] oder [PIN ⁺]	+	+(dege-neriert)	+	?	<i>De novo</i> Induktion von [PSI ⁺]
New1	<i>S. cerevisiae</i>	[PIN ⁺]	+	+	+	Translations-elongation	<i>De novo</i> Induktion von [PSI ⁺]
HET-s	<i>P. anisera</i>	[Het-s]	-	-	-	Regulation der Heterokaryon-inkompatibilität	Auslösung des Zelltods in Anwesenheit von HET-s

Tabelle 1-2 Prionen in Hefen und anderen Pilzen (nach Shorter & Lindquist, 2005).

Die Aufrechterhaltung des Prionphänotyps wird bei [PSI⁺], [URE3] und [RNQ⁺] von verschiedenen molekularen Chaperonen reguliert, wobei Hsp104 die wohl wichtigste Rolle spielt. Es zerkleinert große Aggregate, um eine effiziente Verteilung auf Tochterzellen zu ermöglichen. Eine Inhibierung von Hsp104 führt zum Verlust von [PSI⁺], ebenso wie die Überexpression von Hsp104, bei der es zur vollständigen Auflösung der Prionprotein-Aggregate kommt (Chernoff *et al.*, 1995; Moriyama *et al.*, 2000; Shorter & Lindquist, 2005; Sondheimer & Lindquist, 2000).

Sup35p und [PSI⁺]

Der Translationsterminationsfaktor Sup35p, und der damit verbundene Prionfaktor [PSI⁺], gehört zu den am besten untersuchten Hefepriionen. Sup35p ist homolog zum Translationsterminationsfaktor eRF3 in Säugetieren. In seiner aktiven löslichen Form in [psi⁻]-Zellen sorgt Sup35p für die Translationstermination. In [PSI⁺]-Zellen liegt Sup35p in seiner aggregierten, sich selbst replizierenden und nicht funktionellen Prionform vor, was zum Überlesen von Stopp-Codons führt. Dadurch kommt es zur Ausbildung einer Reihe neuer Phänotypen mit geändertem Wachstumsverhalten abhängig vom jeweiligen Milieu (True & Lindquist, 2000). [PSI⁺] kann spontan mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. 1:10⁶ auftreten. Die Vererbung des [PSI⁺]-Phänotyps wird durch die Übertragung von aggregiertem Sup35p vom Zytoplasma der Mutterzellen auf ihre Tochterzellen vermittelt.

Die Umwandlung von Sup35p von der [psi⁻] zur [PSI⁺] Form *in vivo* spiegelt sich *in vitro* in der Konformationsänderung von löslichem Sup35p zu amyloiden Fibrillen wider. Sowohl die Bildung von [PSI⁺] als auch die Amyloidentstehung wird von der aminoterminalen Region N vermittelt. Der carboxyterminale Bereich C und die Mittelregion M von Sup35p werden dafür nicht benötigt.

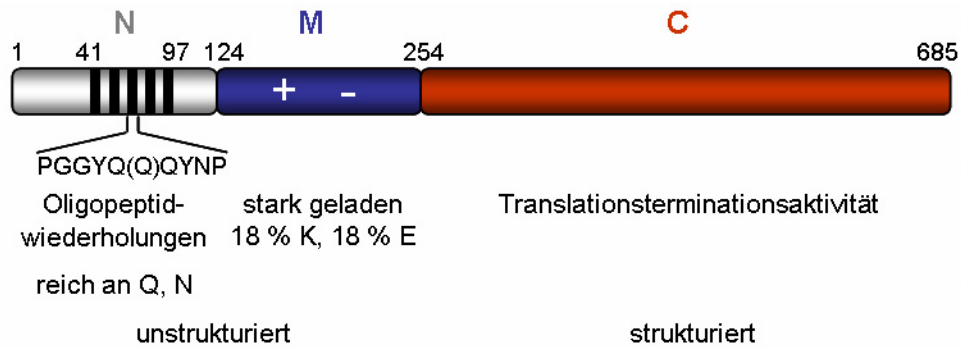


Abbildung 1-6 Schema des Hefeprions Sup35p. Im aminoterminalen Bereich N (grau; Aminosäure 1-123) befinden sich die Q/N-reiche Region und die Oligopeptidwiederholungen. Die Mittelregion M (blau; Aminosäure 124-253) beinhaltet stark geladene Aminosäuren. Sowohl N als auch M liegen nativ entfaltet vor. Der strukturierte carboxyterminale Bereich C von Sup35p (rot; Aminosäure 254-685) zeigt die Translationsterminationsaktivität.

N enthält die bereits in 1.1.5 erwähnte Region reich an den ungeladenen polaren Aminosäuren Glutamin und Asparagin (Aminosäuren 1-40) gefolgt von mehreren Oligopeptidwiederholungen (Aminosäuren 41-97) (Abbildung 1-6). Die Oligopeptidwiederholungen sind dabei essentiell für die Prionentstehung (Liu & Lindquist, 1999; Scheibel & Lindquist, 2001). Eine Expansion dieser Region führt zu einer spontanen Ausbildung von $[\text{PSI}^+]$ *in vivo* und beschleunigt die Fibrillenbildung *in vitro*, während die partielle Deletion das Gegenteil zur Folge hat.

Die Mittelregion M von Sup35p ist reich an den positiv und negativ geladenen Aminosäuren Lysin und Glutamat. M wird zwar nicht für die Prionentstehung benötigt, ist aber für die Löslichkeit des Proteins verantwortlich (Scheibel, 2004).

Während N und M nativ entfaltet vorliegen, ist der carboxyterminale Bereich C, der Translationsterminationsaktivität zeigt, strukturiert (Krzewska *et al.*, 2007). Die Anwesenheit von C führt vermehrt zu unspezifischer Aggregation *in vitro*, weswegen für analytische Untersuchungen meist nur die Domäne NM verwendet wird.

Die Fibrillenbildung von NM ist ein keimbildungsabhängiger zweistufiger Prozess (Serio *et al.*, 2000; Scheibel *et al.*, 2004). Lösliches NM befindet sich in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen Monomeren und Oligomeren und bildet in der ersten Assemblierungsstufe einen Aggregationskeim. Der Keimbildung folgt in der zweiten Stufe das Fibrillenwachstum, das a) die Bindung von löslichem NM an den Keim und b) die durch den Keim induzierte Konformationsänderung beinhaltet (Scheibel *et al.*, 2004).

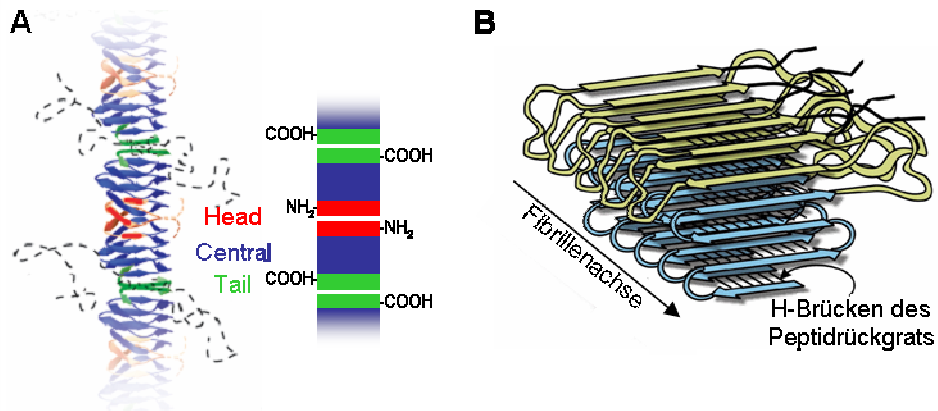


Abbildung 1-7 NM-Fibrillenstruktur. (A) Modell nach Krishnan & Lindquist, 2005. Durch „Head to head“ (rot) und „Tail to tail“ (grün) Interaktionen in N kommt es zur Ausbildung einer β -Helix. (B) Modell nach Shewmaker *et al.*, 2006. N (blau) und der an N grenzende Bereich von M (grün) liegen in paralleler *in-register* orientierter β -Faltblatt-Struktur vor.

NM-Fibrillen zeigen typische Amyloidstruktur. Sie sind unverzweigt, sehr stabil, ihre Assemblierung kann durch *Seeding* beschleunigt werden, und sie besitzen die typische *Cross- β* Struktur (Scheibel, 2004). Einem Modell von Krishnan und Lindquist (2005) zufolge besteht das β -Faltblatt-reiche Grundgerüst der Fibrille aus Monomeren mit einer *Head*-, einer *Central*- und einer *Tail*-Region (Abbildung 1-7A). Die Fibrillenassemblierung erfolgt dabei durch „Head to head“- und „Tail to tail“-Interaktionen. Die *Central*-Region enthält die Oligopeptidwiederholungen, die zwar für die Keimbildung essentiell, aber nicht direkt an intermolekularen Interaktionen in der Fibrille beteiligt sind. M liegt auch nach Fibrillenbildung größtenteils ungefaltet vor, nur der unmittelbar an N grenzende Bereich von M ist strukturiert. Während diesem Modell zufolge die β -Faltblätter in Form einer β -Helix angeordnet sind, postulieren Shewmaker *et al.* (2006) alternativ eine NM-Fibrillenstruktur mit parallel angeordneten β -Faltblättern, die in deckungsgleicher *in-register* Orientierung vorliegen (Abbildung 1-7B).

1.3 Zielsetzung

Das Verständnis des Assemblierungsverhaltens amyloidogener Proteine ist essentiell für die Aufklärung der Mechanismen und Ursachen der Entstehung von Amyloidosen. Verschiedene Assemblierungsformen scheinen dabei auf unterschiedliche Weise die Pathogenität der Proteine zu beeinflussen. In diesem Zusammenhang wird auch der Einfluss zweiwertiger Metallionen auf die Ausbildung amyloider Strukturen diskutiert.

Da die Hefepriondomäne NM Gemeinsamkeiten mit anderen amyloidogenen Proteinen aufweist (u. a. eine nativ entfaltete Struktur, Oligopeptidwiederholungen, Glutamin-reiche Regionen, und die Fähigkeit zur Bildung amyloider Fibrillen), jedoch nicht pathogen und im Vergleich zu anderen Amyloiden experimentell leicht zugänglich und bereits gut charakterisiert ist, wurde sie im Rahmen dieser Arbeit als Modellprotein verwendet, um verschiedene Aspekte der Amyloidentstehung zu untersuchen.

Das Auftreten von Intermediaten bei der Fibrillenassemblierung wurde für verschiedene amyloide Proteine beschrieben und ist womöglich für die Pathogenese von großer Bedeutung. Während die Bildung amyloider Fibrillen bei NM bereits gut erforscht ist, ist über mögliche Übergangsformen oder alternative Assemblierungswege wenig bekannt. Aus diesem Grund war es ein Ziel der vorliegenden Arbeit, das Assemblierungsverhalten von NM näher zu untersuchen und auftretende Assemblierungsformen zu charakterisieren.

Mehrere amyloide Proteine besitzen die Fähigkeit spezifisch Metallionen zu komplexieren. Doch weder die physiologische Funktion dieser Metallbindung, noch der Einfluss auf die Amyloidbildung konnte bislang ausreichend geklärt werden. Durch Untersuchung des Einflusses von Metallionen auf NM sollten Erkenntnisse über mögliche generelle Effekte von Metallen auf Amyloide gewonnen werden. Da NM keine bekannten Metallbindemotive besitzt, war es zunächst wichtig die Bindungseigenschaften zu bestimmen. Darüber hinaus sollte der Einfluss zweiwertiger Metallionen vor allem auf die Amyloidassemblierung von NM untersucht werden, aber auch der Effekt auf die Sekundärstruktur, Stabilität und Morphologie der Fibrillen waren von Interesse.

Unterschiede in der Fibrillenmorphologie und -stabilität können bei der Ausbildung von Prionphänotypen bei Hefen und auch bei der Entstehung von Amyloidosen eine Rolle spielen. Eine bei OMPD-Patienten gefundene Variante des Proteins PAPBN1 zeigt *in vitro* beschleunigte Fibrillenbildung und erhöhte Fibrillenstabilität im Gegensatz zum Wildtyp-Protein. Ob dies in Zusammenhang mit einer unterschiedlichen Fibrillenmorphologie steht, sollte durch rasterkraftmikroskopische Untersuchungen geklärt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

β-Mercaptoethanol, zur Synthese	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
6-acryloyl-2-dimethylaminonaphtalen (Acrylodan)	Molecular Probes, Eugene, USA
Acrylamidlösung Rotiphorese Gel 40 (19:1)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agar-Agar, technisch	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS), p.a.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bacto Trypton	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bromphenolblau S	Merck, Darmstadt, Deutschland
Coomassie Brilliant Blau R	Serva, Heidelberg, Deutschland
Coomassie Protein Assay Reagens (Bradford)	Pierce, Rockford, USA
D-(+)-Saccharose	OMNI Life Science, Bremen, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Titriplex III)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glyzerin, 99 %	MP Biomed., Solon, USA
Guanidiniumhydrochlorid, ultra pure	ICN Biomedicals, Aurora, USA
Harnstoff, für biochemische Zwecke	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hefeextrakt, für die Biotechnologie	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropylthiogalaktosid (IPTG), > 99 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kongo Rot	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Methanol, p.a.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED), p.a.	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS), > 85 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
N-Ethylmorpholin (NEM), 99 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Polyethylenglykol 400	Merck, Darmstadt, Deutschland
Polyoxyethylensorbitmonolaurat (Tween 20)	Merck, Darmstadt, Deutschland
SYPRO [®] Ruby	Molecular Probes, Eugene, USA
Thioflavin T	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trimethylamin-N-oxid (TMAO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris(2-carboxyethyl)phosphinehydrochlorid (TCEP-HCl)	Fluka, Buchs, Deutschland

Anorganische Salze, Säuren und Basen sowie organische Lösungsmittel wurden von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) oder Roth (Karlsruhe, Darmstadt) bezogen und hatten, falls nicht anders vermerkt, den Reinheitsgrad p.a.. Für die Herstellung von Lösungen und Puffern wurde, soweit nicht anders vermerkt, bidestilliertes Wasser verwendet. Für Medien wurde entionisiertes Wasser verwendet.

2.1.2 Größenstandards und Kits

Molekulargewichtstandard <i>Low Range</i> (LMW) (SDS-PAGE)	BioRad, München, Deutschland
Roti [®] -Mark Pre-stained Marker (Immunoblot)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
ECLplus <i>Western Blotting Detection System</i>	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Wizard Plus SV Miniprep Kit	Promega, Madison, USA

2.1.3 Proteine

Antikörper:

α -Kaninchen-IgG monoklonales IgG-POD Konjugat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
α -Sup35p-NM polyklonaler Antikörper (Kaninchen)	Pineda Research, Berlin, Deutschland

Enzyme:

α -Chymotrypsin (Rind)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Endoproteinase Glu-C (Staphylococcus aureus Stamm V8)	Fluka, Buchs, Deutschland

Sonstige Proteine:

eADF-4(C16)	Ute Slotta, TU München, Deutschland
murine Dihydrofolatreduktase (mDHFR)	Diplomarbeit Simone Hess, TU München, Deutschland
Poly(A)-bindendes Protein 1 (PABPN1) N-WT und N-(+7)Ala, fibrillär	Grit Lodderstedt, Universität Halle, Deutschland
PrP ₂₃₋₁₂₀ M (mPrP-Sup35p-Fusionsprotein)	Michael Suhre, TU München, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Sup35p (Volllänge), Sup35p-NM, fibrillär (für Vergleichsmessungen)	Ronald Melki, CNRS Gif-sur-Yvette, Frankreich

2.1.4 Bakterienstämme und Plasmide

Bakterienstamm	Eigenschaften	Quelle
DH10B	<i>F⁻ araD 139Δ(ara leu) 7697 ΔlacX74 galU galK mrcA Δ(mrr⁻ hsdRMS-mcrBC) rpsL decR 380 ΔlacZ ΔM15 endA1 nupG recA1</i>	Bethesda Research Laboratories, USA
C43 [DE3]	<i>E. coli</i> B F dcm ompT hsdS (rB mB) gal λ (DE3), enthält zumindest zwei zusätzliche uncharakterisierte Mutationen; zur Expression toxischer rekombinanter Proteine einsetzbar	J.E. Walker
Plasmid	Eigenschaften	Quelle
pJC25NM	Selektion: Amp; Klonierungsstelle: NdeI / BamHI; Promotor: T7	T. Scheibel
pJC25NM ^{T158C}	Selektion: Amp; Klonierungsstelle: NdeI / BamHI; Promotor: T7	T. Scheibel

2.1.5 Sonstige Materialien

AFM-Zubehör:

Glimmer	Alfa Aesar, Ward Hill, USA
AFM-Plättchen, 15 mm	Ted Pella, Redding, USA
Spitzen:	
Pointprobe NCH-50 (Siliziumnitrid, Radius ~ 7 nm)	Nanosensors, Neuchatel, Schweiz
NanoProbe TM DNP-S20 (Siliziumnitrid, Radius ~ 10 nm, Federkonstante 0,06 Nm ⁻¹)	Veeco, Santa Barbara, USA

Chromatographiematerialien:

Q Sepharose <i>Fast Flow</i>	Amersham-Pharmacia, Uppsala, Schweden
Hydroxyapatit	BioRad, Richmond, USA
Superdex 200 Prep Grade HiLoad 16/60	Amersham-Pharmacia, Uppsala, Schweden
Dialyseeinheit Slide-A-Lyzer [®] Mini, MWCO 10 kDa	Pierce, Rockford, USA
Einmalküvetten, 1,5 ml halbmikro	Brand, Wertheim, Deutschland
Entsalzungssäule D-Salt TM Excellulose TM , MWCO 5 kDa	Pierce, Rockford, USA
Filterpapier Whatman [®] 3MM	Whatman, Brentford UK
Hamiltonspritze, 10 µl, mit austauschbarer Nadel und <i>Chaney</i> Adapter	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
Kupfer Grids Square 300 Mesh	Plano W Planet GmbH, Wetzlar, Deutschland
Küvetten (Quarzglas Suprasil, unterschiedliche Ausführungen)	Hellma, Müllheim, Deutschland
Membran für Immunoblot: Immobilon-P (PVDF)	Millipore, Bedford, USA

Membranen für AF4: regenerierte Zellulose, MWCO 10 kDa	Microdyn-Nadir GmbH, Wuppertal, Deutschland
Polyethersulfon, MWCO 5 kDa	Pall Life Science, East Hills, USA
Röntgenfilm X-Omat AR	Eastman Kodak, Rochester, USA
Spritzenvorsatzfilter 0,22 µm, verschiedene Größen	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ultrazentrifugenröhrchen ½ x 2 P.A.	Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA
Vivaspin 20 (Polyethersulfon, MWCO 10 kDa)	Vivascience AG, Hannover, Deutschland

2.1.6 Geräte

Gerät	Modell	Firma
Absorptionsspektrophotometer (UV/VIS)	Cary 50 Bio und 100 Bio	Varian, Palo Alto, USA
Asymmetrische Flussfeldflussfraktionierung	Eclipse F	Wyatt Technology, Santa Barbara, USA
Blottingapparatur	EBU 4000	C.B.S. Scientific Co., Del Mar, USA
Brechungsindexdetektor	RI-71	Shodex, Tokyo, Japan
Chromatographieanlage	Äkta FPLC P920	Amersham Biosciences, Piscataway, USA
Circulardichroismus-Spektropolarimeter	Jasco J-715 mit PTC 343 Peltier Temperiereinheit	Jasco International Co. Ltd., Tokyo, Japan
Elektronenspinresonanz (EPR) Spektrometer	X-Band ELEXSYS	Bruker, Ettlingen, Deutschland
Filmentwicklermaschine	Optimax Typ MR	MS Laborgeräte, Heidelberg, Deutschland
Fluoreszenz-Spektrophotometer	Spex FluoroMax-3	Jobin Yvon Inc., Edison, USA
Gelelektrophoreseapparatur (für SDS-PAGE)	Hoefer SE250 Mighty Small II	GE Healthcare, München, Deutschland
HPLC-Pumpensystem mit Pumpe, Entgaser, UV-Detektor, Probengeber, Temperiereinheit	Series 1100	Agilent Technologies, Palo Alto, USA
Infrarot-Mikroskop	IRscope	Bruker, Ettlingen, Deutschland
Infrarot-Spektrometer	IFS 66/s	Bruker, Ettlingen, Deutschland
Kühlzentrifuge	Avanti J-25 Rotoren: JA10 + JA25.50	Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA
Lichtstreuendetektor	DawnEOS	Wyatt Technology, Santa Barbara, USA

Lyophilie	Unikat	Med. Techn. Laborgeräte J.H. Schrader, Friedland, Deutschland
Mikrokalorimeter	VP-ITC	Microcal, Northhampton, USA
Phosphoimager	Typhoon 9200	Amersham Biosciences, Piscataway, USA
Rasterkraftmikroskop	MultiMode™ Scanning Probe Microscope	Veeco Instruments Inc., Woodbury, USA
Spannungsquellen	Blue Power Plus	Serva, Heidelberg, Deutschland
	EPS 3500, 600, 601 und 1001	Amersham Biosciences, Piscataway, USA
Transmissionselektronenmikroskop	100 CX	Jeol Ltd., Tokyo, Japan
Ultraschallgenerator	HD/UW2200, Sonde KE76	Bandelin, Berlin, Deutschland
Ultraschall-Resonator (URT)	ResoScan® System	TF Instruments, Heidelberg, Deutschland
Ultrazentrifuge	Optima MAX-E	Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA
	Rotoren: TLA45, MLA50	

2.1.7 Computerprogramme

Microsoft Office (Microsoft, Redmond, USA)

SigmaPlot 2001 (Jandel Scientific, San Raphael, USA)

OriginPro 7.5 (OriginLab, Northampton, USA)

Nanoscope software (Veeco, Santa Barbara, USA)

Image Master 1D (Pharmacia Biotech, USA)

Image Quant 5.2 (Molecular Dynamics, Piscataway, USA)

Biochemie-Portal ExPaSy (Swiss Institutes of Bioinformatics; <http://www.expasy.ch>)

Astra (Wyatt Technology, Santa Barbara, USA)

2.1.8 Medien, Puffer und Lösungen

Medien

LB ₀ -Medium	10 g/l Bacto Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, einstellen auf pH 7,2 mit 1 M NaOH für Platten: + 15 g/l Agar-Agar
TY-Medium	20 g/l Bacto Trypton, 10 g/l Hefeextrakt
Antibiotikum	100 µg/ml Ampicillin

Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Lösung A	3 M Natriumacetat pH 5,5, 1 M CaCl ₂ , 2,8 M MnCl ₂ , sterilfiltriert
Lösung A-Glyzerin	13 % (v/v) Lösung A, 87 % (v/v) Glyzerin

Proteinreinigung

Puffer QA	5 mM Tris/HCl pH 8,0, 40 mM NaCl, 8 M Harnstoff
Puffer QB	5 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 M NaCl, 8 M Harnstoff
Puffer HA	5 mM K _x H _x PO ₄ pH 6,8, 8 M Harnstoff
Puffer HB	500 mM K _x H _x PO ₄ pH 6,8, 8 M Harnstoff
Gelfiltrationspuffer	5 mM K _x H _x PO ₄ pH 6,8, 100 mM NaCl, 8 M Harnstoff
PBS (10x)	40 mM KH ₂ PO ₄ , 160 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,4, 1,15 M NaCl

SDS-PAGE

Auftragspuffer (5x Laemmli)	300 mM Tris/HCl pH 6,8, 10 % SDS (w/v), 50 % Glyzerin (v/v) 0,05 % Bromphenolblau, 5 % β-Mercaptoethanol
Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Tris/HCl pH 8,8, 0,8 % (w/v) SDS
Sammelpuffer (2x)	250 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,4 % (w/v) SDS
Laufpuffer (10x)	250 mM Tris/HCl pH 8,8, 2 M Glycin (v/v), 1 % SDS (w/v)

Coomassie-Färbung

Fairbanks A (Färbelösung)	25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R
Fairbanks D (Entfärbelösung)	10 % (v/v) Essigsäure

Immunoblotting

Transferpuffer	48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,037 % SDS (w/v), 20 % Methanol
PBS-(0,1/0,3)T	1x PBS mit 0,1 % bzw. 0,3 % (v/v) Tween 20
Blocking-Lösung	5 % Milchpulver in PBS-0,1T

Puffer für Assays

NEM-Puffer	50 mM NEM/HCl pH 7,0, 150 mM NaCl; in MQ-H ₂ O
NEM + M ²⁺ -Puffer	1:1000 Verdünnung (schnell) einer entsprechend konzentrierten CuCl ₂ , MnCl ₂ bzw. ZnCl ₂ Lösung (in MQ-H ₂ O) in NEM-Puffer
CRBB	5 mM K _x H _x PO ₄ pH 6,8, 150 mM NaCl; in MQ-H ₂ O

2.2 Molekularbiologische Arbeitstechniken**2.2.1 Anzucht und Aufbewahrung von *E. coli***

Ausstrichkulturen von *E. coli* auf Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C oder mehrere Tage bei RT inkubiert und zur Lagerung im Kühlschrank unter Luftabschluss aufbewahrt. Die Anzucht von *E. coli*-Flüssigkulturen in LB-Medium erfolgte wahlweise unter Zugabe von Ampicillin. Einzelkolonien wurden zur Überimpfung von 4 ml Kulturen verwendet. Größere Volumina wurden mit entsprechenden Vorkulturen überimpft. Die Bakterien aus den entsprechenden Vorkulturen wurden vor der Überimpfung 5 min bei 4 °C und 5000 x g sedimentiert und in frischem Medium resuspendiert um in das Medium sezernierte β -Lactamase zu entfernen und somit dem vorzeitigen Abbau des Ampicillins vorzubeugen. Volumina bis zu 4 ml wurden im Reagenzglasroller inkubiert, Kulturen über 10 ml im Umluftschüttelinkubator. Das Wachstum der Bakterien wurde photometrisch bei 600 nm beobachtet. Dabei entspricht eine OD₆₀₀ von 1 etwa $2,5 \times 10^8$ Zellen/ml (Sambrook & Russell, 2001).

Zur dauerhaften Aufbewahrung von Bakterienstämmen wurden 700 μ l einer exponentiell wachsenden Kultur mit 300 μ l 50-prozentigem Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.2 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation von *E. coli* wurden die zu transformierenden Stämme nach Sambrook & Russell (2001) kompetent gemacht. Dazu wurde eine frische 100 ml *E. coli*-Flüssigkultur mit einer OD₆₀₀ von 0,5-1,0 mit 2 ml 1 M MgCl₂ versetzt und 10 min weiter bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Kultur 60 min auf Eis gekühlt, 5 min bei 4 °C und 5000 x g abzentrifugiert, das Sediment in 20 ml Lösung A resuspendiert und weitere 60 min auf Eis gekühlt. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 4 °C wurde das Sediment in 2 ml Lösung A-Glycerin aufgenommen und die Zellen in Aliquots zu je 200 μ l aliquotiert. Diese

Aliquots wurden entweder direkt mit Plasmid-DNA transformiert oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zur Transformation wurden je 200 µl kompetente Zellen mit maximal 10 % (v/v) der zu transformierenden DNA vermischt und 15 min auf Eis inkubiert. Dieser Ansatz wurde anschließend einem einminütigen Hitzeschritt bei 42 °C unterzogen, wieder auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 500 µl LB₀ 40 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden ca. 100 µl der Bakteriensuspension auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert und diese bei 37 °C üN bebrütet.

Die Präparation und Reinigung der zu transformierenden Plasmide pJCNM und pJCNM^{T158C} wurde nach Vervielfältigung im *E. coli* Stamm DH10B mit dem *Wizard Plus SV Miniprep Kit* gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

2.3 Expression und Reinigung

2.3.1 Anzucht, Induktion und Ernte der Bakterien

Zur rekombinanten Produktion von NM^{wt} und NM^{T158C} wurde der *E. coli* Stamm C43 verwendet. Die Großanzucht wurde mit 4 l TY-Medium mit Ampicillin in Schüttelkolben (2 l pro Kolben) durchgeführt. Das Medium wurde dazu mit einer 100 ml-üN-Kultur angeimpft. Die Kulturen wuchsen bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,5. Dann wurde die Expression durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Kulturen 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (9000 x g, 10 min, 4 °C) geerntet, das Zellpellet mit 10 mM Tris/HCl pH 7,2 gewaschen und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (2260 x g, 15 min, 4 °C) in 25 ml Puffer QA aufgenommen. Die geernteten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

2.3.2 Proteinreinigung

NM^{wt} und NM^{T158C} wurden wie bereits beschrieben (Hess, 2003; Scheibel *et al.*, 2001) in drei Schritten durch Anionenaustausch-, Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie gereinigt. Alle Reinigungsschritte erfolgten an einer Äkta™ FPLC-Anlage bei RT unter denaturierenden Bedingungen. Der Reinigungserfolg wurde nach jedem Schritt durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, s. 2.4.2) kontrolliert. Die verwendeten Puffer wurden mittels einer Vakuumpumpe filtriert und entgast.

Die aus der Zellernte erhaltenen Pellets wurden vor der Reinigung im warmen Wasserbad aufgetaut, abzentrifugiert (60.000 x g, 20 min, 4 °C) und der Überstand den chromatographischen Reinigungsschritten unterzogen, welche in der folgenden Tabelle dargestellt sind.

<u>Methode</u>	<u>Parameter</u>
1) Anionenaustauschchromatographie	
Q-Sepharose <i>Fast Flow</i>	<i>Säulenvolumen:</i> 60 ml <i>Max. Druck:</i> 0,25 MPa <i>Äquilibration:</i> Puffer QA, 1,5 ml/min <i>Probenauftrag:</i> Rohextrakt; 1,0 ml/min, mit 150 ml Superloop <i>Waschen:</i> Puffer QA, 1,5 ml/min, ca. 400 ml <i>Elution:</i> 0-35 % Puffer QB, 420 ml in 5 ml Fraktionen; 100 % Puffer QB, 180 ml; 1,5 ml/min
2) Affinitätschromatographie	
Hydroxyapatit	<i>Säulenvolumen:</i> 20 ml <i>Max. Druck:</i> 0,25 MPa <i>Äquilibration:</i> Puffer HA, 1,5 ml/min <i>Probenauftrag:</i> gepoolte Fraktionen aus 1); 1,0 ml/min, mit 150 ml Superloop <i>Waschen:</i> Puffer HA, 1,5 ml/min, ca. 120 ml <i>Elution:</i> 0-100 % Puffer HB, 160 ml in 3 ml Fraktionen; 100 % Puffer HB, 60 ml; 1,5 ml/min
3) Größenausschlusschromatographie	
Superdex 200 Prep Grade	<i>Säulenvolumen:</i> 120 ml <i>Max. Druck:</i> 0,3 MPa <i>Äquilibration:</i> Gelfiltrationspuffer, 1,0 ml/min <i>Probenauftrag:</i> gepoolte und auf ca. 3 ml aufkonzentrierte (Vivaspin 20) Fraktionen aus 2); 0,7 ml/min, mit 5 ml Superloop <i>Elution:</i> Gelfiltrationspuffer, ca. 90 ml in 1,5 ml Fraktionen; 1,0 ml/min

Verunreinigungen, die z. T. nach dem letzten Chromatographieschritt detektiert wurden, konnten durch einen Hitzeschritt entfernt werden. Dazu wurde die Eigenschaft von NM genutzt, bei einer Temperatur von 60 °C, im Gegensatz zu den meisten *E. coli* Proteinen (Patchett *et al.*, 1988), in Lösung vorzuliegen (Scheibel & Lindquist, 2001). Methanol-präzipitiertes NM wurde in einer geringen Menge 6 M GdmCl 1 h bei RT vollständig gelöst, mit auf 60 °C vortemperiertem PBS 1:100 verdünnt und für 1 h im Wasserbad bei 60 °C inkubiert. Dabei präzipitierte Verunreinigungen wurden durch Zentrifugation (14.000 x g,

30 min, RT) von löslichem NM abgetrennt. Bei der Reinigung von NM^{T158C} wurde dem verwendeten PBS das hitzestabile Reduktionsmittel TCEP zugesetzt um eventuell mit NM disulfidverbrückte Verunreinigungen abzutrennen. Der Reinheitsgrad wurde fluoreszenzspektroskopisch (s. 2.4.10) bestimmt.

Anschließend wurden durch Zugabe von 20 mM EDTA (Endkonzentration) zu gereinigtem NM mögliche Verunreinigungen durch zweiwertige Metallkationen entfernt, sodann das Protein aliquotiert, mit 5,5 Vol. kaltem Methanol gefällt und direkt oder nach Lyophilisation bei -20 °C gelagert.

Zur Lyophilisation wurde methanolgefälltes NM zuerst bei RT getrocknet, in 10 mM NH₄HCO₃ gelöst, eventuell aggregiertes Protein durch Zentrifugation (130.000 x g, 15 min, 4 °C) entfernt, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und üN lyophilisiert.

2.4 Proteinanalytik

2.4.1 Konzentrationsbestimmung

UV-Absorptionsspektroskopie

Die UV-Absorptionsspektroskopie wurde für die Bestimmung der Proteinkonzentration in Proteinlösungen verwendet. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes kann bei bekanntem Extinktionskoeffizienten ϵ_λ die Proteinkonzentration durch Messung der Extinktion bei der Wellenlänge λ errechnet werden:

$$c = \frac{E_\lambda}{\epsilon_\lambda \times d}$$

Dabei entspricht E_λ der Extinktion bei der Wellenlänge λ , ϵ_λ dem molaren Extinktionskoeffizienten bei λ , c der Proteinkonzentration in mol/l und d der Schichtdicke der Küvette in Zentimetern. Der Extinktionskoeffizient lässt sich für Proteine aus der Aminosäurezusammensetzung ermitteln. Den Hauptbeitrag zur Absorption im Proteinspektrum liefern dabei Tryptophan und Tyrosin, aber auch Phenylalanin und Cystein spielen, trotz der in Relation geringen Absorption, eine Rolle (Cantor & Schimmel, 1980; Pace & Schmid, 1997).

Mit Hilfe des Programms ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) konnte der Extinktionskoeffizient basierend auf der Methode nach Gill und Hippel (1989) aus den bekannten Extinktionskoeffizienten von Tryptophan, Tyrosin und Cystin und deren Vorkommen (n) im Protein berechnet werden:

$$\epsilon_{\lambda}(\text{Protein}) = \epsilon_{\lambda}(\text{Tryptophan}) \times n(\text{Tryptophan}) + \epsilon_{\lambda}(\text{Tyrosin}) \times n(\text{Tyrosin}) + \epsilon_{\lambda}(\text{Cystin}) \times n(\text{Cystin})$$

Für NM^{wt} wurde ein Extinktionskoeffizient von 29.000 M⁻¹ cm⁻¹ bei 276 nm ermittelt, was bei einer Absorption von 1,012 einer Konzentration von 1 g/l entspricht. Für NM^{T158C} wurde die Konzentration mit demselben Extinktionskoeffizienten bestimmt.

In allen Experimenten wurden Quarzglas Suprasil Küvetten mit 1 cm Schichtdicke verwendet.

Bradford Assay

Da in Anwesenheit von Cu²⁺ die Proteinkonzentrationsbestimmung mittels UV-Absorptionsspektroskopie aufgrund von Absorption von Cu²⁺ in diesem Bereich nicht möglich war, wurde hier die Konzentration nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt. Dazu wird der blaue Säurefarbstoff Coomassie-Brilliantblau verwendet. Dieser bindet unspezifisch an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten der Proteine, vor allem an Arginin, weniger stark an Lysin, Histidin, Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm auf 595 nm, was spektrophotometrisch verfolgt werden kann (Lottspeich & Zorbas, 1998).

Für die Konzentrationsbestimmung von NM wurde zuerst 25 µl Proteinlösung durch Zugabe von 25 µl 6 M GdmCl für ca. 1 h leicht denaturiert. Dieser Ansatz wurde mit 50 µl MQ-H₂O verdünnt und mit 1000 µl Bradfordlösung (Coomassie Protein Assay Reagens, 1:1 mit MQ-H₂O verdünnt) in halbmikro Einmalküvetten versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Zur Bestimmung der ungefähren Proteinkonzentration wurde eine Eichgerade mit BSA (0-10 µg) erstellt.

2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die analytische Auftrennung von Proteinen nach dem Molekulargewicht wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) eingesetzt. In dieser Arbeit wurden SDS-Gele der Größe 10 x 8 x 0,075 cm mit 15 %-igem Trenngel und 3 %-igem Sammelgel verwendet (Fling & Gregerson, 1986). Für die Gele wurden Lösungen mit den folgenden Endkonzentrationen hergestellt:

Trenngel: 1x Trenngelpuffer, 15 % Acrylamid, 0,2 % SDS, 0,065 % (w/v) APS, 0,033 % (v/v) TEMED

Sammelgel: 1x Sammelgelpuffer, 3 % Acrylamid, 0,2 % SDS, 0,13 % (w/v) APS, 0,066 % (v/v) TEMED

Nach Zugabe von APS und TEMED wurde die Gellösung zur Polymerisierung in eine entsprechende Vorrichtung gegossen.

Die Proben wurden in 1x Auftragspuffer zur vollständigen Denaturierung 10 min bei 95 °C inkubiert (Laemmli, 1970) und aufgetragen. Zur Abschätzung des Molekulargewichts der Proteine wurden Proteinstandards mit auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung wurde durch einen konstanten elektrischen Strom von 25 mA pro Gel für 45-60 min erzielt.

2.4.3 Färbung von Proteingelen

Coomassie-Färbung

Für die Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen mit dem Farbstoff Coomassie Blau nach Fairbanks (Fairbanks *et al.*, 1971) wurde das Gel in Fairbanks A aufgekocht und 10 min inkubiert. Nichtgebundener Farbstoff wurde durch kurzes Spülen in H₂O und durch anschließendes Aufkochen und Inkubation in Fairbanks D entfernt. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt bei etwa 50 ng Protein.

Eine Detektion von NM mittels Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernick (1988), mit einer Nachweisgrenze von 10 ng Protein, war nicht möglich.

Färbung mit SYPRO[®] Ruby

Als Alternative zur Silberfärbung, wurde die sensitive Detektion von NM mittels SYPRO[®] Ruby durchgeführt, einem Fluoreszenz-Farbstoff (Emissionsmaximum bei 618 nm) mit einer vergleichbaren Empfindlichkeit wie die der Silberfärbung. Dazu wurden die Proteine durch 30-minütige Inkubation in 7 % Eisessig/10 % Methanol im Gel fixiert, und anschließend in frischer SYPRO[®] Ruby Lösung (50 ml/Gel) üN gefärbt. Nach zwei Waschschritten (1 x 30 min in H₂O_{dd}, 1 x 30 min in 7 % Eisessig/10 % Methanol) wurden die Proteinbanden mittels Phosphoimager (Typhoon) bei einer Anregungswellenlänge von 532 nm mit dem Emissionsfilter „610 Ruby“ detektiert.

2.4.4 Immunoblotting

Der spezifische und sensitivste Nachweis von NM erfolgte durch Immunoblotting. Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden zunächst auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu wurden das Polyacrylamidgel und eine entsprechend den Herstellerangaben vorbereitete PVDF-Membran für 10 min in Transferpuffer inkubiert. Anschließend wurden eine *Sandwich*-Anordnung bestehend aus drei Lagen Whatman[®]-Papier (in Transferpuffer getränkt), der Membran, dem Gel und drei weiteren getränkten Lagen Whatman[®]-Papier zwischen zwei Elektroden angebracht. Die Proteine wurden bei einer konstanten Stromstärke von 1 mA/cm² in 90 min auf die Membran übertragen. Zum Nachweis von NM (Protokoll s. u.) wurde ein α -Sup35p-NM polyklonaler Antikörper aus Kaninchen als primärer Antikörper verwendet. Der sekundäre Antikörper, α -Kaninchen-IgG, war mit dem Enzym Peroxidase konjugiert, das über eine lichterzeugende Reaktion mit dem ECL^{plus} *western blot detection kit* entsprechend den Herstellerangaben detektiert werden konnte.

Protokoll (bei RT)		Antikörperverdünnungen
3 x 10 min	Schwenken in Blocking-Lösung	
90 min	Inkubation mit α -Sup35p-NM	1:20.000 in PBS-0,1T + 1 % Milchpulver
3 x 10 min	Waschen mit PBS-0,1T	
45 min	Inkubation mit α -Kaninchen-IgG-POD	1:4.000 in PBS-0,1T + 1 % Milchpulver
2 x 10 min	Waschen mit PBS-0,3T	
1 x 10 min	Waschen mit PBS-0,1T	

2.4.5 Assemblierung amyloider Fibrillen

Fibrillenbildung

Amyloide NM-Fibrillen werden in einem Prozess gebildet, der aus zwei Schritten besteht. Der erste Schritt ist die Bildung von Aggregationskeimen aus löslichem NM. Diese Aggregationskeime, auch Nuklei genannt, induzieren im zweiten Schritt durch Anlagerung von weiterem löslichem NM das Fibrillenwachstum.

Die Assemblierung amyloider NM-Fibrillen wurde in dieser Arbeit auf drei verschiedene Arten durchgeführt: a) ungesedert, b) durch Rotation oder c) durch *Seeding*. Dazu wurde zunächst methanolpräzipitiertes und getrocknetes bzw. lyophilisiertes NM in einem kleinen Volumen 6 oder 8 M GdmCl üN denaturiert, um schon bestehende Keime und andere Strukturen aufzulösen. Zur Fibrillenbildung wurde das Protein durch 100-fache Verdünnung

mit CRBB bzw. NEM-Puffer (mit oder ohne M^{2+}) renaturiert. Die finale Proteinkonzentration betrug 150 $\mu\text{g/ml}$.

In ungeseedeten Reaktionen, d.h. ohne künstliche Induktion der Fibrillenbildung, wurde so renaturiertes NM ohne weitere Behandlung bei konstanter Temperatur (20 oder 25 °C im Brutschrank) inkubiert. Auf diese Weise entstanden nicht nur Fibrillen sondern auch Filamente, die durch Zentrifugation (s. 2.4.7) von den Fibrillen getrennt werden konnten.

Bei der Fibrillenassemblierung durch Rotation wird die Bildung der Nuklei und somit die gesamte Reaktion beschleunigt. Die Polymerisation durch Dissoziation übermäßig großer Komplexe und/oder der Anstieg der Kollision geeigneter Komplexe untereinander (Serio *et al.*, 2000) sind dabei mögliche Ursachen für die erhöhte Keimbildungsrate. Dabei gilt, je höher die Proteinkonzentration der rotierten Probe, umso mehr Keime entstehen und umso kürzer sind die gebildeten Fibrillen. Für die Fibrillenassemblierung durch Rotation wurde renaturiertes NM (s. o.) auf dem Überkopfschüttler bei 60 rpm für 15-72 h bei RT rotiert.

Bei der Fibrillenbildung durch *Seeding* wird die Reaktion durch Zugabe von *Seeds* zu löslichem NM beschleunigt. Bei den *Seeds* handelt es sich um sehr kurze Fibrillen mit einer durchschnittlichen Länge von ca. 100 nm, die ähnlich wie Aggregationskeime wirken. Für die Fibrillenassemblierung durch *Seeding* wurden 1-10 % (w/w) *Seeds* (Herstellung s. u.) direkt zur Renaturierung von NM (s. o.) oder unmittelbar danach zugegeben.

Herstellung von *Seeds*

Zur Herstellung von *Seeds* wurden durch Rotation gebildete Fibrillen mit Hilfe von Ultraschall zerkleinert. Dazu wurden 500 μl Fibrillen in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß in einem Kühlblock mit der Ultraschallsonde KE76 (Bandelin) bei niedrigster Energie (10 %) 6 x 15 s behandelt. Dabei war zu verhindern, dass die Sonde das Reaktionsgefäß berührte und sich Schaum bildete. Die Qualität (Länge, Verteilung) der so hergestellten *Seeds* wurde mittels AFM kontrolliert.

2.4.6 Detektion amyloider Fibrillen

Kongo Rot

Als ein typischer Nachweis amyloider Fibrillen gilt die Färbung mit Kongo Rot (*Congo Red*, CR) (Klunk *et al.*, 1989). Durch die Bindung an amyloide Proteine ändert sich das Absorbtionsspektrum des Farbstoffes. Die Farbe von Kongo Rot wechselt mit der Bindung von orange zu rosa. Die stöchiometrischen Interaktionen zwischen CR und amyloidem Protein erlauben nicht nur den Nachweis, sondern auch die absolute Quantifizierung der Konzentration des CR-Amyloid-Komplexes:

$$(A_{540}/25295) - (A_{477}/46306) = \text{gebundenes CR/Protein [mol/mol]}$$

CR wurde in CRBB aufgenommen, zweimal sterilfiltriert und auf eine Konzentration von 12,5 μM eingestellt. Die Konzentration der reinen CR-Lösung konnte durch Kenntnis der Absorption bei 540 nm und 477 nm und die zugehörigen Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{540} = 25295 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_{477} = 46306 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) bestimmt werden. Die Detektion amyloider NM-Fibrillen mittels CR erfolgte wie in der Literatur beschrieben (Glover *et al.*, 1997; Scheibel & Lindquist, 2001): NM wurde mit der CR-Lösung auf final 1 μM Protein und 10 μM CR verdünnt, für 1 min bei RT inkubiert und die Absorption im UV/VIS-Spektrometer (Cary 50) bei 540 nm und 477 nm in halbmikro Einmalküvetten gemessen. Die berechneten Werte für die CR-Bindung wurden durch Subtraktion des Wertes der reinen CR-Lösung korrigiert.

Thioflavin T

Eine weitere Methode zur Detektion amyloider Fibrillen ist die Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes Thioflavin T (ThT) und der damit verbundene Anstieg der Emission bei 482 nm (Vassar & Culling, 1959). Für ThT-Fluoreszenzmessungen wurde die zu untersuchende Proteinlösung mit 250 μM ThT in NEM-Puffer auf final 1,25 μM Protein und 187,5 μM ThT verdünnt. Das Emissionsspektrum von ThT wurde von 470–550 nm bei einer Anregungswellenlänge von 450 nm am FluoroMax-3 Spektrofluorimeter aufgenommen (s. 2.4.10).

Acrylodan

Die Bildung amyloider NM-Fibrillen kann auch durch die Änderungen der Fluoreszenz des kovalent gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes Acrylodan (Acryloyl-2-dimethylaminonaphthalen) beobachtet werden (Scheibel *et al.*, 2004). Dazu wurde die Cysteinmutante NM^{T158C} verwendet. Für die Kopplung wurde in 6 M GdmCl gelöstes NM^{T158C} mit Acrylodan (10 mM, in DMSO) für 2 h bei RT inkubiert (~ 70 µM NM^{T158C} und 1 mM Acrylodan Endkonzentration) und gelegentlich invertiert. Ungebundenes Acrylodan wurde unter Verwendung von Entsalzungssäulen (*D-Salt cellulose desalting columns*) gemäß den Herstellerangaben abgetrennt. Die Kopplungseffizienz wurde mittels Absorptionsspektroskopie gemäß den Herstellerangaben bestimmt. Das gekoppelte Protein wurde aliquotiert, methanolpräzipitiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Fibrillenbildung von Acrylodan-gelabeltem NM^{T158C} (5 µM) wurde durch die Abnahme der Fluoreszenz bei 520 nm (Emissionsmaximum von löslichem NM) und die Zunahme bei 470 nm (Emissionsmaximum von fibrillärem NM) beobachtet. Dazu wurden Acrylodan-Emissionsspektren von 400–600 nm bei einer Anregungswellenlänge von 392 nm am FluoroMax-3 Spektrofluorimeter aufgenommen (s. 2.4.10).

2.4.7 Filamentseparation

NM-Filamente konnten von amyloiden Fibrillen mittels Ultrazentrifugation abgetrennt werden. Dazu wurde ein ungesedeter Fibrillenbildungsansatz bei 130.000 x g für 30 min bei 20 °C in einer Optima Max-E Ultrazentrifuge (Rotor: TLA45) zentrifugiert und der Überstand, der Filamente und lösliches NM enthielt, 1 x durch einen 0,22 µm Filter filtriert. Die weitere quantitative Trennung von Filamenten und löslichem NM durch Größenausschlusschromatographie oder Filtration durch eine Membran mit einer Ausschlussgröße von 100 kDa scheiterte, da NM mit den verwendeten Materialien unspezifisch interagierte.

2.4.8 Saccharosegradient

Die qualitative Separation der NM-Assemblierungsformen konnte mittels eines Saccharosegradienten durchgeführt werden. Ein kontinuierlicher Gradient mit 20-60 % Saccharose wurde modifiziert nach Liebman *et al.* (2006) in $\frac{1}{2} \times 2$ P.A. Zentrifugenröhrchen hergestellt. Dazu wurde 500 μ l 60-prozentige Saccharoselösung in die Röhrchen gefüllt und für ca. 40 min bei -80 °C eingefroren. Danach wurden die Röhrchen herausgenommen, 500 μ l 50-prozentige Saccharoselösung direkt auf die gefrorene Lösung pipettiert und wieder für 40 min bei -80 °C eingefroren. Auf diese Weise wurden nacheinander 40-, 30- und 20-prozentige Saccharoselösung zugegeben. Die Gradienten wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert und dann langsam auf Eis aufgetaut, wobei es zur Durchmischung der einzelnen Saccharoseschichten kam, und sich somit ein kontinuierlicher Gradient ausbildete. 300 μ l NM-Probe wurde nach vollständigem Auftauen des Gradienten vorsichtig obenauf pipettiert und μ N in der Optima Max-E Ultrazentrifuge mit einem Ausschwingrotor (MLS50) bei 100.000 x g und 20 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden vorsichtig 200 μ l-Fractionen von oben nach unten abgenommen und mittels AFM und SDS-PAGE mit Immunoblotting bzw. mit Färbung mit SYPRO[®] Ruby analysiert. Die Quantifizierung von SYPRO[®] Ruby gefärbten Proteinbanden wurde mit Hilfe der Software Image Quant 5.2 durchgeführt.

2.4.9 Stabilitätsuntersuchungen

SDS-Stabilität

Die Resistenz gegenüber der Denaturierung mit SDS ist eine Eigenschaft von β -Faltblattreichen Proteinen mit kompakter Struktur (Manning & Colon, 2004). So können auch amyloide NM-Fibrillen in SDS-haltigem Auftragspuffer (Laemmli, 1970; enthält 2 % SDS) erst nach 10-minütiger Inkubation bei 95 °C, was den denaturierenden Effekt von SDS verstärkt, mittels SDS-PAGE detektiert werden (Serio *et al.*, 2000). Ohne Inkubation bei 95 °C können die Fibrillen nicht ins Gel einlaufen.

Zur Untersuchung der SDS-Stabilität von Fibrillen, Filamenten oder löslichem NM wurde 150 μ g/ml Protein mit Auftragspuffer versetzt, unmittelbar danach für 0-10 min bei 95 °C inkubiert und mittels SDS-PAGE analysiert. Diese Methode wurde auch genutzt, um den Anteil von Fibrillen am gesamten aggregierten Protein zu bestimmen. Dazu wurde durch einen Zentrifugationsschritt (130.000 x g, 30 min, 20 °C) lösliches von unlöslichem NM

getrennt, Pellet und Überstand mit Auftragspuffer versetzt und vor bzw. nach 10-minütiger Inkubation bei 95 °C mittels SDS-PAGE analysiert. In nicht hitzebehandelten Pelletproben konnten nur amorphe Aggregate, nicht aber die SDS-resistenten Fibrillen, auf dem Gel detektiert werden. Nach Färbung mit Coomassie wurden die Proteinbanden densitometrisch mit der Software Image Master 1D Prime quantifiziert.

Proteasestabilität

Die Resistenz gegenüber dem Verdau mit Proteasen ist eine weitere Eigenschaft amyloider Fibrillen (Nordstedt *et al.*, 1994). Für den proteolytischen Verdau von NM wurden zwei verschiedene Endoproteasen verwendet. Chymotrypsin (CHY) schneidet nur im aminoterminalen Bereich von NM (24 Schnittstellen, direkt vor Tyrosin und Phenylalanin), während sich die 23 Schnittstellen der Glutamyl-Endopeptidase Glu-C V8 (V8) (direkt vor Glutamat) nur in der Mitteldomäne befinden. Es wurden 150 µg/ml NM mit 1/50 (w/w) CHY bzw. 1/10 (w/w) V8 bei 37 °C für 0-60 min verdaut. Die Proben wurden mit Auftragspuffer versetzt, 10 min bei 95 °C inkubiert und mittels SDS-PAGE analysiert. Nach Färbung mit Coomassie wurden die Proteinbanden densitometrisch mit der Software Image Master 1D Prime quantifiziert.

2.4.10 Fluoreszenz-Spektroskopie

Die Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin sind für die so genannte „intrinsische Fluoreszenz“ von Proteinen verantwortlich. Dabei wird das Fluoreszenzverhalten von Proteinen, die alle drei aromatischen Aminosäuren enthalten, von Tryptophan dominiert. Zwei Gründe sind für die intensive Fluoreszenz von Tryptophan verantwortlich: Zum einen weist Tryptophan von den drei aromatischen Aminosäuren die höchste molare Absorption auf. Zusätzlich ist es möglich, dass von Tyrosinen und Phenylalaninen absorbierte Energie durch *fluorescence resonance energy transfer* auf Tryptophan übertragen wird und so zur Tryptophanfluoreszenz beiträgt (Cantor & Schimmel, 1980; Schmid, 1997). Daher ergeben sich relative Empfindlichkeiten für die Fluoreszenz zu etwa:

$$\text{Trp} : \text{Tyr} : \text{Phe} = 1100 : 200 : 8 \text{ (Schmid, 1997).}$$

Die intrinsische Fluoreszenz wurde für die Überprüfung der Reinheit von NM verwendet. Da NM kein Tryptophan enthält, sollte reines NM nur das Emissionsspektrum von Tyrosin mit einem Maximum bei ca. 310 nm zeigen.

Extrinsische Fluoreszenz kann Proteinen durch spezifische Markierung (kovalent oder nichtkovalent) mit verschiedensten Fluorophoren verliehen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese zur Detektion amyloider Fibrillen genutzt: a) durch Zugabe von Thioflavin T und b) durch kovalente Bindung von Acrylodan (s. 2.4.6).

Darüber hinaus wurde das Oligomerisierungsverhalten von NM bei 25 bzw. 60 °C mittels Lichtstreuung untersucht. Dazu wurde frisch renaturiertes NM (150 µg/ml) im Fluoreszenz-Spektrophotometer mit Licht einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt und das 90°-Streulicht bei derselben Wellenlänge gemessen. Die so erhaltenen Streulichtwerte wurden mit der Lichtstreuung des Messpuffers korrigiert.

Die Parameter aller fluoreszenzspektroskopischer Messungen sind im Folgenden aufgeführt. Alle Messungen wurden in Quarzglas Suprasil Fluoreszenzküvetten mit einem Volumen von 50 µl bzw. 1 ml (Lichtstreuung) durchgeführt.

	Tyr / Trp	Thioflavin T	Acrylodan	Lichtstreuung
Anregungswellenlänge	280 nm	450 nm	392 nm	500 nm
Aufnahme der Emission	300-400 nm	470-520 nm	450-550 nm	500 nm
Spaltbreiten	5 nm / 5 nm	5 nm / 5 nm	5 nm / 5 nm	5 nm / 5 nm
Integrationszeit	0,5 s	0,5 s	0,5 s	0,5 s
Temperatur	25 °C	25 °C	25 °C	25 °C / 60 °C

2.4.11 Circular dichroismus-Spektroskopie

Unter Circular dichroismus (CD) versteht man die Eigenschaft optisch aktiver Moleküle, links- bzw. rechts-zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark zu absorbieren. Die Grundlage hierfür liefert die Kopplung von Chromophoren in einer asymmetrischen Konformation. Je nach Wellenlänge des eingestrahlten Lichts unterscheidet man zwischen Nah-UV CD (320-250 nm, aromatische Region) und Fern-UV CD (250-170 nm, Amid-Region). Im Nah-UV Bereich sind aromatische Aminosäuren in asymmetrischer Umgebung für das Signal verantwortlich. Nah-UV CD-Spektren vermitteln einen für jedes Protein charakteristischen, abstrakten Gesamteindruck. Die Fern-UV CD-Spektroskopie wird dazu verwendet, um Informationen über die Sekundärstruktur von Proteinen zu erhalten. Im Fern-UV erzeugt die Polypeptidkette ein CD-Signal, das von der Sekundärstruktur des Proteins abhängig ist. α -Helices erzeugen zwei benachbarte Minima hoher Intensität bei 208 nm und 222 nm, wohingegen β -Faltblätter zu einem weniger ausgeprägten Minimum bei

218 nm führen. Unstrukturierte Proteine (*random coil*) weisen ein Spektrum mit einem ausgeprägten Minimum bei 198 nm auf.

Die Sekundärstrukturuntersuchungen von NM wurden mit Proteinlösungen mit einer Konzentration von 150 µg/ml und Quarzküvetten mit Schichtdicken von 0,1 cm durchgeführt. Dabei wurde ein Jasco 715 Spectropolarimeter mit folgenden Geräteeinstellungen verwendet:

Wellenlängenbereich	198 nm-250 nm
Auflösung	0,1 nm
Geschwindigkeit	20 nm/min
Response	1,0 s
Akkumulation	5
Küvettemperatur	20 °C

Aus der gemessenen Elliptizität Θ wurde die molare Elliptizität Θ_{MRW} (in grad cm² dmol⁻¹), d. h. die auf den durchschnittlichen Beitrag einer Peptidbindung bezogene Elliptizität mit Hilfe der Formel

$$\Theta_{MRW} = \frac{\Theta \cdot 100 \cdot MW}{c \cdot d \cdot N_{AS}}$$

(Schmid, 1997) berechnet. Dabei ist Θ die gemessene Elliptizität (in grad), MW das Molekulargewicht des Proteins (in g mol⁻¹), c die Proteinkonzentration (in mg ml⁻¹), d die Schichtdicke der Küvette (in cm) und N_{AS} die Anzahl der Aminosäuren im Protein.

Die CD-Spektroskopie bietet auch die Möglichkeit die Interaktion von Metallen mit Proteinen zu untersuchen. Im sichtbaren Bereich zwischen 300 und 800 nm (VIS-CD) liefern gebundene Metallionen in chiraler Umgebung detektierbare Signale, während ungebundene CD-inaktiv sind (Klewpatinond & Viles, 2007). Zur Charakterisierung der Bindung von Cu²⁺ an NM wurden Messungen mit 750 µg/ml NM in An- bzw. Abwesenheit von Cu²⁺ in unterschiedlichen Konzentrationen in Küvetten mit Schichtdicken von 0,5 cm mit folgenden Parametern durchgeführt:

Wellenlängenbereich	260 nm-800 nm
Auflösung	0,1 nm
Geschwindigkeit	50 nm/min
Response	1,0 s
Akkumulation	4
Küvettemperatur	25 °C

2.4.12 Fourier-Transformierte Infrarot Spektroskopie

Neben der CD-Spektroskopie kann auch die Fourier-Transformierte Infrarot (FTIR) Spektroskopie zur Sekundärstrukturanalyse von Proteinen verwendet werden. Proteine weisen mehrere charakteristische IR-Absorptionsbanden auf. Diese stellen vor allem Schwingungen des Polypeptidrückgrats dar. Die aussagekräftigste und best untersuchte Bande ist die Amid I Bande zwischen 1600 und 1700 cm^{-1} , der im Wesentlichen die C=O Streckschwingung zugrunde liegt. Da die C=O- und N-H-Gruppen der Proteine an der Ausbildung von Wasserstoffbrücken in den verschiedenen Sekundärstrukturen beteiligt sind, hängen Frequenzlage und Form der IR-Banden empfindlich von der Sekundärstruktur des Proteins ab. α -Helices erzeugen dabei Peaks zwischen 1648 und 1660 cm^{-1} , β -Faltblätter zwischen 1612 und 1640 cm^{-1} , β -Turns zwischen 1660 und 1700 cm^{-1} , und unstrukturierte Bereiche liefern Peaks zwischen 1640 und 1660 cm^{-1} (Arrondo & Goni, 1999; Tamm & Tatulian, 1997).

Die zu untersuchenden NM-Proben wurden auf Kalziumfluoridplättchen präpariert und luftgetrocknet. Um das enthaltene GdmCl zu entfernen wurden die Proben vorher in Mini-Slide-A-Lyzern dialysiert. Die Analyse erfolgte an einem IR-Mikroskop (IRscope), das an ein IR-Spektrometer (IFS 66/s) gekoppelt war. Es wurden polarisierte Absorptionsspektren im Bereich von 700-6000 cm^{-1} mit einer Auflösung von 4 cm^{-1} aufgenommen. Die Sekundärstrukturanteile wurden durch Dekonvolution (Gauss) der Amid I Bande bestimmt (OriginPro 7.5). Die Messungen wurden freundlicherweise von Sebastian Rammensee (Lehrstuhl für Physik, TU München) durchgeführt.

2.4.13 Ultraschall-Resonator-Technologie

Mit der Ultraschall-Resonator-Technologie (URT), auch „Molekulare Akustik“ genannt, können konformationelle Änderungen von Proteinen und die Bindung von Liganden detektiert werden. Es wird dazu die Geschwindigkeit und Absorption von Ultraschallwellen in Flüssigkeit und so die Änderungen von Moleküleigenschaften und Interaktionen zwischen Molekülen in wässriger Phase gemessen. Die Ultraschallgeschwindigkeit in wässrigen Lösungen wird hauptsächlich durch deren Kompressibilität bestimmt. Je dichter ein Medium, umso höher ist die Ultraschallgeschwindigkeit. So haben Änderungen der Struktur des Wassers an der Grenzfläche zwischen Lösungsmittel und gelösten oder suspendierten Komponenten (Hydratwasser) Auswirkungen auf die Ultraschallgeschwindigkeit. Ursache dafür sind die Unterschiede in der Struktur der Wasserstoffbrücken der Hydrathüllen. Ändert ein Protein seine Struktur, so ändert sich auch die Anordnung der Wasserstoffbrücken seiner

Hydrathülle, was zu einer Änderung der Ultraschallgeschwindigkeit führt. Zur Absorption von Ultraschall kann es durch Änderungen der Viskosität des Lösungsmittels und durch Relaxation kommen. Ändert sich die Beweglichkeit eines Proteins in Lösung z. B. durch seine Oligomerisierung, kann dies zu einer Änderung der Ultraschallabsorption führen.

Zur Untersuchung der Bindung von M^{2+} (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+}) an NM wurden die strukturellen Änderungen mittels Ultraschallgeschwindigkeit in einem ResoScan[®] System gemessen. Es wurden jeweils gleiche Volumina einer MCl_2 -Stammlösung mittels einer 10 μ l-Hamiltonspritze mit stumpfer Spitze und Chaney Adapter (Hamilton) zu beiden Messzellen, der Probenzelle und der Referenzzelle, gegeben (Messparameter s. u.). Die Messungen wurden mit entgasten Lösungen bei einer konstanten Temperatur von 25 °C durchgeführt. Nach Zugabe der MCl_2 -Lösung musste gewartet werden bis sich wieder die gleiche Temperatur wie vor Zugabe einstellte (auf 0,01 °C genau). Dann konnte der Wert für die Ultraschallgeschwindigkeit abgelesen werden.

	Titration 1: 0-50 μM M^{2+}	Titration 2: 0-12 mM M^{2+}
MCl_2-Stammlösungen	in MQ-H ₂ O A) 0,36 mM B) 1,8 mM	in MQ-H ₂ O C) 7,2 mM D) 36 mM E) 72 mM F) 360 mM G) 720 mM
Probenzelle	180 μ l 0,95 mg/ml NM in NEM-Puffer	180 μ l 0,95 mg/ml NM in NEM-Puffer
Referenzzelle	180 μ l NEM-Puffer	180 μ l NEM-Puffer
Titration	20 x 0,5 μ l A) 6 x 0,5 μ l B)	5 x 0,5 μ l C) 4 x 0,5 μ l D) 6 x 0,5 μ l E) 5 x 1,0 μ l E) 2 x 1,0 μ l F) 1 x 1,0 μ l G)

Zur Bestimmung der Bindekonstante wurde das relative molare Inkrement der Ultraschallgeschwindigkeit

$$[U] = (U - U_0) / (U_0 C)$$

berechnet. Dabei ist U bzw. U_0 die Ultraschallgeschwindigkeit in der Proben- bzw. Referenzzelle und C die entsprechende Proteinkonzentration in mol/l (Chalikian *et al.*, 1994). $[U]$ wurde gegen das molare Verhältnis von M^{2+} - zu Proteinkonzentration aufgetragen und die Bindekonstante mit Hilfe eines hyperbolischen bzw. sigmoidalen Fits bestimmt.

2.4.14 Isotherme Titrationskalorimetrie

Eine geeignete Methode, Wechselwirkungen von Proteinen mit Liganden aller Art zu untersuchen und zu charakterisieren, stellt die isotherme Titrationskalorimetrie (*isothermal titration calorimetry*, ITC) dar. Sie bietet eine nicht-invasive Möglichkeit, bei Interaktion frei werdende oder absorbierte Wärme als thermodynamischen Parameter direkt (ohne chemische Veränderungen an einem der Bindungspartner) zu messen. Einer der Reaktionspartner (bei Bindung niedermolekularer Liganden das Protein) wird in der Messzelle vorgelegt, der andere in definierten Portionen dazu injiziert. Die bei der Injektion veränderten Wärmetönungen werden im Vergleich zu einer wassergefüllten Referenzzelle ausgegeben. Die Signalveränderungen, die die einzelnen Injektionen verursachen, werden über die Zeit aufgezeichnet. Integration der Fläche unterhalb des Messsignals liefert Werte für die frei werdende bzw. absorbierte Bindungswärme der jeweiligen Injektion. Trägt man das molare Verhältnis der Interaktionspartner gegen den Wärmeverlauf der Titration auf, ergibt sich eine Kurve mit sigmoidalem Verlauf, die von den Parametern n , K_A und ΔH abhängt. Die Lage des Wendepunkts dieser Kurve entspricht der Bindungsstöchiometrie n . Der Parameter K_A kann als apparente Bindekonstante interpretiert werden. ΔH entspricht der bei der Bindung freigewordenen bzw. verbrauchten Enthalpie (O'Brien *et al.*, 2000).

Zur Untersuchung der Bindung von Cu^{2+} an NM wurde ein VP-ITC Kalorimeter verwendet. Die Messungen wurden mit entgasten Lösungen bei einer konstanten Temperatur von 30 °C durchgeführt (Messparameter s.u.). Die Berechnung der Bindekonstante erfolgte mit der Standard-Auswertesoftware (OriginLab).

Probenzelle	25 μM NM in 25 mM NEM, pH 7,0, 150 mM NaCl
Ligand	2,5 mM CuCl_2 in 25 mM NEM, pH 7,0, 150 mM NaCl
Referenzzelle	MQ- H_2O
Injektionen	1 x 0,7 μl , 44 x 4 μl
Injektionsdauer	8 s
Injektionsintervalle	Injektionen 1-8 350 s, ab 9 300 s
Rührgeschwindigkeit	300 rpm

2.4.15 Elektronenspinresonanz

Mittels Elektronenspinresonanz (*electron paramagnetic resonance*, EPR) wird die Absorption von Mikrowellenstrahlung an paramagnetischen Ionen oder Molekülen mit ungepaarten Elektronen im Magnetfeld untersucht. Diese Methode erlaubt so die Analyse der Struktur paramagnetischer Metallionen in Lösung und im Festkörper (Atkins, 1990).

Bei der Untersuchung der Kupferbindung an NM gaben die EPR-Messungen somit Aufschluss darüber, ob im Ansatz enthaltenes Cu^{2+} in Lösung oder gebunden vorlag. Die EPR-Messungen wurden mit paramagnetischem ^{63}Cu durchgeführt. $^{63}\text{CuCl}_2$ (100 mM) wurde durch Umsetzung von ^{63}CuO (2,5 mg) mit HCl (2 M, 31,6 μl) im Vakuum hergestellt. NM in 6 M GdmCl wurde durch 1.000-fache Verdünnung mit 5 mM $\text{K}_x\text{H}_x\text{PO}_4$ pH 6,8, 40 mM NaCl, 2 mM Glycin rückgefaltet (Endkonzentration 150 $\mu\text{g/ml}$ NM). 1 mM $^{63}\text{CuCl}_2$ war entweder schon im Rückfaltungspuffer enthalten, oder wurde erst 5 min nach Rückfaltung bzw. nach Fibrillenbildung zugegeben. Die EPR-Spektren wurden im X-Band (9,48 GHz) mit einem ELEXSYS 580 Spektrometer mit einer T_{102} Kavität (Mikrowellenenergie 0,2 mW, Magnetfeldbreite 1200 Gauss, Modulation der Amplitude 5 Gauss) bei -196°C aufgenommen. Die Messungen wurden freundlicherweise von Matthias Mentler und Moritz Ammelburg (Lehrstuhl für Physik-Biophysik, TU München) durchgeführt.

2.4.16 Flussfeldflussfraktionierung und statische Lichtstreuung

Um das Oligomerisierungsverhalten von NM zu untersuchen, wurde die molare Masse der Proteinpartikel mittels asymmetrischer Flussfeldflussfraktionierung (AF4) und statischer Lichtstreuung untersucht. Die AF4 ist eine matrixfreie Chromatographiemethode, bei der Partikel in einem Feld aufgetrennt und durch einen parabolischen Fluss im Trennkanal sukzessiv eluiert werden (Colfen & Antonietti, 2000). Während eines Experiments wird zunächst die Probe in den Trennkanal injiziert. Durch ein Flussfeld werden die in der Probe enthaltenen Partikel aufgetrennt. Dabei wird ein Fluss durch die porösen Kanalwände senkrecht zum Kanal von der Decke zum Kanalboden angelegt (*cross flow*). Eine Membran am Kanalboden erlaubt dabei den Durchtritt des Puffers, nicht aber der zu analysierenden Partikel. Diesem Flussfeld wirkt die Diffusion der Probenpartikel entgegen. Dadurch entsteht eine, mit zunehmender Höhe über dem Kanalboden exponentiell abnehmende Verteilung der Teilchen. Die durchschnittliche Aufenthaltshöhe hängt dabei neben dem *cross flow* und der Viskosität des Lösungsmittels von dem Stokesradius der Teilchen ab. Kleine Partikel halten sich durchschnittlich weiter in der Kanalmitte auf als größere. Anschließend wird ein

laminarer Fluss längs des Kanals angelegt, der ein parabolisches Flussprofil ausbildet (*channel flow*). Dadurch erfahren die Partikel abhängig von der durchschnittlichen Aufenthaltshöhe über dem Kanalboden eine unterschiedliche Flussrate in Richtung des Kanalausgangs, was zu verschiedenen Retentionszeiten der einzelnen Partikelspezies führt.

Die Untersuchung von NM mittels AF4 wurde unter denaturierenden und nativen Bedingungen durchgeführt. Die Messparameter sind in folgender Tabelle aufgeführt.

	Denaturierend 1	Denaturierend 2	Nativ
Protein	1 mg/ml NM in 350µl 8 M HST	1 mg/ml NM in 350µl 6 M GdmCl	1 mg/ml NM nach Rückfaltung aus 6 M GdmCl in NEM-Puffer
Laufpuffer	5 mM Tris/HCl pH8, 40 mM NaCl, 8 M HST		NEM Puffer
Membran	Polyethersulfon (MWCO 5 kDa) bzw. regenerierte Zellulose (MWCO 10 kDa)		
Flussraten	<i>channel flow</i> 0,3 ml/min; <i>inject flow</i> 0,3 ml/min; <i>focus flow</i> 1 ml/min, <i>cross flow</i> 1 ml/min		
Kanalhöhe	490 µm		

Die Bestimmung der molaren Masse der aufgetrennten Proteine erfolgte durch den an den Kanalausgang angeschlossenen Lichtstredetektor DawnEOS. Die Lichtstreuung ist direkt proportional zur molaren Masse eines Partikels und kommt daher ohne die Verwendung von Proteinstandards aus (Zimm, 1948). Die für die Berechnung der molaren Masse eines Proteins aus der statischen Lichtstreuung benötigte Proteinkonzentration wurde durch die Messung des Brechungsindex der Proteinlösung mit Hilfe des RI-Detektors 71 bestimmt. Alternativ wurde bei Messungen unter denaturierenden Bedingungen die Proteinkonzentration über die UV-Absorption bei 280 nm bestimmt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms Astra. Dafür war die Kenntnis des Brechungsindexinkrements dn/dc notwendig. Dies wurde mit der Formel

$$\frac{dn}{dc} = \frac{n_p - n_s}{\rho_p}$$

unter Verwendung folgender Parameter berechnet.

Brechungsindex	Protein	$n_p = 1,585$
	Puffer mit 8 M HST	$n_s = 1,397$
	nativer Puffer	$n_s = 1,330$
Dichte	Protein	$\rho_p = 1,380$
Brechungsindexinkrement	in 8 M HST	$dn/dc = 0,138$
	in nativem Puffer	$dn/dc = 0,185$

2.4.17 Rasterkraftmikroskopie

Bei der Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy*, AFM) wird ein Bild von der Oberfläche einer Probe durch das mechanische Abtasten mit einer feinen Nadel erhalten. Dabei werden Anziehungs- bzw. Abstoßungskräfte zwischen der Spitze und der Probe gemessen (Binnig *et al.*, 1986). Die Bewegung der Probe in alle drei Raumkoordinaten wird dabei durch Piezokristalle vermittelt. Während des Scannens über die Probe wird die Auslenkung der Nadel durch die Reflexion eines Lasers detektiert und in ein Signal verwandelt (Auslenkung). Dieses Signal wird wiederum verwendet um den Abstand der Probenoberfläche zur Nullposition der Spitze mit Hilfe des so genannten Z-Piezokristalles zu korrigieren. Das berechnete Signal für den Z-Piezo (Höhe) kann wie die Auslenkung abgebildet werden und vermittelt so einen optischen Eindruck von der Probe. Es gibt verschiedene Messmethoden. Im *Tapping Mode* wird die Spitze an einem oszillierenden *Cantilever* über die Probe bewegt. Die Spitze steht hierbei nicht in ständigem Kontakt mit der Probe, was meist zu einer höheren lateralen Auflösung und weniger Beschädigung der Probe führt. Im *Contact Mode* steht die Spitze mit konstanter Kraft in ständigem Kontakt zur Probenoberfläche. Dabei auftretende Reibungskräfte können jedoch die Probe beschädigen und zu einer verzerrten Darstellung führen.

Die Messungen an NM, PABPN1 N-WT und N-(+7)Ala wurden mit einem Multimode SPM Mikroskop im *Contact* bzw. *Tapping Mode* durchgeführt. Für die Probenpräparationen wurden 10-30 μl Probe auf frisch gespaltene Glimmerplättchen, die auf AFM-Probenplättchen (\varnothing 15 mm) aufgeklebt waren, aufgetragen und für 3 min inkubiert. Nach Entfernen der Flüssigkeit wurde die Probe drei Mal mit je 100 μl MQ-H₂O gewaschen und luftgetrocknet. Die AFM-Aufnahmen wurden an Luft mit Siliciumnitrid-*Cantilevern* (*Contact Mode*: DNP-S20, Veeco; Spitzenradius \sim 10 nm, Federkonstante 0,06 N/m; *Tapping Mode*: NCH-50, Nanosensors; Spitzenradius \sim 7 nm) und einer Aufnahmegeschwindigkeit von 1,5 Hz durchgeführt. Für Höhen- und Breitenbestimmungen wurde die Software Nanoscope (Veeco) verwendet.

2.4.18 Transmissionselektronenmikroskopie

Zur Untersuchung der Struktur und der Morphologie der Hefepriofibrillen wurde neben der Rasterkraftmikroskopie auch die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) verwendet. Dabei wird eine dünne Probe von Elektronen durchstrahlt und so auf einem Leuchtschirm abgebildet. Für die Probenpräparation wurden mit amorpher Kohlefolie beschichtete Kupfernetzchen (*Grids*) verwendet, die für eine bessere Probenadsorption durch das Beglimmen unter Hochvakuum bei hoher Spannung kurzfristig einen hydrophilen Charakter verliehen bekamen. 5 µl der Probe wurden für 1 min auf dem *Grid* inkubiert und der Überstand mit Filterpapier entfernt. Anschließend wurden die *Grids* 2 x 30 s mit 10 µl MQ-H₂O gewaschen. Für die Negativkontrastierung wurden 10 µl einer 1-prozentigen wässrigen Uranylacetat-Lösung für 30 s auf dem *Grid* inkubiert. Nach Entfernen der Lösung wurde die Probe getrocknet. Bei diesem Verfahren lagert sich das Schwermetallsalz an die Proteine an und ermöglicht aufgrund seiner stark elektronenstreuenden Eigenschaften die Darstellung der Probe im TEM. Die Proben wurden in einem Jeol 100 CX bei einer Anodenspannung von 100 kV betrachtet bzw. auf Film abgelichtet.

2.4.19 Röntgenbeugungsanalyse

Durch die Röntgenbeugung an Fibrillen (*X-ray fibre diffraction*) können ebenso wie bei der Röntgenkristallographie durch Beugung eines Röntgenstrahls an einem Kristallgitter Aussagen über die Struktur eines Proteins getroffen werden. Wegen der regelmäßigen Anordnung der Atome, kommt es zur Interferenz der von den Atomen emittierten Röntgenstrahlung. Meist führt diese Interferenz zur Auslöschung, aber in bestimmten Richtungen ergibt eine konstruktive Interferenz einen in Bezug auf den Primärstrahl gebeugten Röntgenstrahl. Die Richtung des gebeugten Röntgenstrahls ist dabei von dem kristallinen Gitter abhängig (Lottspeich & Zorbas, 1998). Bei der Röntgenkristallographie ist die regelmäßige, periodisch sich wiederholende räumliche Anordnung der Atome im Kristallgitter wichtig. Um diese Regelmäßigkeit bei fibrillären Proteinen zu erhalten, müssen bei der Röntgenbeugungsanalyse die Fibrillen möglichst parallel angeordnet werden, um die Beugung des Röntgenstrahls und somit sich wiederholende Strukturen innerhalb der Fibrille aufzeigen zu können.

Suspensionen von NM- und eADF-4(C16)-Fibrillen wurden für eine partielle Ausrichtung zwischen zwei mit Wachs verschlossene Kapillaren platziert und an Luft getrocknet. Die Röntgenbeugungsmuster wurden unter Verwendung einer Cu-K α rotierenden Anode und

eines R-Achsen 4++ Detektors mit einem Abstand von 160 oder 150 mm zwischen Detektor und Probe aufgenommen. Die Röntgenbeugungsmuster wurden mit der Software CrystalClear (MSC) geprüft und mit Mosflm ausgewertet. Die Messungen wurden freundlicherweise von Thusnelda Stromer und Louise Serpell (University of Sussex, UK) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Rasterkraftmikroskopische Charakterisierung amyloider PABPN1-Fibrillen

3.1.1 Einführung

Die okulopharyngeale Muskeldystrophie (OPMD) ist eine autosomal-dominant vererbte Krankheit. Sie wird von einer kurzen GCG-Trinukleotid-Expansion im aminoterminalen Teil des Poly(A)-bindenden Proteins 1 (PABPN1) verursacht, wobei die natürliche Polyalaninsequenz (bestehend aus zehn Alaninen) um bis zu sieben Alanine verlängert vorliegt. Bei OPMD-Patienten wurden intranukleäre fibrilläre Aggregate, bestehend aus PABPN1, gefunden (s. a. 1.1.3).

Um den Einfluss der Alanin-Expansion auf die Ausbildung amyloider PABPN1-Fibrillen zu untersuchen, wurde der aminoterminal Bereich (N-WT, enthält zehn Alanine) und eine Mutante mit sieben zusätzlichen Alaninen (N-(+7)Ala) rekombinant hergestellt und die Fibrillenbildung mittels Bindung von ANS (8-Anilino-naphthalen-1-sulfonat) von Grit Lodderstedt (Institut für Biotechnologie, MLU Halle-Wittenberg) analysiert.

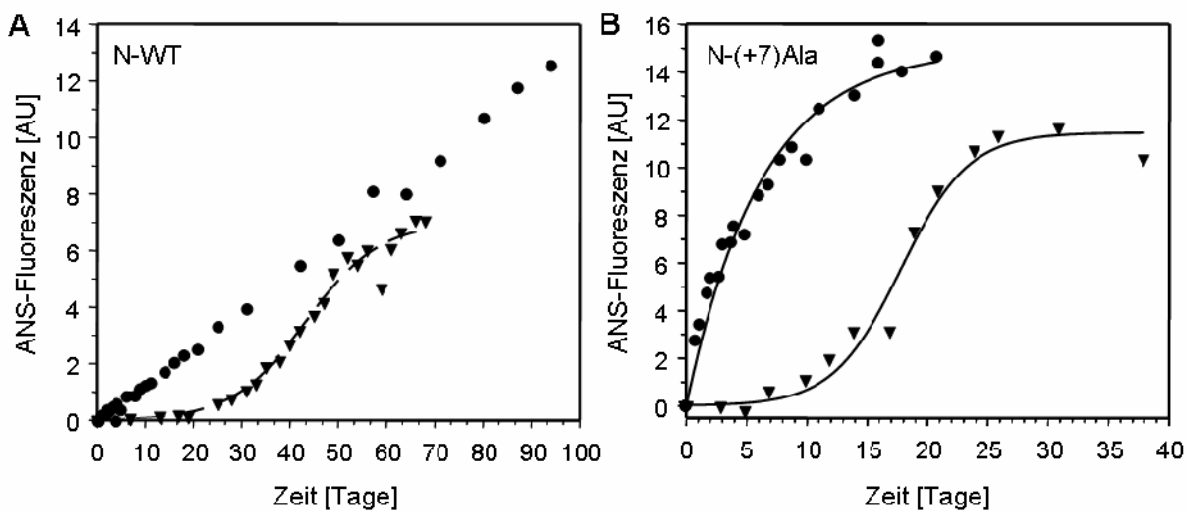


Abbildung 3-1 Fibrillenbildungskinetik von N-WT und N-(+7)Ala. Jeweils 1 mM Protein in 5 mM KH_2PO_4 pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 % (w/v) NaN_3 wurde bei 37 °C inkubiert und die Fibrillenbildung mittels ANS-Fluoreszenz bei 480 nm (Anregungswellenlänge: 370 nm) beobachtet (5 μM Protein und 50 μM ANS Endkonzentration). (A) Fibrillenbildung von N-WT in Abwesenheit (▼) und Anwesenheit von 0,1 % (w/v) Seeds (●). (B) Fibrillenbildung von N-(+7)Ala in Abwesenheit (▼) und Anwesenheit von 0,1 % (w/v) Seeds (●) (aus Lodderstedt *et al.*, 2007).

Die Fibrillenbildung von N-WT startet nach einer Lag-Phase von ca. 30 Tagen (Abbildung 3-1A), während bei N-(+7)Ala die Fibrillenbildung schon nach einer Lag-Phase von ca. 10 Tagen erfolgt (Abbildung 3-1B). Im Fall von N-(+7)Ala kann die Fibrillenbildung durch

die Zugabe von *Seeds* (hergestellt durch Ultraschallbehandlung von vorgeformten Fibrillen) beschleunigt werden (Abbildung 3-1B). Bei N-WT führt die Zugabe von *Seeds* zwar zu einer leicht erhöhten ANS-Fluoreszenz, jedoch kann selbst nach fast 100 Tagen keine Sättigung beobachtet werden (Abbildung 3-1A).

Neben den Unterschieden in der Fibrillenbildungskinetik konnten auch Unterschiede in der chemischen Stabilität der Fibrillen detektiert werden. N-WT-Fibrillen zeigen eine geringere Stabilität gegenüber der Denaturierung mit Guanidiniumthiocyanat als N-(+7)Ala-Fibrillen (Lodderstedt *et al.*, 2007). Mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) sind jedoch keine signifikanten morphologischen Unterschiede zwischen N-WT und N-(+7)Ala zu beobachten (Abbildung 3-2).

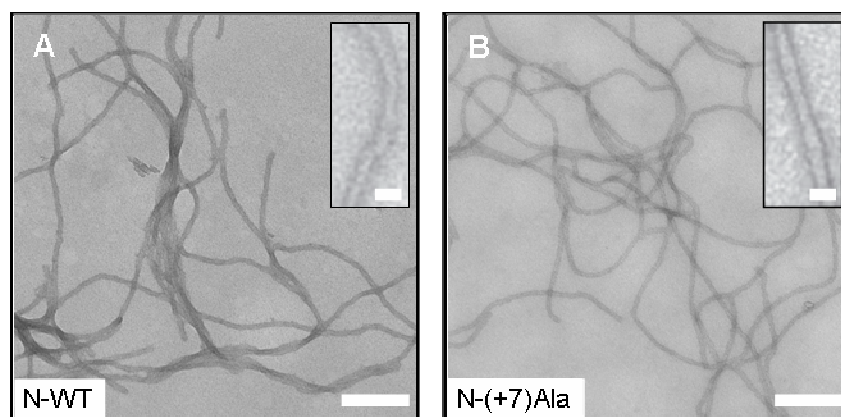


Abbildung 3-2 Vergleich von N-WT- und N-(+7)Ala-Fibrillen mittels TEM. TEM-Aufnahmen (Negativkontrastierung) von N-WT-Fibrillen (A) und N-(+7)Ala-Fibrillen (B) assembliert aus 1 mM Protein in Abwesenheit von *Seeds* nach 30-60-tägiger Inkubation. Maßstab: 100 nm, Einschub 25 nm (aus Lodderstedt *et al.*, 2007).

3.1.2 Rasterkraftmikroskopische Untersuchung von N-WT- und N-(+7)Ala-Fibrillen

Im Rahmen dieser Arbeit konnten mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie (AFM) Unterschiede in der Oberflächenstruktur von N-WT- und N-(+7)Ala-Fibrillen detektiert werden, die mit TEM nicht ersichtlich waren. Dazu wurden Fibrillen auf Glimmer präpariert und die Proben im *Tapping Mode* untersucht. Während N-(+7)Ala-Fibrillen eine relativ glatte Oberfläche aufweisen, zeigen N-WT-Fibrillen eine sehr ausgeprägte Feinstruktur mit definierten Untereinheiten, ähnlich einer Perlenkette. Die Größe dieser Untereinheiten beträgt dabei 27-43 nm und variiert in definierten 4 nm-Abständen (Abbildung 3-3).

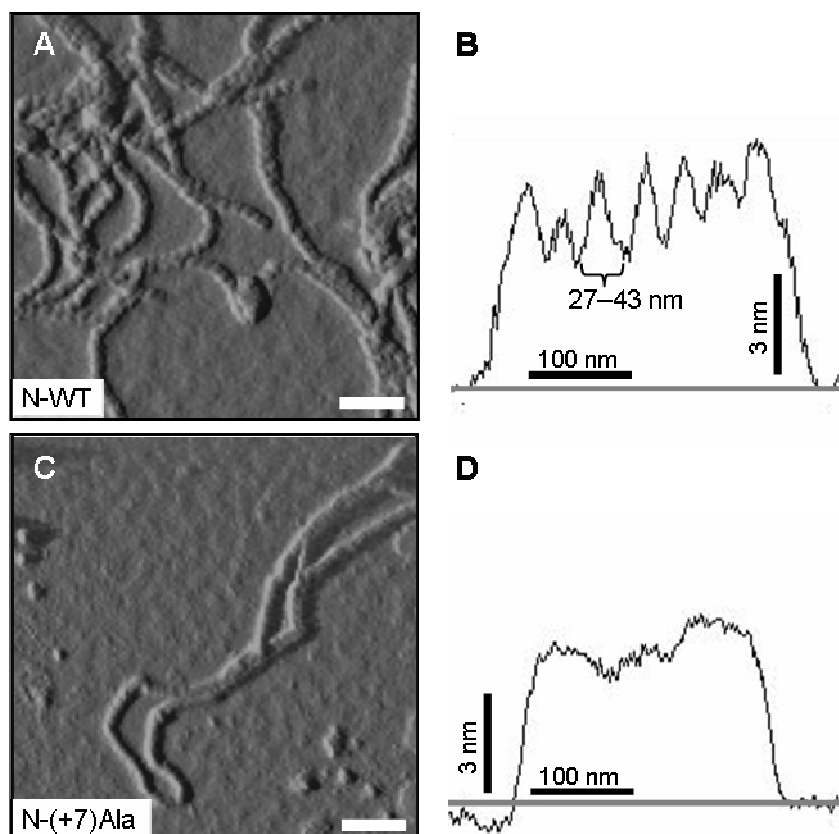


Abbildung 3-3 Vergleich von N-WT- und N-(+7)Ala-Fibrillen mittels AFM. AFM-Aufnahmen (*Tapping Mode, Amplitude*) von N-WT-Fibrillen (A) und N-(+7)Ala-Fibrillen (C) assembliert aus 1 mM Protein in Abwesenheit von *Seeds* nach 30-60-tägiger Inkubation (Maßstab: 200 nm). (B, D) Längsschnitte durch die Fibrillen (*Nanoscope Section Analysis*) zur näheren Bestimmung der Oberflächenstruktur von N-WT- (B) und N-(+7)Ala-Fibrillen (D).

Darüber hinaus wurde untersucht, ob sich die Oberflächenstruktur der N-WT-Fibrillen durch *Cross-Seeding* auf N-(+7)Ala übertragen lässt. Dazu wurde die Fibrillenbildung von N-(+7)Ala bzw. N-WT mit N-WT- bzw. N-(+7)Ala-*Seeds* induziert. Nach 30-60-tägiger Inkubation wurden die Proben rasterkraftmikroskopisch untersucht (Abbildung 3-4). Als Kontrolle wurden Fibrillen aus Experimenten mit *Seeds* aus identischem Protein präpariert. Durch dieses homologe *Seeding* entstandene N-(+7)Ala-Fibrillen weisen eine identische Oberflächenstruktur wie Fibrillen auf, die in Abwesenheit von *Seeds* assemblierten (Abbildung 3-4B). N-(+7)Ala-Fibrillen, die in Anwesenheit von N-WT-*Seeds* gebildet wurden, unterscheiden sich morphologisch nicht davon. Es sind weder eine Übertragung der N-WT-Feinstruktur auf N-(+7)Ala, noch Unterschiede der Struktur innerhalb einer Fibrille zu erkennen (Abbildung 3-4D). Interessanterweise zeigen N-WT-Fibrillen, die in Anwesenheit von N-(+7)Ala-*Seeds* gebildet wurden, eine weniger ausgeprägte Oberflächenstruktur als reine N-WT-Fibrillen (Abbildung 3-4C).

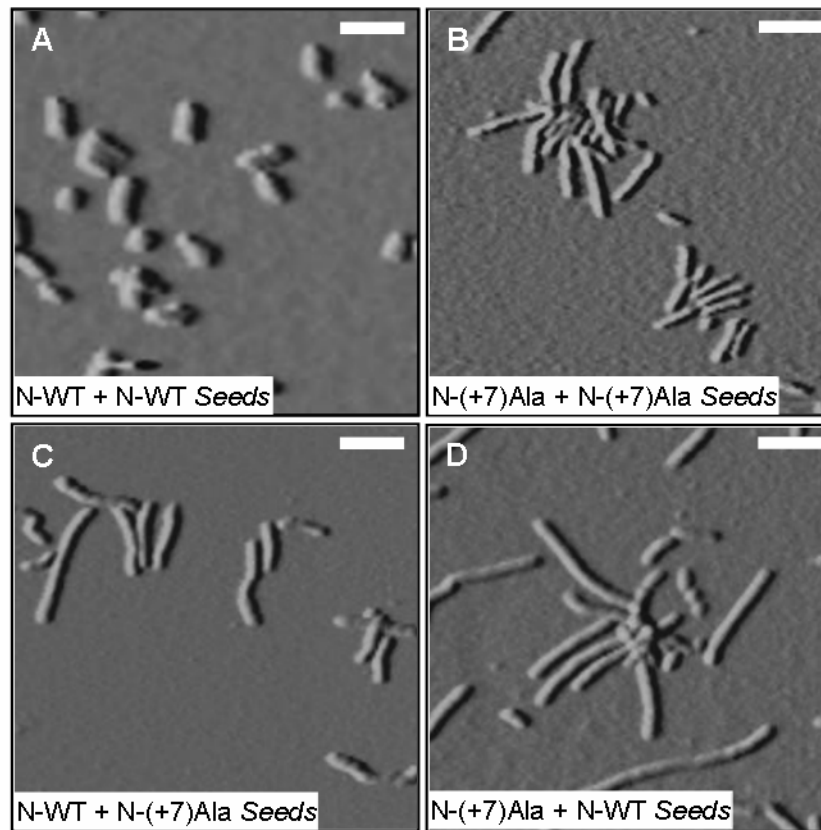


Abbildung 3-4 Vergleich von geseedeten N-WT- und N-(+7)Ala-Fibrillen mittels AFM. AFM-Aufnahmen (*Tapping Mode, Amplitude*) von Fibrillen assembliert aus 1 mM Protein in Anwesenheit von 0,1 % (w/v) *Seeds* nach 30-60-tägiger Inkubation: (A) N-WT inkubiert mit N-WT *Seeds*, (B) N-(+7)Ala inkubiert mit N-(+7)Ala *Seeds*, (C) N-WT inkubiert mit N-(+7)Ala *Seeds* und (D) N-(+7)Ala inkubiert mit N-(+7)Ala *Seeds* (Maßstab: 200 nm).

Homologes *Seeding* von N-WT lieferte überraschenderweise ausschließlich kurze Fibrillen (Abbildung 3-4A). Möglicherweise haben die *Seeds* ihre *Seeding*-Fähigkeit verloren, weswegen die moderate Zunahme der ANS-Fluoreszenz bei homologem *Seeding* von N-WT (Abbildung 3-1) wahrscheinlich kein Fibrillenwachstum widerspiegelt.

3.2 Untersuchung der Assemblierungseigenschaften und -formen der Hefepriondomäne Sup35p-NM

Das Auftreten von amyloiden Aggregaten ist charakteristisch für Prionproteine. Kommt es bei Säugern zur Ablagerung von amyloiden Prionplaques, aggregiert bei der Bäckerhefe *S. cerevisiae* der Translationsterminationsfaktor Sup35p im Zytoplasma. *In vitro* bildet Sup35p amyloide Fibrillen (Serio *et al.*, 2000). Diese Fibrillen besitzen Eigenschaften, die auch für andere amyloide Proteine beschrieben wurden. Sie sind aber, im Gegensatz zu den meisten Amyloiden, nicht pathogen. Dies macht Sup35p zu einem interessanten Modellprotein zur Untersuchung der Assemblierungseigenschaften und -formen amyloider Proteine.

Zur Ausbildung amyloider Fibrillen sind der aminoternale Bereich N und die Mitteldomäne M von Sup35p essentiell. Die carboxyterminale Region C, welche die Translations-terminationsaktivität trägt, wird für die Fibrillenbildung nicht benötigt. Da C im Experiment vermehrt zu unspezifischer Aggregation führt, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Priondomäne NM von Sup35p verwendet.

3.2.1 Lösliches Sup35p-NM

Die Assemblierung von NM zu amyloiden Fibrillen *in vitro* ist ein spontaner Prozess. Da NM ein nativ ungefaltetes Protein ist, muss es, im Gegensatz zu anderen nativ strukturierten amyloidogenen Proteinen, für die „Umfaltung“ zu amyloiden Fibrillen nicht erst partiell entfaltet werden. Bei nativ gefalteten Proteinen, wie z. B. PrP, muss die Fibrillenbildung durch äußere Faktoren wie Temperatur, pH-Wert oder durch die Zugabe von chemischen Denaturierungsmitteln induziert werden (Vendreyly & Scheibel, 2006). NM dagegen oligomerisiert in wenigen Minuten (Scheibel *et al.*, 2004) und bildet unter physiologischen Bedingungen Fibrillen.

Es ist daher schwierig unter nativen Bedingungen NM in monomerer Form anzureichern. NM wurde dazu zuerst denaturiert und durch 100-fache Verdünnung in nicht-denaturierendem Puffer renaturiert. Da in 8 M Harnstoff NM-Oligomere nicht vollständig gelöst werden können, wurde 6-8 M Guanidiniumhydrochlorid (GdmCl) als Denaturierungsmittel verwendet. Nach Rückfaltung blieb eine Restkonzentration von 60-80 mM GdmCl im Reaktionsansatz zurück. Um monomeres NM in Abwesenheit von GdmCl zu erhalten, wurde NM nach Rückfaltung in nativem Puffer sofort lyophilisiert. Lyophilisiertes NM kann ohne vorherige Denaturierung in nativem Puffer gelöst werden. Zur Kontrolle, ob das so behandelte

NM in monomerer Form vorliegt, wurde asymmetrische Flussfeldflussfraktionierung (AF4) durchgeführt. AF4 ist eine Chromatographiemethode, bei der eine Auftrennung unterschiedlich großer Partikel in einem Flusskanal mittels Querfluss möglich ist. Durch einen statischen Lichtstredetektor kann ohne Verwendung eines Größenstandards das Molekulargewicht bestimmt werden. Die Messungen wurden in Anwesenheit von 8 M Harnstoff durchgeführt, um eine schnelle Assemblierung von NM zu vermeiden. In Proben mit lyophilisiertem NM, das in 8 M Harnstoff gelöst wurde, kann monomeres NM mit einem Molekulargewicht von ca. 28 kDa, aber auch höhermolekulare Assemblierungsformen, die ein Molekulargewicht von 850-5000 kDa besitzen, detektiert werden (Abbildung 3-5). Der Anteil an höhermolekularem NM beträgt jedoch weniger als 1 % (gemessen mittels UV-Absorption).

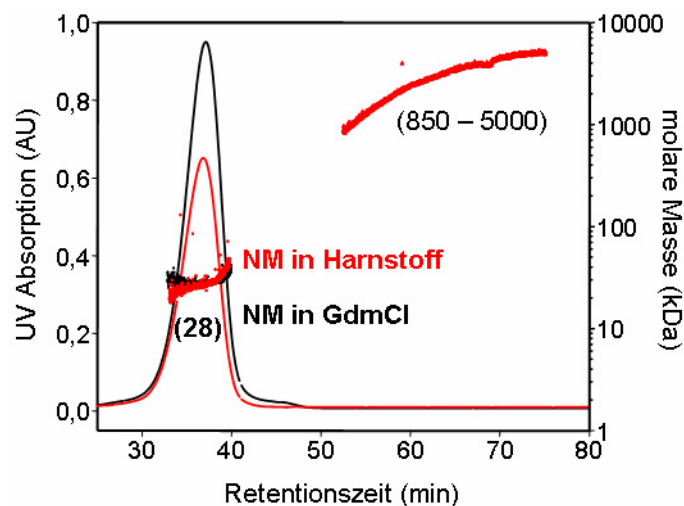


Abbildung 3-5 Analyse von lyophilisiertem NM nach AF4 mittels statischer Lichtstreuung. Als Laufpuffer wurde 5 mM Tris/HCl pH 8, 40 mM NaCl, 8 M Harnstoff verwendet; lyophilisiertes NM^{wt} (1 mg/ml) wurde in Laufpuffer oder in 6 M GdmCl gelöst. Die Elution von NM aus dem AF4-Kanal wurde durch die Messung der UV-Absorption zeitlich verfolgt (durchgezogene Linie). Aus der Konzentration und der Lichtstreuung wurde die molare Masse berechnet (Punkte); die ermittelte molare Masse (in kDa) ist in Klammern angegeben.

Nur durch Denaturierung von lyophilisiertem NM in 6 M GdmCl kann ausschließlich monomeres NM erhalten werden (Abbildung 3-5), weswegen die folgenden Untersuchungen mit in GdmCl gelöstem und durch Verdünnung rückgefaltetem NM durchgeführt wurden.

3.2.2 Amyloide Sup35p-NM-Fibrillen

Fibrillenassamblierung

Die Assemblierung von monomerem NM zu amyloiden Fibrillen ist ein zweistufiger Prozess, bestehend aus Keimbildung und Fibrillenwachstum, welcher mit Hilfe des amyloid-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffes Thioflavin T (ThT) detektiert werden kann. Die Bildung der Aggregationskeime spiegelt sich in einer Lag-Phase zu Beginn der Kinetik wider (Abbildung 3-6A). Diese Lag-Phase ist allerdings nur detektierbar, wenn NM zu Beginn der Reaktion tatsächlich als Monomer vorliegt. Nach ca. 15 h beginnt das Fibrillenwachstum und ist nach ca. 100 h beendet. In Anwesenheit künstlicher Aggregationskeime (*Seeds*) wird die Fibrillenbildung beschleunigt. Als *Seeds* dienten kurze Fibrillen, die durch Ultraschallbehandlung von vorgeformten Fibrillen hergestellt wurden. Durch die Zugabe von 2 % (w/w) *Seeds* wird die Fibrillenbildung um das 25-fache beschleunigt (Abbildung 3-6B). Nach 4 h ist die geseedete Assemblierung der Fibrillen beendet. Eine für ungeseedete Reaktionen charakteristische Lag-Phase kann dabei nicht beobachtet werden.

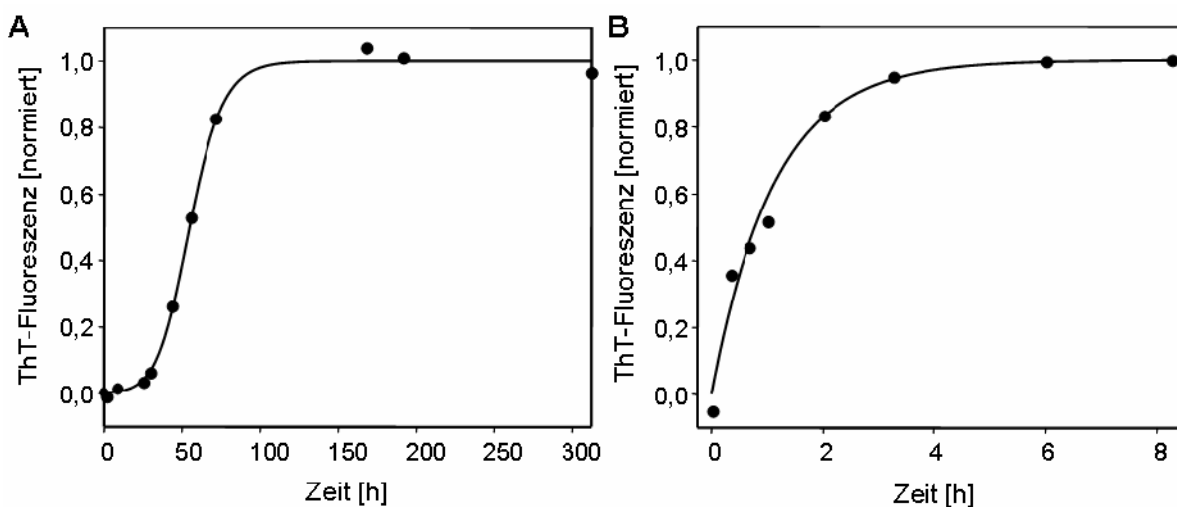


Abbildung 3-6 Fibrillenbildungskinetik von NM. Jeweils $5 \mu\text{M}$ NM^{wt} in NEM-Puffer wurden bei 20°C inkubiert und die Fibrillenbildung mittels ThT-Fluoreszenz bei 482 nm (Anregungswellenlänge: 450 nm) beobachtet ($1,25 \mu\text{M}$ Protein und $187,5 \mu\text{M}$ ThT Endkonzentration). Fibrillenbildung von NM in Abwesenheit (A) und Anwesenheit von 2 % (w/w) *Seeds* (B).

Neben der Geschwindigkeit ist auch die Menge an gebildeten Fibrillen in geseedeten und ungeseedeten Reaktionen verschieden. Aufgrund der Stabilität von Fibrillen gegenüber der Denaturierung mit SDS kann mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung die Menge an gebildeten Fibrillen bestimmt werden. Während lösliches NM auch ohne Hitzedenaturierung

in das Gel einläuft, ist fibrilläres Protein erst durch zusätzliche Denaturierung für 10 min bei 95 °C im Trenngel detektierbar. In geseedeten Reaktionen kann nach Abschluss der Fibrillenbildung kaum SDS-lösliches NM detektiert werden, in ungesedeten dagegen liegt meist noch 20-50 % in nicht-fibrillärer Form vor. Die Zustandsform des verbleibenden nicht-fibrillären NM wurde chromatographisch untersucht. Da die Auftrennung von NM-Oligomerisierungsformen unter nativen Bedingungen mit säulenchromatographischen Methoden aufgrund von unspezifischen Interaktionen problematisch ist, wurde die matrixfreie Auftrennung mittels AF4 durchgeführt. Jedoch konnte NM auch mit dieser Methode nicht erfolgreich analysiert werden, da es unter nativen Bedingungen (in NEM-Puffer) stark mit der Membran an der Akkumulationswand des Flusskanals interagiert.

Bei vielen amyloiden Proteinen wird die Fibrillenbildung durch die Erhöhung der Temperatur induziert. Es kommt dabei zu partieller Entfaltung der nativen Struktur des Proteins, was das Umfalten in die amyloide Struktur erleichtert (Uversky & Fink, 2004). Da NM ein nativ entfaltetes Protein ist, ist solch eine Entfaltung nicht notwendig. Bei hohen Temperaturen wird die Fibrillenbildung von NM sogar inhibiert statt induziert. Das Fibrillenwachstum ist bei 25 °C apparent am schnellsten und sinkt mit steigender Temperatur. Ab einer Temperatur von 60 °C kann NM selbst in geseedeten Reaktionen nicht mehr zu Fibrillen assemblieren (Scheibel & Lindquist, 2001; Scheibel *et al.*, 2004).

Um zu untersuchen welchen Einfluss hohe Temperaturen auf die Keimbildung haben, und ob die Selbstassemblierungsfähigkeit von NM verändert wird, wurde NM (in Abwesenheit von *Seeds*) zu Beginn der Fibrillenbildungskinetik unterschiedlich lange bei 60 °C und danach bei Raumtemperatur inkubiert (Abbildung 3-7A). Nach einstündiger Inkubation bei 60 °C kann kein Einfluss auf die Fibrillenbildung beobachtet werden. Durch achtstündige Inkubation wird die Keimbildungsdauer um 4 h auf ca. 19 h erhöht. Die Fibrillenbildung ist bei diesem Experiment erst nach ca. 130 h abgeschlossen. Die Inkubation für 25 h bei 60 °C führt zu einer Verlängerung der Lag-Phase auf ca. 48 h, die stationäre Phase wird dabei erst nach ca. 300 h erreicht. Die Intensität des ThT-Signals ist in diesem Fall um die Hälfte verringert. Nach 72-stündiger Inkubation bei 60 °C kann selbst nach 300 h keine Assemblierung von Fibrillen detektiert werden.

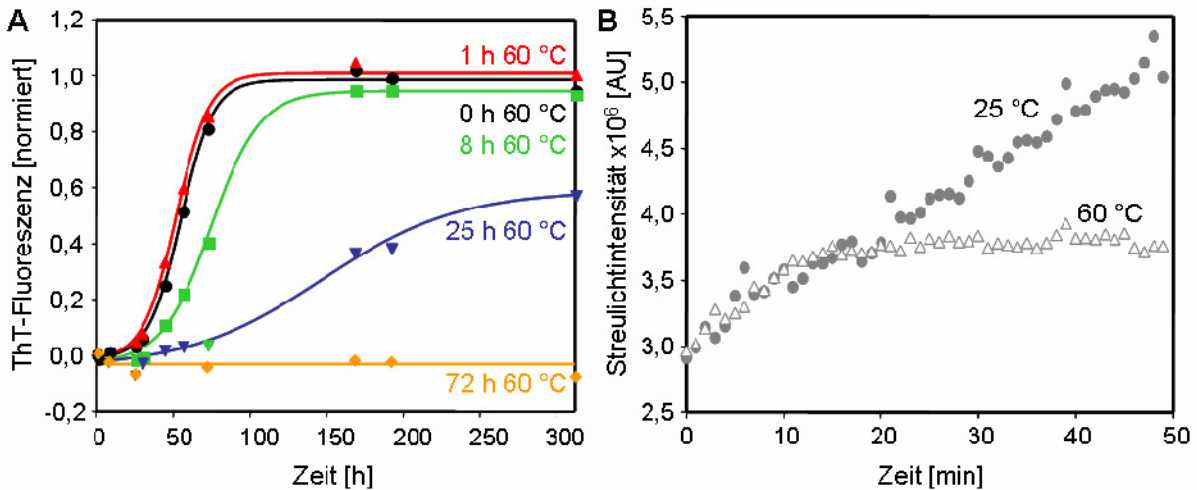


Abbildung 3-7 Einfluss der Temperatur auf die Assemblierung von NM. (A) Einfluss auf die Fibrillenbildung. Jeweils $5 \mu\text{M}$ NM^{wt} in NEM-Puffer wurde in Abwesenheit von *Seeds* bei RT bzw. zuerst 1, 8, 25 oder 72 h bei $60 \text{ }^\circ\text{C}$ und danach bei RT inkubiert und die Fibrillenbildung mittels ThT-Fluoreszenz bei 482 nm (Anregungswellenlänge: 450 nm) beobachtet ($1,25 \mu\text{M}$ Protein und $187,5 \mu\text{M}$ ThT Endkonzentration). (B) Einfluss auf die Oligomerisierung. Die Lichtstreuung bei 500 nm (Anregungswellenlänge: 500 nm) von jeweils $5 \mu\text{M}$ NM^{wt} in NEM-Puffer wurde unmittelbar nach Rückfaltung bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ bzw. $60 \text{ }^\circ\text{C}$ vermessen.

Die nachträgliche Quantifizierung von SDS-löslichem und -stabilem NM mittels SDS-PAGE zeigt, dass, wie bereits durch das verringerte ThT-Signal zu erkennen ist, aufgrund der 25-stündigen Inkubation bei $60 \text{ }^\circ\text{C}$ danach weniger Fibrillen gebildet werden. Der Anteil an SDS-löslichem NM ist in dieser Probe viel höher als in den Proben, die nur für 0, 1 oder 8 h bei $60 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert wurden. Interessanterweise kann mittels SDS-PAGE in der Probe, die für 72 h bei $60 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert wurde, kaum Protein, weder SDS-lösliches noch -stabiles, auf dem Gel detektiert werden. Vermutlich wurde das meiste Protein durch unspezifische Interaktionen mit der Wand des Reaktionsgefäßes der Analyse entzogen.

Um zu untersuchen, ob NM bei $60 \text{ }^\circ\text{C}$ in monomerer oder oligomerer Form vorliegt, wurden Lichtstreuungsmessungen von frisch renaturiertem NM bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ bzw. $60 \text{ }^\circ\text{C}$ bei 500 nm durchgeführt. Während die Streulichtintensität durch Oligomerbildung von NM bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ kontinuierlich zunimmt, erreicht sie bei $60 \text{ }^\circ\text{C}$ nach ca. 15 min einen konstanten Wert (Abbildung 3-7B). Bei $60 \text{ }^\circ\text{C}$ scheint NM nicht als Monomer sondern in einer homogenen oligomeren Form vorzuliegen.

Analyse der Sekundärstruktur der Fibrillen

Frisch renaturiertes lösliches NM zeigt ein für unstrukturierte Proteine charakteristisches Fern-UV Circular dichroismus (CD)-Spektrum mit einem Minimum bei ca. 200 nm (Abbildung 3-8A). Nach Fibrillenbildung ist ein für β -Faltblätter typisches CD-Spektrum mit einem Minimum bei 218 nm zu erkennen. Mittels fourier-transformierter Infrarot (FTIR) Spektroskopie wurde die Sekundärstruktur der Fibrillen genauer analysiert. Da für FTIR-Spektroskopie in Lösung sehr hohe Proteinkonzentrationen benötigt werden, die mit NM nicht eingestellt werden können, wurden die NM-Fibrillen auf Kalziumfluorid-Plättchen aufgetragen, gewaschen, getrocknet und mit Hilfe eines IR-Mikroskops, das an ein IR-Spektrometer gekoppelt war, untersucht. Das erhaltene FTIR-Spektrum der Amid I Bande (1600-1700 cm^{-1}) zeigt zwei Maxima, die β -Faltblatt- (1612-1640 cm^{-1}) und β -Turn- (1660-1700 cm^{-1}) reichen Strukturen zuzuschreiben sind (Abbildung 3-8B). Durch Dekonvolution des Spektrums wurden die Sekundärstrukturanteile bestimmt: 32 % β -Turn, 46 % β -Faltblatt und 22 % unstrukturierte Regionen. Die Maxima der dabei erhaltenen Gaußschen Verteilungskurven befinden sich im β -Faltblattbereich bei Wellenzahlen kleiner als 1630 cm^{-1} , was charakteristisch für amyloide Fibrillen ist (Zandomenighi *et al.*, 2004).

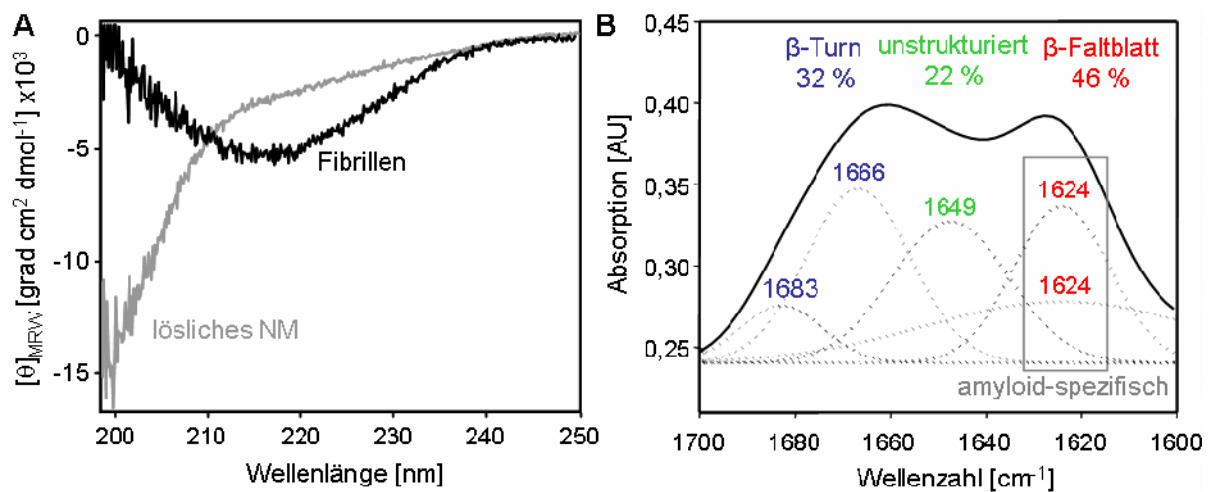


Abbildung 3-8 Sekundärstrukturanalyse von NM-Fibrillen. (A) Fern-UV CD-Spektren von frisch renaturiertem NM^{wt} und nach geseedeter Fibrillenbildung (jeweils 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in CRBB). (B) FTIR-Spektrum (Amid I Bande, durchgezogene Linie) von geseedeten NM-Fibrillen (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in CRBB). Sekundärstrukturanteile (β -Turn blau, unstrukturiert grün, β -Faltblatt rot) wurden durch Dekonvolution mit Gaußscher Verteilung (gepunktete Linien) bestimmt.

Analyse der Fibrillenmorphologie

Die Morphologie der NM-Fibrillen wurde mittels AFM näher bestimmt. Die zu analysierenden Proben wurden auf Glimmerplättchen aufgetragen, gewaschen, und im getrockneten Zustand bezüglich Ausmaße und Oberflächenstruktur untersucht. Die Länge der Fibrillen hängt von der Art der Fibrillenbildung ab: je mehr Aggregationskeime vorhanden sind, desto kürzer sind die assemblierten Fibrillen. In geseedeten Reaktionen ist die Länge der Fibrillen demnach abhängig von der Konzentration der eingesetzten *Seeds*. In ungeseedeten Reaktionen können Fibrillen mit einer Länge von bis zu 20 μm detektiert werden, während in Reaktionen induziert durch Rotation nur sehr kurze Fibrillen mit einer durchschnittlichen Länge von 500 nm entstehen. Die Höhe der Fibrillen in getrocknetem Zustand beträgt 3-8 nm. Ähnlich wie bei den PAPBN1 N-WT-Fibrillen (s. Abbildung 3-3) werden bei NM-Fibrillen definierte Untereinheiten von ca. 31 nm Größe beobachtet (Abbildung 3-9). Allerdings ist dies offensichtlich stark von den Präparationsbedingungen abhängig, da diese Feinstruktur nicht reproduzierbar wie bei PAPBN1 N-WT detektiert werden kann. Stattdessen sind in den meisten Fällen nur NM-Fibrillen mit eher glatter Oberfläche zu erkennen (Abbildung 3-10A).

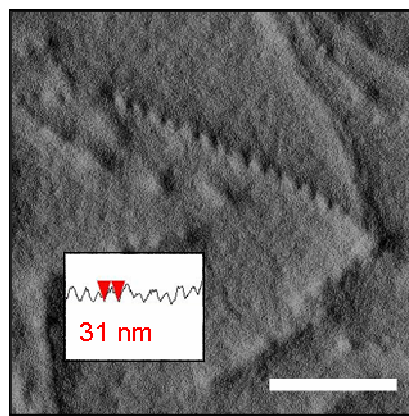


Abbildung 3-9 Untersuchung von NM-Fibrillen mittels AFM. AFM-Aufnahme (*Tapping Mode, Amplitude*) von Fibrillen assembliert aus 150 $\mu\text{g/ml}$ NM^{wt} in Anwesenheit von 5 % (w/w) *Seeds* (Maßstab: 200 nm). Einschub: Längsschnitt durch die Fibrille (*Nanoscope Section Analysis*).

Die carboxyterminale Domäne C von Sup35p ist nicht an der Fibrillenbildung beteiligt. Auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigt sich dieser Bereich als eigene Einheit an der Fibrillenaußenseite (Glover *et al.*, 1997). Zur genaueren Analyse der Morphologie sollten Fibrillen von NM und Sup35p-Volllängenprotein (NMC) rasterkraftmikroskopisch untersucht werden. Bei NMC-Fibrillen kann mittels AFM keine ausgeprägte Oberflächenstruktur detektiert werden (Abbildung 3-10). Sie erscheinen relativ glatt, sind jedoch mit durchschnittlich 5 nm höher als unter gleichen Bedingungen assemblierte und präparierte NM-Fibrillen mit durchschnittlich 3,8 nm Höhe. Darüber hinaus bilden NMC-Fibrillen im Gegensatz zu NM bevorzugt Superstrukturen aus, in denen sie in aneinander gelagerter oder umwundener Form vorliegen.

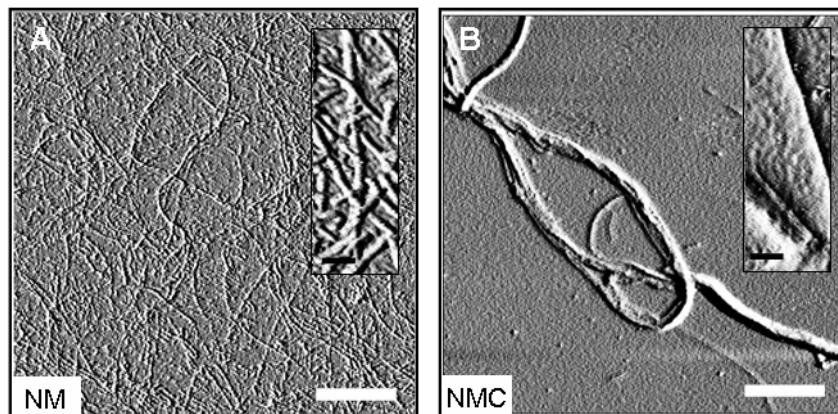


Abbildung 3-10 Vergleich von NM- und NMC-Fibrillen mittels AFM. AFM-Aufnahmen (*Tapping Mode, Amplitude*) von (A) NM- und (B) Sup35p-Volllängen (NMC)-Fibrillen assembliert aus jeweils 10 µM Protein (285 µg/ml NM bzw. 750 µg/ml NMC) in 20 mM Tris/HCl pH 8, 200 mM NaCl, 5 % Glycerol, 5 mM β-Mercaptoethanol, 10 mM MgCl₂. Maßstab: 1 µm, Einschub 100 nm (Die Proben wurden von Ronald Melki, CNRS Gif-sur-Yvette, Frankreich zur Verfügung gestellt).

Diese Superstrukturen können auch mittels TEM detektiert werden (Abbildung 3-11). Die Breite der elektronenmikroskopisch untersuchten NMC-Fibrillen beträgt ca. 25 nm, die der NM-Fibrillen ca. 13 nm. Allerdings kann keine ausgeprägte, vom carboxyterminalen Bereich stammende, Struktur an der Außenseite der Fibrillen, analog zu der von Glover *et al.* (1997) beschriebenen, beobachtet werden.

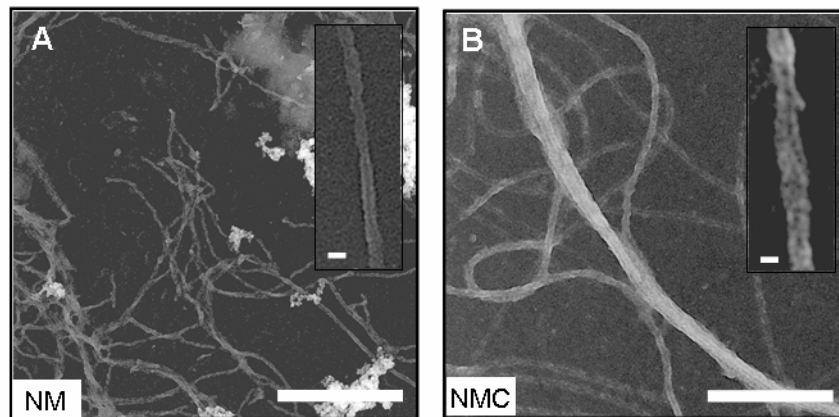


Abbildung 3-11 Vergleich von NM- und NMC-Fibrillen mittels TEM. TEM-Aufnahmen (Negativkontrastierung) von (A) NM- und (B) Sup35p-Vollängen (NMC)-Fibrillen assembliert aus jeweils 10 μM Protein (300 $\mu\text{g/ml}$ NM bzw. 750 $\mu\text{g/ml}$ NMC) in 20 mM Tris/HCl pH 8, 200 mM NaCl, 5 % Glycerol, 5 mM β -Mercaptoethanol, 10 mM MgCl_2 . Maßstab: 500 nm, Einschub 25 nm (Die Proben wurden von Ronald Melki, CNRS Gif-sur-Yvette, Frankreich zur Verfügung gestellt).

Struktureller Vergleich von amyloiden Sup35p-NM-Fibrillen mit Nanofibrillen synthetischer Spinnenseide

Die Seide, die Spinnen als Rahmen ihrer Netze und als Abseilfaden verwenden, ist ein faszinierendes, aus Proteinen aufgebautes Material, das eine Kombination aus Zugfestigkeit und Elastizität aufweist, die von keinem industriell gefertigtem Material erreicht wird. Die strukturellen Eigenschaften der Spinnenseidenproteine sind daher von großem Interesse. In der Spinndrüse der Radnetzspinne *Nephila edulis* wurden fibrilläre Proteine mit amyloid-ähnlichen Eigenschaften gefunden (Kenney *et al.*, 2002). Die Ausbildung von Nanofibrillen wurde auch für das rekombinant hergestellte Spinnenseidenprotein eADF-4(C16) beschrieben, welches auf einer Sequenz eines im Abseilfaden der Gartenkreuzspinne *Araneus diadematus* enthaltenen Proteins basiert (Huemmerich *et al.*, 2004; Rammensee *et al.*, 2006). Wie NM bildet eADF-4(C16) spontan Fibrillen, die sich rasterkraftmikroskopisch kaum von den NM-Fibrillen unterscheiden (Abbildung 3-12). Um zu klären, ob es sich bei den Spinnenseidenfibrillen um amyloide Strukturen handelt, wurden diese bezüglich amyloider Eigenschaften untersucht und mit NM-Fibrillen verglichen.

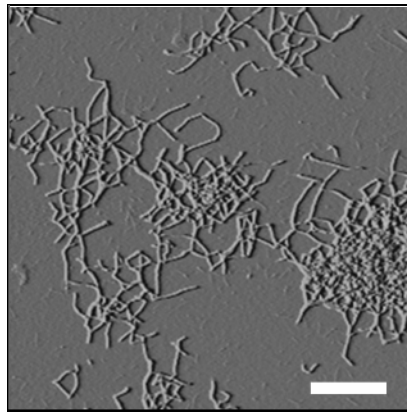


Abbildung 3-12 Fibrillen des Spinnenseidenproteins eADF-4(C16). AFM-Aufnahme (*Contact Mode, Deflection*) von eADF-4(C16)-Fibrillen assembliert aus 10 mg/ml Protein in 10 mM KH_2PO_4 pH 8 bei RT. Maßstab: 1 μm (aus Slotta *et al.*, 2007).

eADF-4(C16)-Fibrillen können ebenso wie NM-Fibrillen durch Bindung der Farbstoffe CR und ThT detektiert werden. Die Bindung von CR führt zu der für amyloide Proteine charakteristischen Rotverschiebung des Absorptionsmaximums und einer verstärkten Absorption bei 541 nm, während die Fluoreszenzintensität von ThT bei 482 nm erhöht wird (Slotta *et al.*, 2007).

Auch die mittels CD-Spektroskopie untersuchte Sekundärstruktur von eADF-4(C16) unterscheidet sich nicht von der von NM. Lösliches eADF-4(C16) weist wie NM (s. Abbildung 3-8) ein CD-Spektrum auf, das charakteristisch für unstrukturierte Proteine ist (Abbildung 3-13A). Nach Fibrillenbildung zeigt auch eADF-4(C16) β -Faltblatt-reiche Struktur. Dies konnte mittels FTIR-Spektroskopie bestätigt werden (Abbildung 3-13B). Fibrillen beider Proteine zeigen Spektren, die von β -Faltblatt-Strukturen dominiert werden, mit den für Amyloide charakteristischen Maxima bei 1623 cm^{-1} für eADF-4(C16) und 1624 cm^{-1} für NM. Der Anteil an β -Turn ($1660\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$) und unstrukturierten Regionen ($1640\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$) ist bei beiden Proteinen gleich, wobei bei eADF-4(C16) das nach Dekonvolution erhaltene Maximum bei 1645 cm^{-1} auch von 3_1 -helikal strukturierten Regionen stammen könnte (Arrondo & Goni, 1999). 3_1 -Helix- und β -Turn-reiche Konformationen wurden für die für Spinnenseiden typischen Glycin-reichen Regionen beschrieben (Gosline *et al.*, 1999), die auch in eADF-4(C16) vorkommen.

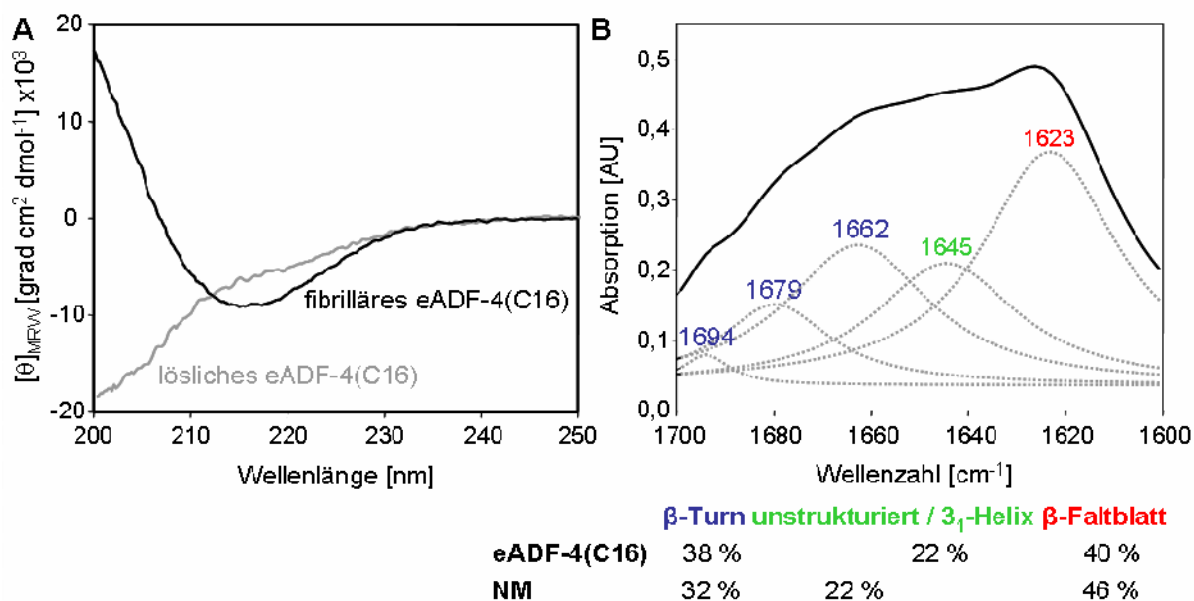


Abbildung 3-13 Sekundärstrukturanalyse von eADF-4(C16)-Fibrillen. (A) Fern-UV CD-Spektren von frisch gelöstem und fibrillärem eADF-4(C16) (jeweils 200 $\mu\text{g/ml}$ in 10 mM KH_2PO_4 pH 8). (B) FTIR-Spektrum (Amid I Bande, durchgezogene Linie) von eADF-4(C16)-Fibrillen. Sekundärstrukturanteile (β -Turn blau, unstrukturiert / 3_1 -Helix grün, β -Faltblatt rot) wurden durch Dekonvolution mit Gaußscher Verteilung (gepunktete Linien) bestimmt. Zum Vergleich sind die Sekundärstrukturanteile der NM-Fibrillen aufgeführt (nach Slotta *et al.*, 2007).

Die Fibrillen wurden darüber hinaus mittels Röntgenbeugungsanalyse charakterisiert. Partiiell ausgerichtete NM-Fibrillen liefern dabei ein amyloid-spezifisches Beugungsmuster mit einem diffusen äquatorialen Signal bei 9,4 Å und einer starken meridionalen Reflexion bei 4,8 Å (Abbildung 3-14A), ähnlich dem von Fibrillen des Alzheimer Peptids A β (Serpell, 2000). Der Wert 9,4 Å bezieht sich hierbei auf den Abstand zwischen den parallel zur Fibrillenachse verlaufenden β -Faltblättern. Die Reflexion bei 4,8 Å ist die Distanz zwischen den senkrecht zur Fibrillenachse angeordneten β -Faltblattsträngen. Dieses Signal kann auch für partiell ausgerichtete eADF-4(C16)-Fibrillen detektiert werden. Die diffuse äquatoriale Reflexion befindet sich hier jedoch nicht bei 9,4 Å, sondern bei 5,3 Å, was auf den hohen Anteil an der kurzkettigen Aminosäure Alanin zurückgeführt werden könnte. eADF-4(C16) enthält, neben den Glycin-reichen Bereichen, 16 Polyalaninregionen mit jeweils acht Alaninen.

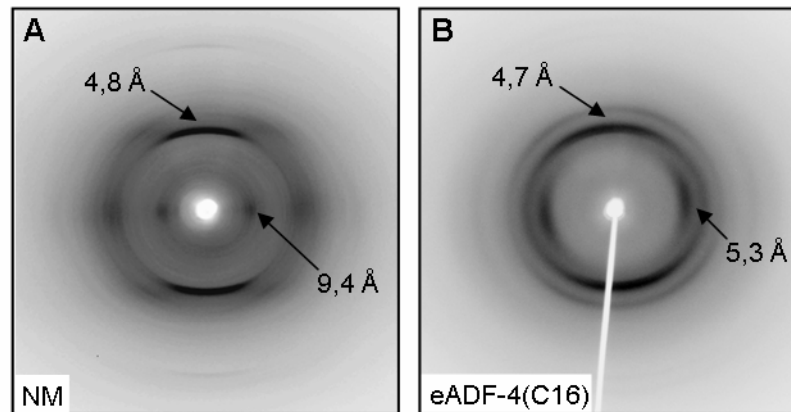


Abbildung 3-14 Röntgenbeugungsanalyse von NM- und eADF-4(C16)-Fibrillen. Röntgenbeugungsmuster von partiell ausgerichteten NM^{wt}- (A) und eADF-4(C16)-Fibrillen (B) mit den für geordnete β -Faltblatt-Strukturen charakteristischen Reflexionen.

Den Fibrillen des Spinnenseidenproteins eADF-4(C16) konnten somit durch Strukturanalysen und Farbstoffbindung amyloide Eigenschaften nachgewiesen werden, die sich allerdings zum Teil, vermutlich aufgrund unterschiedlicher Aminosäurezusammensetzung, von denen der NM-Fibrillen unterscheiden.

3.2.3 Sup35p-NM-Filamente

Entdeckung

Die Tatsache, dass in Anwesenheit von *Seeds* mehr Fibrillen gebildet werden als in ungeseedeten Reaktionen (s. 3.2.2), ist auch auf rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen zu erkennen (Abbildung 3-15A, B). Die Aufnahmen von ungeseedeten Ansätzen zeigen darüber hinaus eine deutliche Proteinschicht im Hintergrund der Fibrillen (Abbildung 3-15B). Nach Verdünnung der Proben (Abbildung 3-15C) ist zu erkennen, dass auch diese Schicht aus Proteinfasern besteht, welche sich jedoch morphologisch von den amyloiden NM-Fibrillen unterscheiden: die Höhe dieser Fasern beträgt nur ca. 0,8-1,3 nm. Diese dünnen NM-Fasern werden im Folgenden als „Filamente“ bezeichnet.

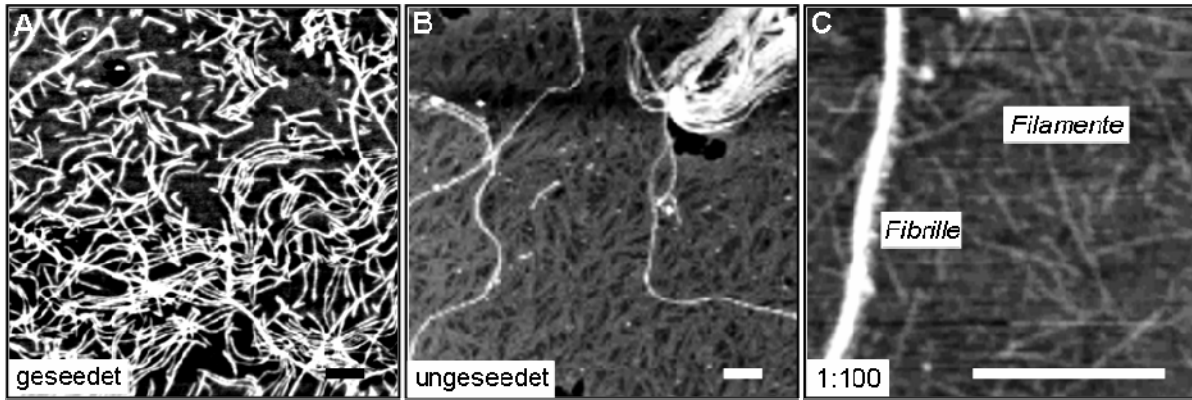


Abbildung 3-15 Entdeckung der NM-Filamente mittels AFM. AFM-Aufnahmen (*Tapping Mode*, Höhe) von NM^{wt} (150 µg/ml) assembliert in CRBB in Anwesenheit von 5 % (w/w) *Seeds* (A) oder in Abwesenheit von *Seeds* (B). (C) 100-fache Verdünnung von (B). Maßstab: 500 nm.

Durch einen Zentrifugationsschritt (130.000 x g, 30 min, 20 °C) können die Filamente von den amyloiden Fibrillen getrennt werden. Während die Fibrillen sedimentieren, befinden sich die Filamente (und lösliches NM) im Überstand. Die weitere Separation von filamentärem und löslichem NM durch chromatographische Methoden oder durch Filtration mit Hilfe einer Membran mit einer Ausschlussgröße von 100 kDa ist aufgrund unspezifischer Interaktionen von NM mit Chromatographie-Matrices und Membranen nicht möglich. Allerdings kann lösliches NM von Filamenten mittels Ultrazentrifugation in einem kontinuierlichen Saccharosegradienten (20-60 % Saccharose) getrennt werden. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels Immunoblot und AFM analysiert (Abbildung 3-16). Durch Immunoblot kann NM in den ersten sechs Fraktionen (20-38 % Saccharose) detektiert werden (Abbildung 3-16A). Die ersten vier Fraktionen (20-32 % Saccharose) enthalten ausschließlich lösliches NM (Abbildung 3-16B), während in den Fraktionen fünf und sechs (32-38 % Saccharose) Filamente nachgewiesen werden (Abbildung 3-16C). Interessanterweise sind bei Fraktionen mit löslichem NM Protein Abbaubanden zu erkennen, nicht aber bei den Fraktionen, die die Filamente enthalten (Abbildung 3-16A). Das Fehlen der Abbaubanden ist auch charakteristisch für Proben, die ausschließlich Fibrillen enthalten.

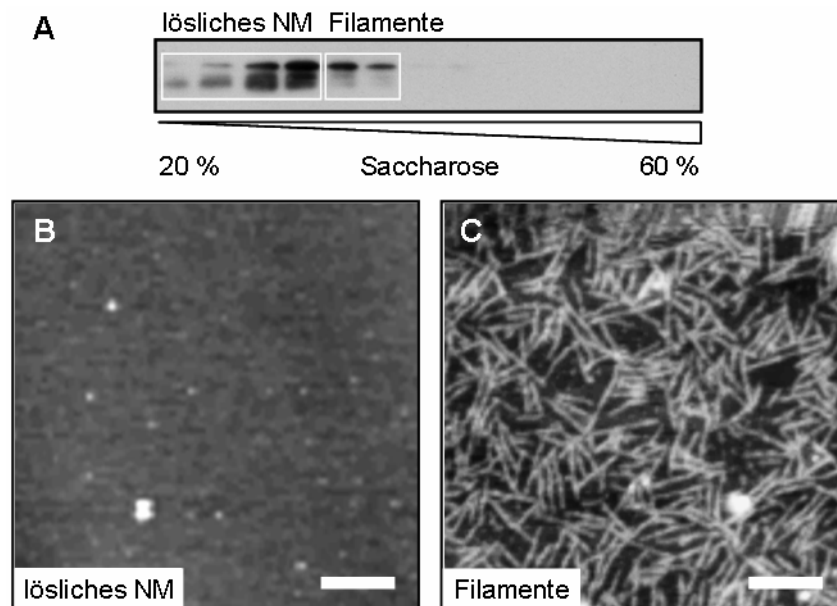


Abbildung 3-16 Separation von löslichem NM und Filamenten. (A) Immunoblot-Analyse der Fraktionen nach Ultrazentrifugation des löslichen nicht-fibrillären Anteils von NM^{wt} nach ungesedeter Fibrillenbildung in einem kontinuierlichen Saccharosegradienten (20-60 % Saccharose). Der Nachweis erfolgte mit einem α -Sup35p-NM-Antikörper. (B, C) AFM-Aufnahmen (*Tapping Mode*, Höhe) der 2. (B) und 5. Fraktion (C). Maßstab: 250 nm.

Da mittels Saccharosegradienten nur eine qualitative Separation von löslichem NM und Filamenten möglich ist, wurden die folgenden Analysen mit der gesamten löslichen Fraktion durchgeführt. Um die Anwesenheit amyloider Fibrillen ausschließen zu können, wurde der nach Zentrifugation erhaltene Überstand einem zusätzlichen Filtrationsschritt unterzogen.

Untersuchungen des Überstands mit den amyloid-spezifischen Farbstoffen Kongo Rot (CR) und ThT sollten Aufschluss darüber geben, ob es sich bei den Filamenten um amyloide Strukturen handelt. Die Filamente zeigen jedoch weder mit CR noch mit ThT eine Wechselwirkung.

Analyse der Sekundärstruktur der Filamente

Neben den nicht detektierbaren Wechselwirkungen mit amyloid-spezifischen Farbstoffen zeigen auch Sekundärstrukturuntersuchungen mittels CD-Spektroskopie, dass es sich bei Filamenten um nicht-amyloide Strukturen handelt. Das Fern-UV CD-Spektrum der die Filamente enthaltenden löslichen Fraktion unterscheidet sich stark von dem der Fibrillen (Abbildung 3-17A). Ähnlich dem von frisch gelöstem NM, zeigt es unstrukturierte Anteile, besitzt jedoch einen zusätzlichen β -Faltblatt-Anteil. Während sich die Sekundärstruktur von frisch gelöstem bzw. fibrillärem NM bei höheren Temperaturen nicht ändert, verliert die Filamentprobe nach einer Inkubation bei 98 °C den β -Faltblatt-Anteil und zeigt nach

Abkühlen ein CD-Spektrum, das sich nicht von dem von frisch gelöstem NM unterscheidet. Nach der Hitzebehandlung können auch mikroskopisch im AFM keine Filamente mehr detektiert werden.

Mittels FTIR-Spektroskopie wurde die Sekundärstruktur der Filamente genauer bestimmt. Das FTIR-Spektrum der Filamentprobe (Abbildung 3-17B) unterscheidet sich signifikant von dem der Fibrillen (Abbildung 3-8B). Das Maximum des Spektrums befindet sich im Bereich von 1640-1660 cm^{-1} , was auf einen erhöhten Anteil an unstrukturierten Regionen hinweist. Die durch Dekonvolution berechneten Sekundärstrukturanteile betragen 7 % β -Turn, 49 % β -Faltblatt und 44 % unstrukturierte Regionen. Sie unterscheiden sich somit, neben dem veränderten Anteil an unstrukturierten Regionen, vor allem im geringeren β -Turn-Anteil von Fibrillen. Das Maximum der Gaußschen Verteilungskurve befindet sich im β -Faltblattbereich bei einer Wellenzahl größer 1630 cm^{-1} , was charakteristisch für nicht-amyloide β -Faltblatt-Strukturen ist (Zandomenighi *et al.*, 2004). Frisch gelöstes NM zeigt, im Gegensatz zu Fibrillen und Filamenten, einen hohen Anteil an unstrukturierten Regionen, 20 % β -Turn und nur 9 % β -Faltblatt-Strukturen (Abbildung 3-17B).

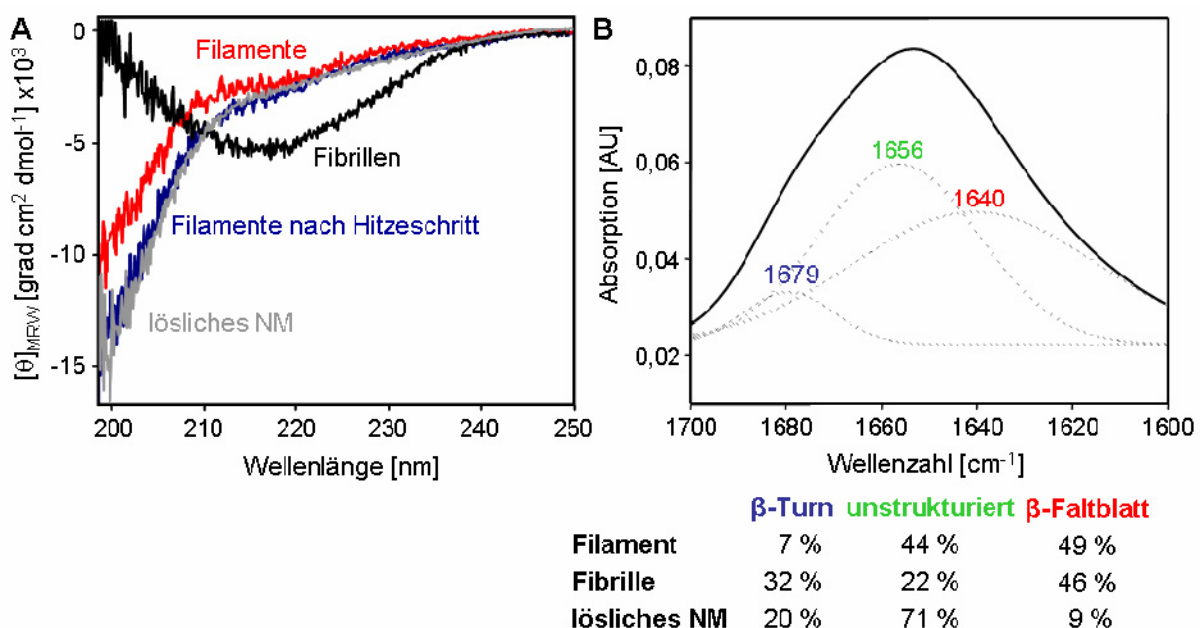


Abbildung 3-17 Sekundärstrukturanalyse von NM-Filamenten. (A) Fern-UV CD-Spektren von frisch renaturiertem löslichem NM^{wt}, Fibrillen und Filamenten vor und nach Inkubation bei 98 °C (jeweils 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in CRBB). (B) FTIR-Spektrum (Amid I Bande, durchgezogene Linie) von NM-Filamenten. Sekundärstrukturanteile (β -Turn blau, unstrukturiert grün, β -Faltblatt rot) wurden durch Dekonvolution mit Gaußscher Verteilung (gepunktete Linien) bestimmt. Zum Vergleich sind die Sekundärstrukturanteile der Fibrillen und von frisch gelöstem NM aufgeführt.

Stabilität der Filamente

Amyloide NM-Fibrillen zeichnen sich durch eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Verdau durch Proteasen aus (Serio *et al.*, 2000). Für die Analyse der Proteasestabilität der Filamente wurden Fibrillen- und Filamentproben und frisch gelöstes NM mit der Protease Chymotrypsin (CHY) für bis zu 10 min bei 37 °C verdaut, die Proteolyse durch Erhitzen auf 95 °C in 1x Laemmli-Puffer gestoppt und die Proben mittels SDS-PAGE analysiert. Während bei den Fibrillen selbst nach 10-minütigem Verdau noch Protein auf dem Gel detektiert werden kann, sind Filamente und lösliches NM schon nach zwei Minuten vollständig degradiert (Abbildung 3-18 links).

Eine weitere Eigenschaft von NM-Fibrillen ist ihre Resistenz gegenüber Denaturierung mit SDS (Serio *et al.*, 2000). Während Fibrillen in 2 % SDS erst durch 10-minütige Inkubation bei 95 °C denaturiert und somit mittels SDS-PAGE detektiert werden können, sind Filamente und frisch gelöstes NM auch ohne Hitzebehandlung in SDS löslich und auf dem Gel zu erkennen (Abbildung 3-18 rechts).

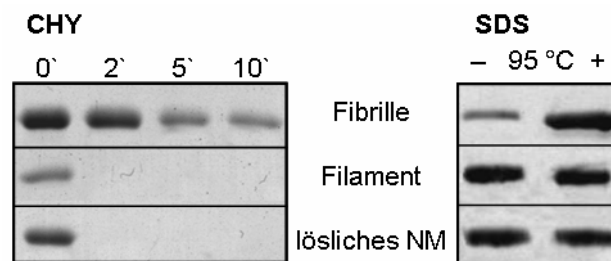


Abbildung 3-18 Stabilität von NM-Filamenten. Stabilität von Filamenten im Vergleich zu Fibrillen und löslichem NM analysiert mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung. Links: Verdau mit Chymotrypsin (1/50 w/w) bei 37 °C für 0-10 min. Rechts: SDS-lösliches Protein vor und nach Inkubation für 10 min bei 95 °C in 1x Laemmli-Puffer.

Assemblierungseigenschaften der Filamente

Die Assemblierung von NM-Filamenten ist im Vergleich zur Fibrillenbildung ein relativ schneller Prozess. In frisch renaturiertem NM können nach 12-stündiger Zentrifugation in einem Saccharosegradienten bereits Filamente, jedoch keine Fibrillen detektiert werden. Um zu untersuchen, ob dieser Prozess durch Keimbildung induziert wird, wurden frisch renaturiertem NM vorgeformte Filamente als *Seeds* zugesetzt, für 1-5 Tage bei RT inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten rasterkraftmikroskopisch untersucht. Die Menge und Morphologie der detektierten Filamente unterscheidet sich nicht von der im Ausgangsansatz. Die Assemblierung von Filamenten ist wahrscheinlich ein keimbildungsunabhängiger Prozess, da er im Vergleich zur Fibrillenbildung relativ schnell stattfindet und nicht durch die Zugabe von filamentären *Seeds* beschleunigt werden kann.

Da NM-Filamente sich in ihrer Morphologie, Sekundärstruktur und Stabilität von amyloiden Fibrillen unterscheiden, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Filamenten um nicht-amyloide Strukturen handelt. Ihr Durchmesser ist mit 0,8-1,3 nm jedoch dem von Protofibrillen ähnlich. Um zu bestimmen, ob es sich bei den NM-Filamenten um *on-pathway* Intermediate mit protofibrillären Eigenschaften handelt, wurden Filamentproben über mehrere Wochen inkubiert und die Bildung amyloider Fibrillen mittels CR-Bindung (Abbildung 3-19 Amyloidbildung), CD-Spektroskopie und AFM beobachtet. Mit keiner dieser Methoden können amyloide Fibrillen detektiert werden, was bedeutet, dass Filamente entweder nicht *on-pathway* sind oder kinetisch stabile Intermediate darstellen. Durch die Zugabe von fibrillären *Seeds* zu Filamenten kann die Fibrillenbildung zwar induziert werden (Abbildung 3-19 Amyloidbildung), die Menge an gebildeten Fibrillen unterscheidet sich jedoch stark von der unter gleichen Bedingungen durch *Seeding* von frisch gelöstem NM assemblierten Fibrillen. Nur etwa 20 % der in Anwesenheit von *Seeds* inkubierten Filamentprobe werden zu Fibrillen umgewandelt. Wahrscheinlich liegt das konvertierte Protein zu Beginn der Reaktion nicht filamentär sondern löslich oder in einer anderen konvertierbaren Form vor, da sich die Menge an gebildeten Fibrillen auch über mehrere Tage hinweg nicht ändert, d. h. vorhandene Filamente nicht in fibrillierende Strukturen dissoziieren.

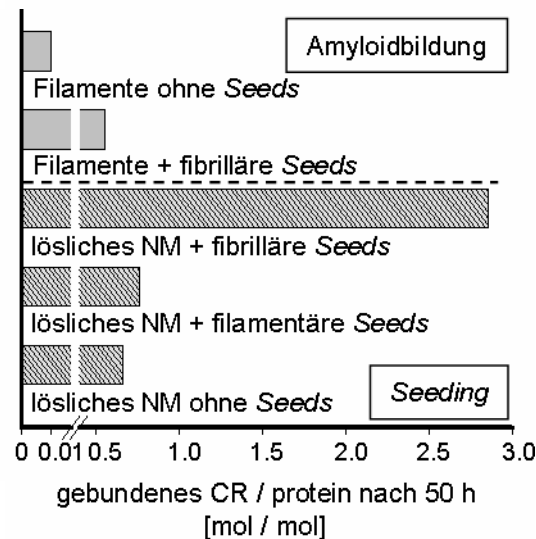


Abbildung 3-19 Amyloidbildungs- und Seeding-Fähigkeit von Filamenten. Menge an gebildeten amyloiden Fibrillen nach 50 h detektiert mittels CR-Bindung. Oben: Amyloidbildungsfähigkeit von Filamenten zu amyloiden Fibrillen. Filamente (150 µg/ml) wurden in An- bzw. Abwesenheit von fibrillären *Seeds* (4 % w/w) inkubiert. Unten: *Seeding*-Fähigkeit von Filamenten. Lösliches NM^{wt} (150 µg/ml) wurde in Anwesenheit von fibrillären oder filamentären *Seeds* oder in Abwesenheit von *Seeds* inkubiert (um mögliche Einflüsse durch Scherkräfte beim Pipettieren auszuschließen, wurde hier 4 % w/w lösliches NM^{wt} zugefügt).

Zur Bestimmung der Fähigkeit der Filamente als *Seed* zu agieren, wurde lösliches NM in Anwesenheit von filamentären oder fibrillären *Seeds* inkubiert und die Fibrillenbildung mittels CR-Bindung beobachtet (Abbildung 3-19 *Seeding*). Während durch Zugabe von vorgeformten fibrillären *Seeds* die Fibrillenbildung stark induziert wird, kann in Anwesenheit von filamentären *Seeds* nur eine vergleichbare Menge an neu gebildeten Fibrillen detektiert werden wie in ungeseedeten Reaktionen.

Da für die Filamente weder eine direkte Umwandlung zu amyloiden Fibrillen noch eine *Seeding*-Fähigkeit beobachtet werden kann, ist anzunehmen, dass es sich nicht um Protofibrillen handelt, sondern um eine kinetisch stabile *off-pathway* Form von NM, die unter den gewählten Bedingungen nicht direkt zu Fibrillen assembliert.

Ein weiterer Hinweis dafür, dass es sich bei den Filamenten um *off-pathway* Oligomere handelt, ist die Tatsache, dass sich Filamente auch unter Bedingungen bilden, unter denen die Fibrillenbildung inhibiert ist. In ungeseedeten Reaktionen mit vorheriger 72-stündiger Inkubation bei 60 °C (s. Abbildung 3-7) oder in Anwesenheit von Osmolyten (25 % Glycerin oder 20 % Polyethylenglykol 400) können mittels ThT-Fluoreszenz und AFM keine Fibrillen detektiert werden, auf AFM-Aufnahmen sind jedoch Filamente zu erkennen.

Neben den experimentellen Bedingungen hängt die Fibrillenbildung von NM auch von intrinsischen Faktoren, z. B. den aminoterminalen Oligopeptidwiederholungen ab

(Scheibel & Lindquist, 2001). Die Mutante $NM^{\Delta R2-5}$, der vier Peptidwiederholungen fehlen, bildet selbst nach sechs Wochen keine Fibrillen (Scheibel & Lindquist, 2001; Abbildung 3-20A). Die Verlängerung der Oligopeptidregion um zwei zusätzliche Kopien des zweiten Oligopeptids (NM^{R2E2}) führt zu einer Beschleunigung der Fibrillenbildung. Während bei NM^{wt} die Fibrillenbildung nach einer Lag-Phase von ca. 20 h beginnt, ist diese bei NM^{R2E2} auf ca. 10 h verkürzt. Die Menge der nach 50 h von NM^{R2E2} gebildeten Fibrillen beträgt etwa das Dreifache von der von NM^{wt} . Interessanterweise können mittels AFM in NM^{R2E2} -Proben nur Fibrillen (Abbildung 3-20B) und keine Filamente detektiert werden. Bei Proben der Deletionsmutante $NM^{\Delta R2-5}$ sind rasterkraftmikroskopisch keine Fibrillen dafür aber Filamente zu erkennen (Abbildung 3-20C). Durch die Rotation von $NM^{\Delta R2-5}$ -Proben kann die Fibrillenbildung induziert werden. Allerdings verläuft die Assemblierung viel langsamer als bei NM^{wt} und NM^{R2E2} und nicht quantitativ. Während bei $NM^{\Delta R2-5}$ auch Filamente detektiert werden können, liegen NM^{wt} und NM^{R2E2} nach Rotation nur in fibrillärer Form vor.

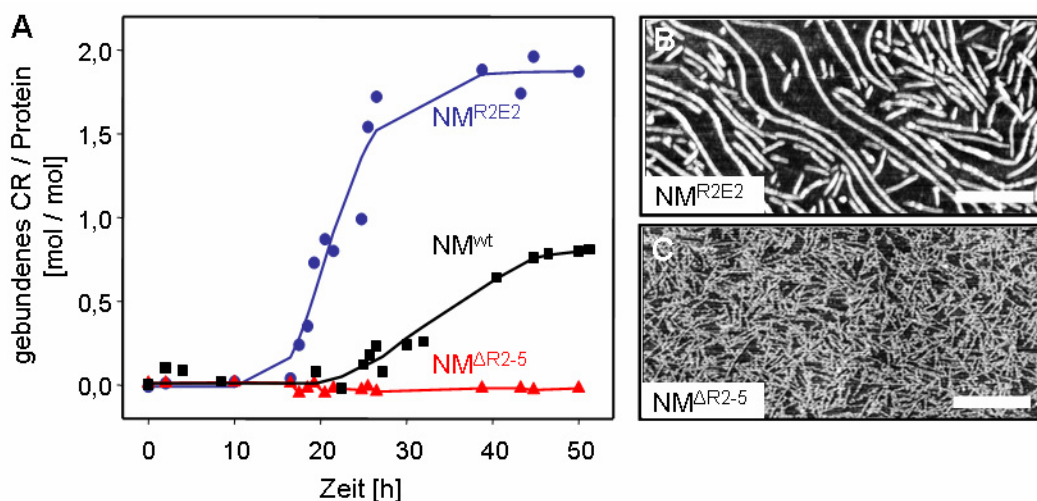


Abbildung 3-20 Einfluss der Oligopeptidwiederholungen auf die Filamentassemblierung. (A) Ungeseedete Fibrillenbildung von NM^{wt} , NM^{R2E2} , $NM^{\Delta R2-5}$ (jeweils 150 $\mu\text{g/ml}$ in CRBB) detektiert mittels CR-Bindung. Nach Abschluss der Fibrillenbildung wurden die Proben mittels AFM (*Tapping Mode*, Höhe) untersucht: (B) $NM^{\Delta R2-5}$, (C) NM^{R2E2} . Maßstab: 500 nm.

Da in geseedeten (und somit stark beschleunigten) Reaktionen ebenfalls keine Filamente detektiert werden können, kann geschlossen werden, dass es sich bei den NM-Filamenten um eine alternative nicht-amyloide Assemblierungsform handelt, die vor allem unter Bedingungen gebildet wird, unter denen die Fibrillenbildung verlangsamt (ungeseedete Reaktionen, Oligopeptiddeletion) oder inhibiert (Temperatur, Osmolyte) ist.

3.2.4 Einfluss zweiwertiger Metallionen

Der Einfluss zweiwertiger Metallionen (M^{2+}) auf die Assemblierung amyloider Proteine ist schon seit einiger Zeit Gegenstand intensiver Forschung. So konnte z. B. für die krankheitsassoziierten Proteine und Peptide PrP, Amyloid β oder α -Synuclein eine Änderung des Aggregationsverhaltens in Anwesenheit zweiwertiger Metallionen, v. a. Cu^{2+} , beobachtet werden (Gaeta & Hider, 2005). Die Ergebnisse der einzelnen Forschergruppen unterscheiden sich allerdings stark. Vor allem die Rolle, die M^{2+} bei der Ausbildung amyloider Krankheiten spielen, wird äußerst kontrovers diskutiert, wobei sowohl positive als auch negative Effekte beschrieben wurden (Cerpa *et al.*, 2005).

Um mehr über den Effekt von M^{2+} auf amyloide Proteine zu erfahren, sollte NM, als gut charakterisiertes amyloides Modellprotein, verwendet und die Bindung von M^{2+} bzw. dessen Einfluss auf das Aggregationsverhalten charakterisiert werden.

Nachweis der Bindung von Metallionen an Sup35p-NM

Elektronenspinresonanz

Eine häufig verwendete Methode zur Bestimmung der Bindung von Kupfer an Proteine ist die Elektronenspinresonanz (*electron paramagnetic resonance*, EPR). Im Rahmen dieser Arbeit sollte mittels EPR bestimmt werden, ob und von welchen NM-Assemblierungsformen Kupfer komplexiert wird. Dazu wurde paramagnetisches $^{63}CuCl_2$ verwendet, das löslichem und fibrillärem NM zugegeben wurde. Der dabei verwendete Puffer enthielt Glycin, das eine unspezifische Bindung von Kupfer an NM verhindert. Die EPR-Spektren zeigen drei kleine Maxima zwischen 2700 G und 3100 G (Abbildung 3-21), welche charakteristisch für ^{63}Cu in gebundener Form sind (Aronoff-Spencer *et al.*, 2000). Diese Maxima sind in Kontrollmessungen ohne NM nicht so ausgeprägt zu erkennen. Es kann die Bindung von Kupfer sowohl an lösliches als auch an fibrilläres NM detektiert werden. Dabei führt der Zeitpunkt der Zugabe von $^{63}CuCl_2$, entweder bei der Rückfaltung von NM oder nach Assemblierung der Fibrillen, zu keinen erkennbaren Bindungsunterschieden.

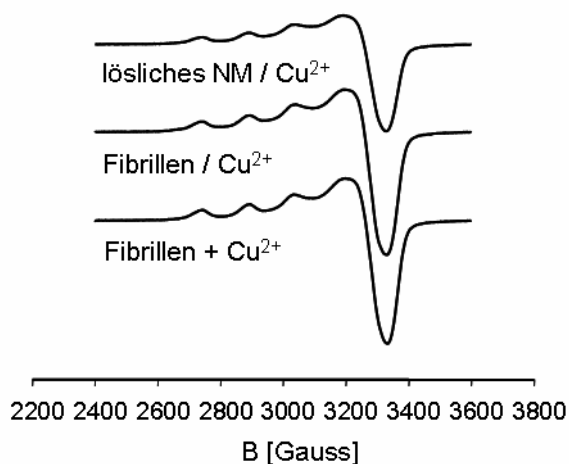


Abbildung 3-21 Untersuchung der Bindung von Cu^{2+} an NM mittels EPR. EPR-Spektren (X-Band, $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) von löslichem und fibrillärem NM^{wt} ($150\text{ }\mu\text{g/ml}$) in $5\text{ mM K}_x\text{H}_x\text{PO}_4$ pH 6,8, 40 mM NaCl , 2 mM Glycin in Anwesenheit von $1\text{ mM }^{63}\text{CuCl}_2$. $^{63}\text{CuCl}_2$ war dabei entweder schon im Rückfaltungspuffer enthalten ($/\text{Cu}^{2+}$) oder wurde erst nach Assemblierung der Fibrillen ($+\text{Cu}^{2+}$) zugegeben.

Ultraschall-Resonator-Technologie

Zur genaueren Untersuchung der Bindung von Cu^{2+} und weiterer M^{2+} an NM wurde die Ultraschall-Resonator-Technologie (URT) verwendet. Mit Hilfe dieser Methode kann die Bindung von Liganden durch Strukturänderungen des Proteins beobachtet werden. Dabei wird die Änderung der Proteinstruktur nicht direkt, sondern indirekt über die Änderung der Struktur der Hydrathülle gemessen, was sich in einer Änderung der Geschwindigkeit des durchgeleiteten Ultraschalls äußert.

Die Zugabe von MCl_2 (Metallchlorid)-Lösungen zu NM führt zu einer Abnahme der Ultraschallgeschwindigkeit. Für die Bestimmung der Bindekonstante wurde MCl_2 im Bereich von $0\text{-}50\text{ }\mu\text{M}$ zutitriert. Da M^{2+} unspezifisch mit dem Peptidrückgrat interagieren, kann im analysierten Bereich keine absolute Sättigung beobachtet werden. Stattdessen werden mehrere kleinere aufeinander folgende Sättigungskurven gemessen. Eine Bindekonstante wurde durch die Auswertung der Werte der ersten Sättigungskurve ($\sim 0\text{-}20\text{ }\mu\text{M MCl}_2$) bestimmt. Um den durch die Titration entstehenden Verdünnungseffekt zu berücksichtigen, wurde das relative molare Inkrement der Ultraschallgeschwindigkeit $[\text{U}]$ berechnet, welches von der Ultraschallgeschwindigkeit in der Proben- und Referenzzelle und der entsprechenden Proteinkonzentration abhängt (s. 2.4.13; Chalikian *et al.*, 1994). Zur Berechnung der Bindekonstante wurde $[\text{U}]$ gegen das Verhältnis von MCl_2 - zu Proteinkonzentration aufgetragen und durch einen sigmoidalen Fit ausgewertet. Abbildung 3-22A zeigt exemplarisch das Ergebnis der Titration von Cu^{2+} , für das eine Bindekonstante von $3\text{ }\mu\text{M}$ berechnet wurde. Weitere Bindekonstanten für Mn^{2+} ($3\text{ }\mu\text{M}$) und Zn^{2+} ($6\text{ }\mu\text{M}$) wurden analog

bestimmt.

Eine Sättigung von NM mit M^{2+} kann erst bei MCl_2 -Konzentrationen von 5-8 mM beobachtet werden. Mittels Titrations von 0-12 mM MCl_2 (Abbildung 3-22B zeigt exemplarisch das Ergebnis der Titration von Cu^{2+}) kann eine Bindekonstante von $860 \mu M$ für Cu^{2+} , von $370 \mu M$ für Mn^{2+} und von $340 \mu M$ für Zn^{2+} bestimmt werden, die die unspezifische Wechselwirkung von M^{2+} mit dem Peptidrückgrat beschreibt.

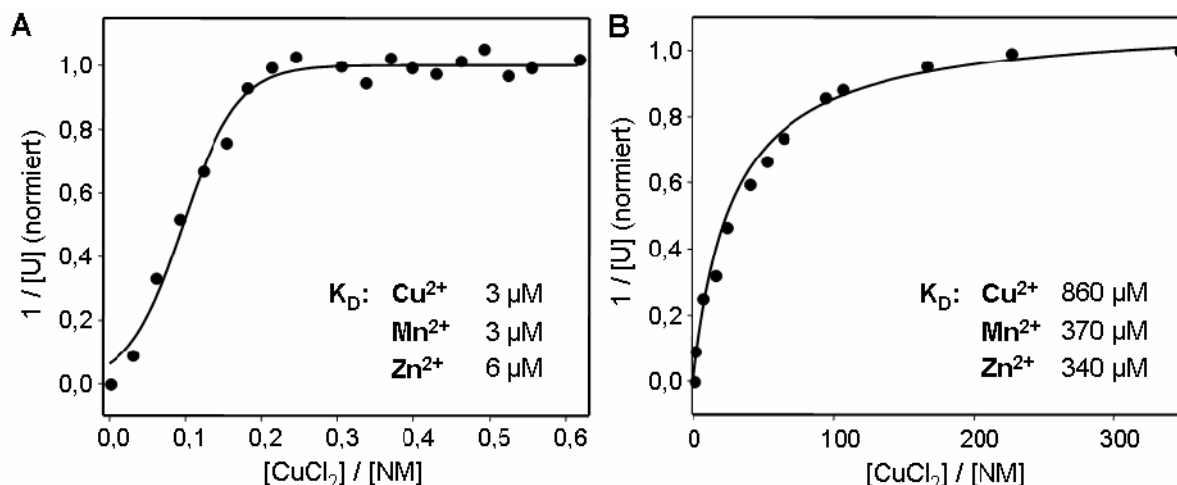


Abbildung 3-22 Untersuchung der Bindung von M^{2+} an NM mittels URT. Änderung der Ultraschallgeschwindigkeit $[U]$ durch Zugabe von 0-20 μM (A) und 0-12 mM (B) $CuCl_2$ zu 0,95 mg/ml NM^{wt} in NEM-Puffer bei 25 °C. Bindekonstanten (K_D) wurden durch sigmoide (A) bzw. hyperbolische (B) Fits berechnet. Die Bindung von Mn^{2+} bzw. Zn^{2+} wurde entsprechend bestimmt.

Eine Änderungen der Quartärstruktur von NM, welche sich in der Änderung der Absorption des Ultraschalls widerspiegeln sollte, kann durch die Zugabe von M^{2+} zwar beobachtet werden, jedoch unterscheiden sich die einzelnen Absorptionsspektren voneinander. Daher wurden die Daten der Ultraschallabsorption nicht zur weiteren Analyse der Metallbindung herangezogen.

Isotherme Titrationskalorimetrie

Zur Bestätigung des Ergebnisses der Messungen der Ultraschallgeschwindigkeit wurde die Bindung von Cu^{2+} zusätzlich mittels isotherme Titrationskalorimetrie (*isothermal titration calorimetry*, ITC) untersucht. ITC ist, im Gegensatz zu URT, eine häufig verwendete Methode zur Analyse von Ligandenbindung. Dabei wird die Bindung nicht durch strukturelle Änderungen sondern durch die Änderung der Enthalpie detektiert.

Bei der Zugabe von $CuCl_2$ zu NM entsteht Bindungswärme, welche mit zunehmender

CuCl₂-Konzentration abnimmt. Dadurch kann eine Bindestelle mit einer Bindekonstanten von 5 μ M bestimmt werden (Abbildung 3-23). Diese Bindekonstante stimmt mit der in den URT-Messungen bestimmten überein.

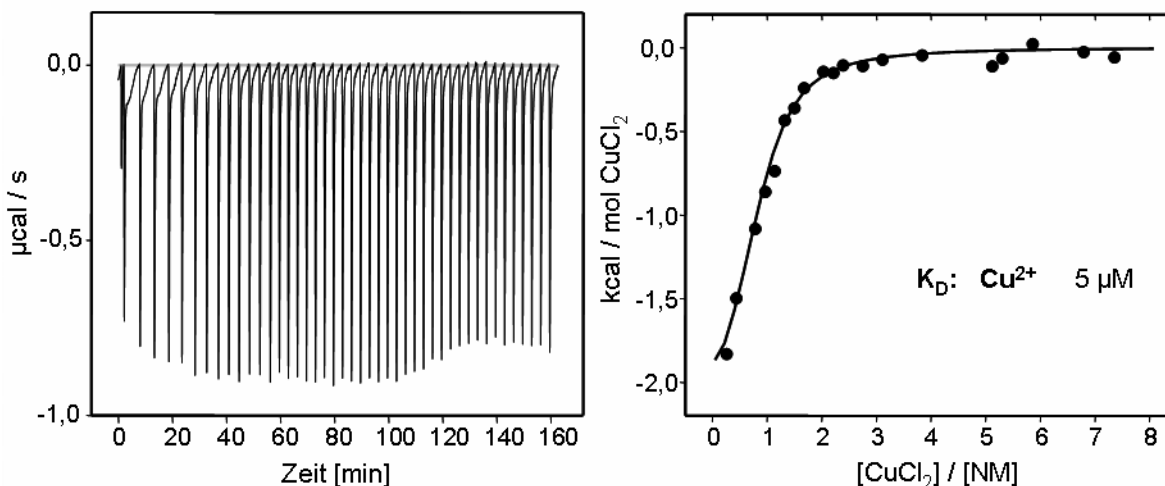


Abbildung 3-23 Untersuchung der Bindung von Cu²⁺ an NM mittels ITC. Die Titration von CuCl₂ zu NM^{wt} erfolgte in 25 mM NEM pH 7, 150 mM NaCl bei 30 °C. Die gemessene Änderung der Enthalpie (links) konnte durch Integration (rechts) zur Bestimmung der Bindeeigenschaften genutzt werden. Die Bindekonstante wurde durch Analyse mit der gerätespezifischen Software mittels eines sigmoidalen Fits bestimmt.

Circulardichroismus-Spektroskopie

Eine weitere Möglichkeit die Interaktion von Metallen mit Proteinen zu untersuchen bietet die CD-Spektroskopie. Im sichtbaren Bereich zwischen 300 und 800 nm (VIS-CD) liefern gebundene Metallionen in chiraler Umgebung detektierbare Signale, während ungebundene CD-inaktiv sind (Klewpatinond & Viles, 2007). So können z. B. für verschiedene Fragmente von PrP durch die Zunahme des Signals bei 480 bzw. 575 nm nach Zugabe von Cu²⁺ deren Bindekonstanten bestimmt werden. Die Signalsteigerung bei unterschiedlichen Wellenlängen kann dabei auf verschiedene Bindemotive zurückgeführt werden (Garnett & Viles, 2003, Klewpatinond & Viles, 2007). Mit Hilfe dieser Methode sollte auch die Bindung von Cu²⁺ an NM charakterisiert werden. Dazu wurden CD-Spektren von NM (25 μ M) in Abwesenheit bzw. Anwesenheit von 12,5 μ M oder 250 μ M CuCl₂ im Bereich von 260-800 nm aufgenommen. In Anwesenheit von Cu²⁺ kann eine Erhöhung des Signals bei ca. 480 nm und 320 nm beobachtet werden (Abbildung 3-24). Im Gegensatz zu den Messungen von PrP (Garnett & Viles, 2003) ist die Intensität des Signals jedoch unabhängig von der Cu²⁺-Konzentration.

Das NM-Cu²⁺-spezifische Signal ist allerdings nicht bei jeder Messung detektierbar, was unterschiedlichen CD-aktiven und -inaktiven Kupferbindestellen mit unterschiedlichen Affinitäten (je nach Oligomerisierungsgrad des Proteins) zuzuschreiben sein könnte.

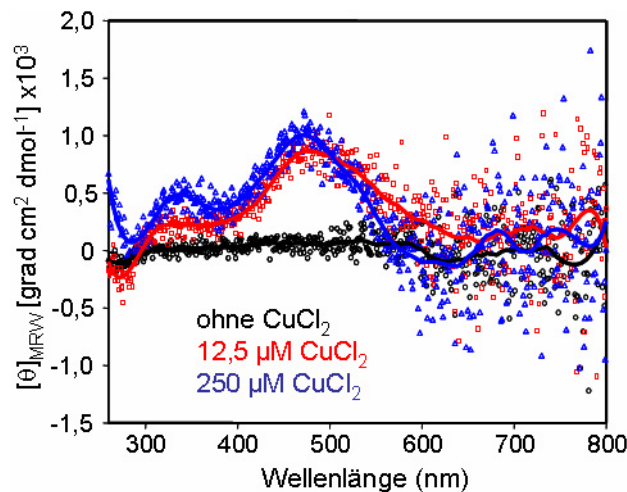


Abbildung 3-24 Untersuchung der Bindung von Cu²⁺ an NM mittels VIS-CD. CD-Spektren von NM^{wt} (650 µg/ml) im sichtbaren Wellenlängenbereich gemessen in Ab- bzw. Anwesenheit von 12,5 µM oder 250 µM CuCl₂ in MQ-H₂O bei RT, Schichtdicke der Küvette 5 mm.

Einfluss von Metallionen auf die Fibrillenbildung

Um den Einfluss von M²⁺ auf die Amyloidbildung von NM zu untersuchen, wurden ungeseedete und geseedete Fibrillenbildungsreaktionen durchgeführt. In Anwesenheit von Cu²⁺ können für die Detektion der Fibrillenbildung nicht die herkömmlichen Methoden der CR- und ThT-Bindung verwendet werden. Der für den CR-Assay benötigte Puffer (CRBB) enthält Phosphat, welches mit Cu²⁺ Komplexe bildet und so zur Verfälschung des Ergebnisses führt. Beim ThT-Assay wird das amyloid-spezifische Fluoreszenzsignal durch Cu²⁺ stark gequencht. Die Detektion der Fibrillenbildung von NM in Anwesenheit von M²⁺ kann mit dem „Acrylodan-Assay“ (Scheibel *et al.*, 2004) durchgeführt werden. Dazu wurde NM^{T158C} verwendet, an dessen Cystein der Fluoreszenzfarbstoff Acrylodan kovalent gekoppelt wurde. NM^{T158C} unterscheidet sich in seinem Assemblierungsverhalten nicht von NM^{wt} (Scheibel *et al.*, 2004). Auch die Bildung von Filamenten kann bei dieser Mutante beobachtet werden. Acrylodan-gelabeltes lösliches NM^{T158C} weist ein Emissionsmaximum bei 520 nm auf. Die Assemblierung der Fibrillen äußert sich durch den Anstieg der Fluoreszenz bei 470 nm und der Abnahme bei 520 nm. Auch die Fluoreszenz von Acrylodan wird in Anwesenheit von Cu²⁺ leicht gequencht. Dieser Quenching-Effekt kann jedoch korrigiert werden, indem das Verhältnis von fibrillärem zu löslichem NM, d. h. das Verhältnis der

Emission von 470 nm zu 520 nm, berechnet wird.

Die Messungen wurden in NEM-Puffer in Abwesenheit bzw. in Anwesenheit von CuCl_2 , MnCl_2 oder ZnCl_2 durchgeführt. Die eingesetzten M^{2+} -Konzentrationen betragen 50 bzw. 500 μM , um den Einfluss von spezifischer (50 μM) und unspezifischer (500 μM) Bindung zu untersuchen.

Zur Analyse des Einflusses von M^{2+} auf die Keimbildung von NM wurden Fibrillenbildungskinetiken in Abwesenheit von *Seeds* durchgeführt. Ohne den Zusatz von M^{2+} beginnt die Fibrillenbildung von NM nach einer Lag-Phase von 17 h und erreicht die stationäre Phase nach 120 h (Abbildung 3-25). Die Anwesenheit von Cu^{2+} verlängert die Lag-Phase und verringert die Fluoreszenzintensität in der stationären Phase, wobei die Keimbildung 23 h bei 50 μM CuCl_2 bzw. 26 h bei 500 μM CuCl_2 dauert. Die Fibrillenbildung ist nach 150 bzw. 146 h beendet. Im Gegensatz zu Cu^{2+} beschleunigt Zn^{2+} die Fibrillenbildung. In Anwesenheit von 500 μM Zn^{2+} kommt es nach einer Lag-Phase von 15 h zur Assemblierung, die nach 96 h beendet ist. Dieser Effekt ist konzentrationsabhängig. Die Geschwindigkeit der Reaktion steigt mit der Zn^{2+} -Konzentration. Die Anwesenheit von Mn^{2+} zeigt keinen Einfluss auf die Fibrillenbildung.

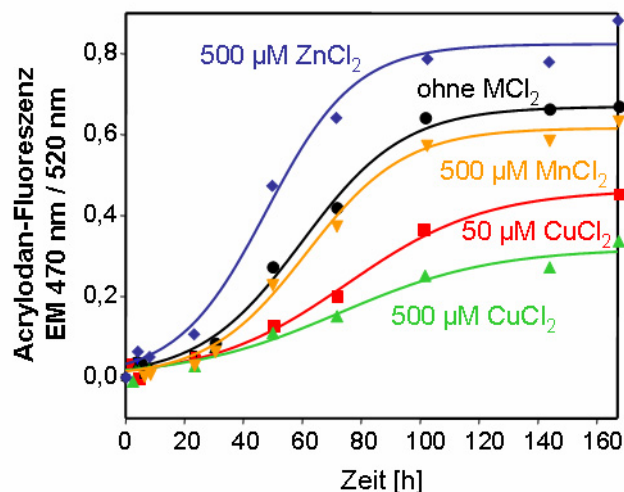


Abbildung 3-25 Einfluss von M^{2+} auf die Keimbildung. Jeweils 5 μM Acrylodan-gelabeltes NM^{T158C} wurde in NEM-Puffer in An- bzw. Abwesenheit von 50 μM CuCl_2 , 500 μM CuCl_2 , 500 μM MnCl_2 oder 500 μM ZnCl_2 bei 20 °C inkubiert und die Fibrillenbildung durch die Zunahme der Acrylodan-Fluoreszenz bei 470 nm und die Abnahme bei 520 nm (Anregungswellenlänge: 392 nm) detektiert.

Der Einfluss von M^{2+} auf das Wachstum der NM-Fibrillen wurde in Reaktionen, in denen die Keimbildungsphase durch die Zugabe von *Seeds* umgangen wurde, analysiert. Die Geschwindigkeit des Wachstums der Fibrillen wird von zwei Reaktionen bestimmt: a) der Bindung von löslichem Protein an den Keim (*Seed*) und b) der Konformationsänderung nach Bindung an den Keim (*Seed*) (Scheibel *et al.*, 2004). Abbildung 3-26A zeigt exemplarisch eine geseedete Kinetik von Acrylodan-gelabeltem NM^{T158C} in NEM-Puffer in Anwesenheit von 5 % (w/w) *Seeds*. Durch das Fitten der Daten mit einer doppelt-exponentiellen Funktion können zwei Wachstumsraten bestimmt werden. Weder die erste (k_1) noch die zweite Wachstumsrate (k_2) wird durch die Anwesenheit von M^{2+} signifikant beeinflusst (Abbildung 3-26B).

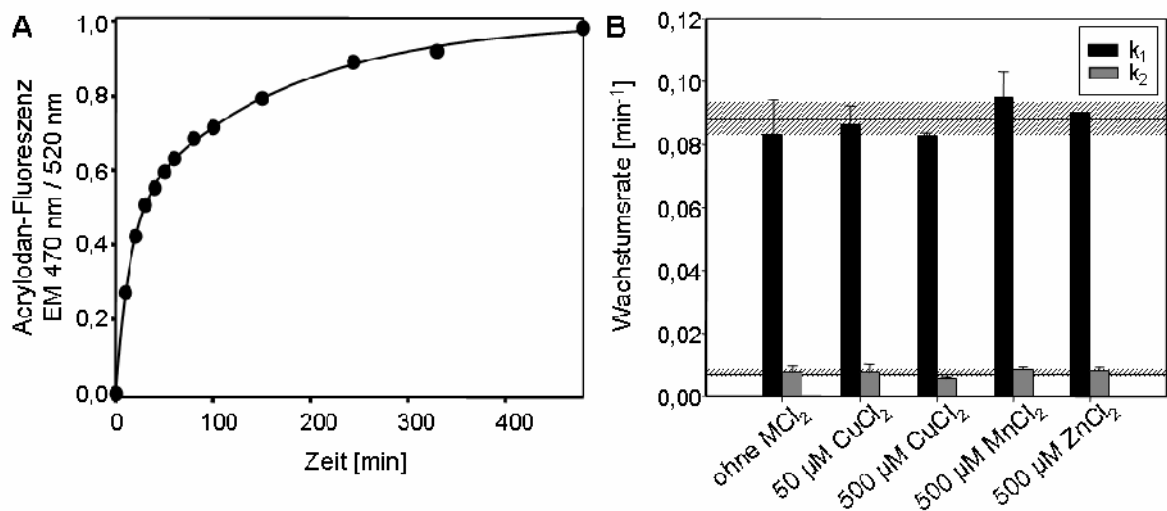


Abbildung 3-26 Einfluss von M^{2+} auf das Fibrillenwachstum. Jeweils 5 μM Acrylodan-gelabeltes NM^{T158C} wurde in NEM-Puffer in An- bzw. Abwesenheit von 50 μM CuCl_2 , 500 μM CuCl_2 , 500 μM MnCl_2 oder 500 μM ZnCl_2 bei 20 °C in Anwesenheit von 5 % (w/w) *Seeds* inkubiert und die Fibrillenbildung durch die Zunahme der Acrylodan-Fluoreszenz bei 470 nm und die Abnahme bei 520 nm (Anregungswellenlänge: 392 nm) beobachtet. (A) Kinetik in Abwesenheit von M^{2+} (exemplarisch). (B) Wachstumsraten k_1 und k_2 , bestimmt durch doppelt-exponentielle Fits (diagonal gestreifte Balken zeigen die Abweichung vom Mittelwert an).

Einfluss von Metallionen auf die Fibrillenstruktur

Der Einfluss von M^{2+} auf die Struktur der Fibrillen wurde mit Hilfe von CD-Spektroskopie, FTIR-Spektroskopie und AFM untersucht. Es wurden Fibrillen, die in Anwesenheit von *Seeds* gebildet wurden, verwendet. Mittels Fern-UV CD- und FTIR-Spektroskopie kann kein signifikanter Einfluss sowohl von Cu^{2+} als auch von Mn^{2+} oder Zn^{2+} auf die Sekundärstruktur der Fibrillen detektiert werden. Die Spektren der in Anwesenheit von M^{2+} assemblierten Fibrillen gleichen denen der ohne M^{2+} gebildeten Fibrillen (s. Abbildung 3-8). Ein Effekt von M^{2+} war auch auf die Sekundärstruktur des unstrukturierten löslichen NM ist nicht zu

erkennen.

Der Einfluss von M^{2+} auf die Fibrillenmorphologie wurde mittels AFM untersucht. Die Länge und Menge der durch *Seeding* in Abwesenheit von M^{2+} gebildeten Fibrillen unterscheidet sich nicht von denen in Anwesenheit von M^{2+} assemblierten Fibrillen. Auch genauere Untersuchungen der Oberflächenstruktur der Fibrillen zeigen keinen signifikanten Einfluss von M^{2+} . Lediglich bei Fibrillen aus ungeseedeten Reaktionen können Unterschiede detektiert werden. Während sich die Fibrillen, die in Abwesenheit von M^{2+} bzw. in Anwesenheit von $50 \mu\text{M CuCl}_2$, $500 \mu\text{M MnCl}_2$ oder ZnCl_2 gebildet wurden, nicht unterscheiden (Abbildung 3-27A zeigt exemplarisch Fibrillen ohne M^{2+}), sind Fibrillen, die in Anwesenheit von $500 \mu\text{M CuCl}_2$ assembliert wurden, meist viel kürzer (Abbildung 3-27B).

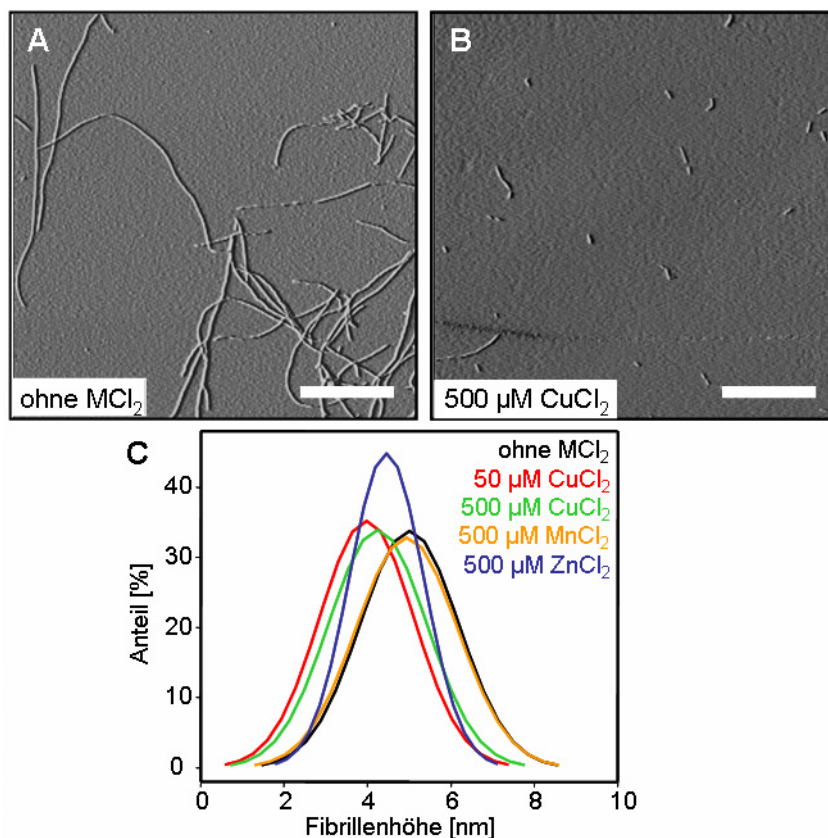


Abbildung 3-27 Einfluss von M^{2+} auf die Fibrillenmorphologie. (A, B) AFM-Aufnahmen (*Tapping Mode*, *Amplitude*) von NM^{wt} ($150 \mu\text{g/ml}$) assembliert in NEM-Puffer ohne den Zusatz von *Seeds* in (A) Abwesenheit von M^{2+} oder (B) Anwesenheit von $500 \mu\text{M CuCl}_2$. Maßstab: $1 \mu\text{m}$. (C) Gaußverteilung der Höhen (jeweils 50, bestimmt an AFM-Aufnahmen mit einer Seitenlänge von $5 \mu\text{m}$) von Fibrillen assembliert in NEM-Puffer in An- bzw. Abwesenheit von M^{2+} .

Die Analyse der Fibrillenhöhe zeigt, dass Fibrillen, die in Anwesenheit von Cu^{2+} oder Zn^{2+} gebildet wurden, im Durchschnitt signifikant niedriger sind (durchschnittlich 4,0 nm bei 50 μM CuCl_2 , 4,2 nm bei 500 μM CuCl_2 und 4,5 nm bei 500 μM ZnCl_2) als die, die ohne Zusätze bzw. in Anwesenheit von 500 μM MnCl_2 assemblierten (durchschnittlich 4,9 nm bei 500 μM ZnCl_2 und 5,0 nm ohne M^{2+}). Die Höhe der analysierten Fibrillen variiert dabei in Anwesenheit von Zn^{2+} nicht so stark wie unter den anderen Bedingungen (Abbildung 3-27C).

Einfluss von Metallionen auf die Fibrillenstabilität

Neben dem Effekt von M^{2+} auf die Fibrillenbildung und -struktur wurde auch ihr Einfluss auf die Stabilität der Fibrillen untersucht. Wie bereits in Abschnitt 3.2.3 erwähnt, zeigen amyloide NM-Fibrillen eine erhöhte Resistenz gegenüber Denaturierung mit SDS und Verdau mit Proteasen (Serio *et al.*, 2000). Diese Eigenschaft kann auf die kompakt gepackte β -Faltblatt-Struktur der amyloiden Fibrillen zurückgeführt werden (Manning & Colon, 2004; Serio *et al.*, 2000).

Zur Untersuchung des Einflusses von M^{2+} auf die SDS-Stabilität der Fibrillen, wurden Fibrillen, die durch *Seeding* in An- bzw. Abwesenheit von M^{2+} assemblierten, in 2 % SDS enthaltenden Puffer (1x Laemmli-Puffer) verdünnt, für 0-10 min bei 95 °C inkubiert und mittels SDS-PAGE analysiert. Dabei kann kein signifikanter Einfluss von M^{2+} auf die SDS-Stabilität der Fibrillen beobachtet werden (Abbildung 3-28A).

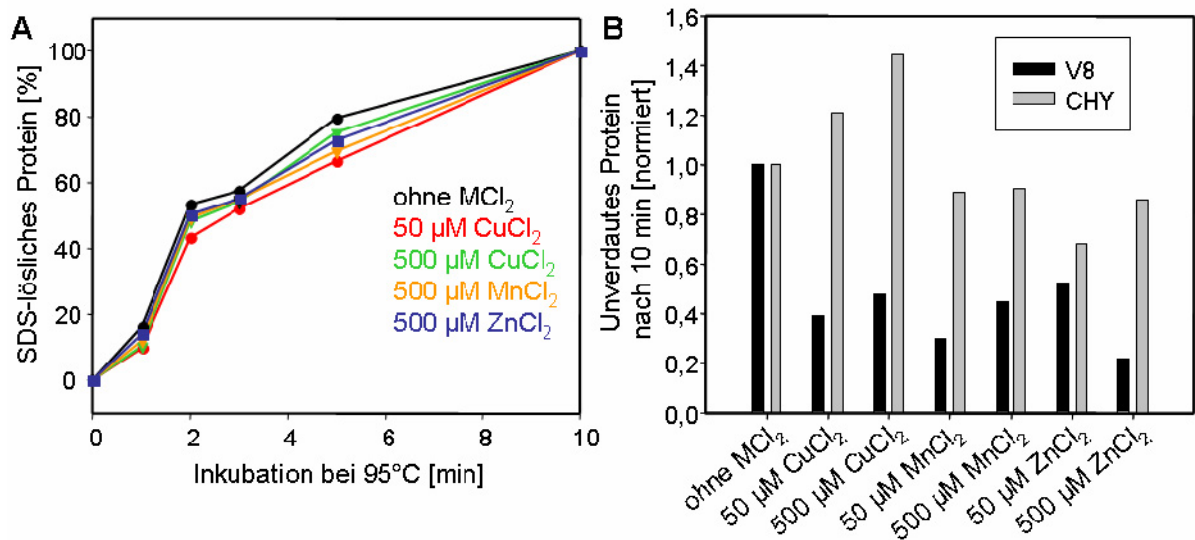


Abbildung 3-28 Einfluss von M^{2+} auf die SDS- und Proteasestabilität der Fibrillen. NM^{wt} -Fibrillen assembliert durch *Seeding* in An- bzw. Abwesenheit von M^{2+} wurden (A) für 0-10 min bei 95 °C in 1x Laemmli-Puffer bzw. (B) für 1-10 min bei 37 °C mit CHY (1/50 w/w) bzw. V8 (1/10 w/w) inkubiert. SDS-lösliches (A) bzw. proteaseresistentes (B) NM wurde mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung detektiert und densitometrisch quantifiziert.

Die Analyse der Proteaseresistenz der Fibrillen sollte nicht nur Aufschluss über die Stabilität sondern auch über mögliche Metallbindestellen geben. Dazu wurden zwei verschiedene Endoproteasen verwendet. Chymotrypsin (CHY) schneidet nur im aminoterminalen Bereich (N) von NM, während sich die Schnittstellen von Glu-C V8 (V8) nur in der Mittelregion (M) befinden. Fibrillen, die durch *Seeding* in Anwesenheit von M^{2+} assemblierten, wurden bei 37 °C verdaut und mittels SDS-PAGE analysiert. Die in Anwesenheit von Cu^{2+} gebildeten Fibrillen zeigen eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Verdau mit CHY: nach 10-minütiger Inkubation bei 37 °C wird, abhängig von der Cu^{2+} -Konzentration, ca. 20-40 % mehr resistentes NM detektiert als bei Fibrillen, die in Ab- bzw. Anwesenheit von Mn^{2+} oder Zn^{2+} gebildet wurden (Abbildung 3-28B). Im Gegensatz dazu wird der Verdau mit V8 von allen M^{2+} in ähnlicher Weise beeinflusst. Nach 10-minütiger Inkubation mit V8 ist nur ca. 20-50 % resistentes NM, im Vergleich zu Proben ohne M^{2+} , auf dem Gel zu erkennen. Da kein Einfluss von M^{2+} auf den Verdau eines nicht-fibrillären und nicht-kupferbindenden Kontrollproteins (mDHFR) beobachtet werden kann, wird ein direkter Effekt von M^{2+} auf die Aktivität der verwendeten Proteasen ausgeschlossen.

Einfluss von Metallionen auf nicht-fibrilläre Assemblierungsformen

Bei der Assemblierung von Fibrillen in ungeseedeten Reaktionen wird ein starker Einfluss von Cu^{2+} beobachtet. Es wird die Fibrillenbildungsgeschwindigkeit, die Intensität des Acrylodansignals nach Fibrillenbildung und auch die Menge an mittels AFM detektierten Fibrillen verringert (s. Abbildung 3-25 und Abbildung 3-27). Die Quantifizierung von löslichem und unlöslichem NM (erhalten nach einem Zentrifugationschritt) mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung zeigt allerdings einen wesentlich höheren Anteil an unlöslichem NM in Anwesenheit von 500 μM $CuCl_2$.

Unlösliches NM kann neben der fibrillär-aggregierten auch in amorph-aggregierter Form vorliegen. Um den Anteil an amyloiden Fibrillen am gesamten aggregierten Protein zu bestimmen, wurde lösliches von unlöslichem NM durch einen Zentrifugationsschritt getrennt, Pellet und Überstand mit SDS-haltigem Auftragspuffer versetzt und vor bzw. nach 10-minütiger Inkubation bei 95 °C mittels SDS-PAGE analysiert. In nicht hitzebehandelten Pelletproben können nur NM-Moleküle aus amorphen Aggregaten, nicht aber aus SDS-resistenten Fibrillen auf dem Gel detektiert werden. Abbildung 3-29A zeigt den Anteil an unlöslichem NM in An- bzw. Abwesenheit von M^{2+} 1 h nach Rückfaltung, nach 2 Tagen und nach Fibrillenbildung durch *Seeding*. Nach einstündiger Inkubation, also zu Beginn der Keimbildungsphase und noch vor Beginn des Fibrillenwachstums, liegt NM in Anwesenheit

von 500 μM CuCl_2 schon zu ca. 75 % in Form amorpher Aggregate vor, während unter den anderen Bedingungen nur 8 % (50 μM CuCl_2) oder weniger amorph aggregiert sind.

Dass es sich bei diesem Effekt nicht um einen generellen Einfluss von Cu^{2+} durch Bindung an das Peptidrückgrat handelt, zeigen Messungen mit $\text{PrP}_{23-120}\text{M}$, einem Fusionsprotein aus dem aminoterminalen Teil des Mausprionproteins (Aminosäuren 23-120) und der Mitteldomäne M von Sup35p. $\text{PrP}_{23-120}\text{M}$ besitzt ein ähnliches Molekulargewicht wie NM und ebenfalls eine nativ entfaltete Struktur, kann jedoch keine Fibrillen ausbilden, weder in ungeseedeten noch in geseedeten Reaktionen (Krammer *et al.*, 2007; Suhre, 2006). Auch bei $\text{PrP}_{23-120}\text{M}$ führt die Anwesenheit von 500 μM CuCl_2 zu verstärkter amorpher Aggregation, im Vergleich zu NM ist der Anteil an aggregiertem Protein jedoch geringer (30 %).

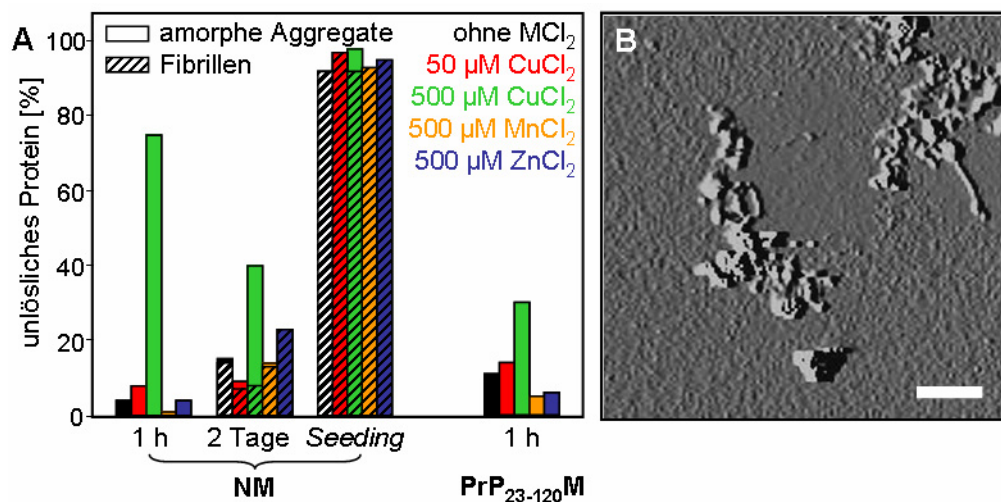


Abbildung 3-29 Einfluss von M^{2+} auf die Aggregation von NM. (A) NM^{wt} bzw. $\text{PrP}_{23-120}\text{M}$ (jeweils 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in NEM-Puffer) wurde in An- bzw. Abwesenheit von M^{2+} 1 h nach Rückfaltung, nach 2 Tagen und nach Fibrillenbildung durch *Seeding* mittels Zentrifugation und SDS-PAGE analysiert. In nicht hitzebehandelten Pelletproben konnten nur amorphe Aggregate nicht aber die SDS-resistenten Fibrillen auf dem Gel detektiert werden. Die Proteinbanden wurden nach Coomassie-Färbung densitometrisch quantifiziert. (B) AFM-Aufnahme (*Tapping Mode, Amplitude*) von nicht-fibrillären NM-Aggregaten. Maßstab: 1 μm .

Die für NM detektierten amorphen Aggregate zeigen keine hohe Stabilität. Nach 2-tägiger Inkubation, während der exponentiellen Phase der Fibrillenbildung, liegt in Anwesenheit von 500 μM CuCl_2 nur noch ca. 32 % des Proteins in amorphen Aggregaten vor, während 8 % zu Fibrillen assembliert ist. In Anwesenheit von 50 μM CuCl_2 kann nach 2 Tagen eine vergleichbare Menge an Fibrillen, jedoch kaum amorphe Aggregate detektiert werden. In Reaktionen ohne M^{2+} bzw. in Anwesenheit von Mn^{2+} und Zn^{2+} ist kaum bzw. kein amorph aggregiertes NM zu erkennen. Nach *Seeding* mit 10 % (w/w) *Seeds* liegt über 90 % des Proteins in fibrillärer Form vor, und nur in Anwesenheit von 500 μM CuCl_2 ist leichte

amorphe Aggregation zu beobachten.

Obwohl mit dieser Methode in Anwesenheit von $500 \mu\text{M}$ CuCl_2 zu Beginn der Fibrillenbildungsreaktion ein sehr hoher Anteil an amorph aggregiertem Protein detektiert wird, sind nach Zentrifugation von vergleichbar behandelten Proben in einem Saccharosegradienten keine Aggregate zu erkennen. Nur der Bereich von 20-38 % Saccharose (vgl. Abbildung 3-16A) enthält NM, welches mittels Immunoblot nachweisbar ist. Diese Beobachtung spricht für die hohe Instabilität der amorphen Aggregate: durch die Gradientenzentrifugation über Nacht scheinen diese vermutlich zu dissoziieren und können so nicht wie erwartet bei höheren Saccharosekonzentrationen detektiert werden.

Nicht-fibrilläre Aggregate werden auch mittels AFM beobachtet (Abbildung 3-29B). Diese treten zwar vornehmlich in Anwesenheit von Cu^{2+} , allerdings auch unter anderen Bedingungen auf.

Um den Zustand des verbleibenden nicht-aggregierten NM zu untersuchen, wurde der lösliche Überstand von NM-Proben in An- bzw. Abwesenheit von M^{2+} unmittelbar nach Rückfaltung bzw. nach 2-tägiger Inkubation bei 20°C durch Zentrifugation in einem Saccharosegradienten untersucht. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert und nach Färbung mit SYPRO[®] Ruby quantifiziert. Abbildung 3-30 zeigt das Ergebnis der Proben, die unmittelbar nach Rückfaltung der Gradientenzentrifugation unterzogen wurden. Die Anwesenheit von M^{2+} hat hierbei keinen Einfluss auf den Anteil von löslichem und filamentärem NM.

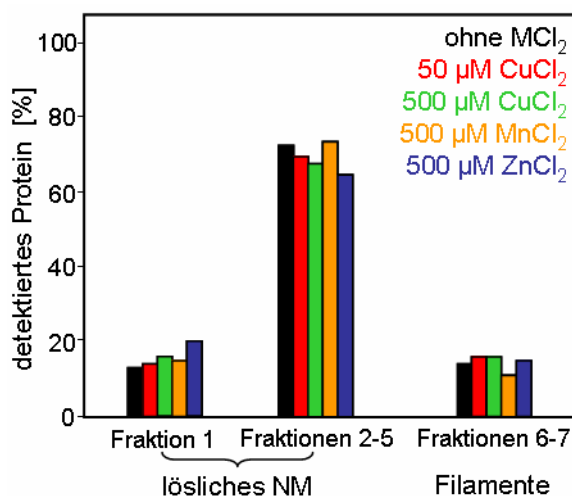


Abbildung 3-30 Einfluss von M^{2+} auf den Anteil an löslichem NM und Filamenten. NM^{wt} (jeweils $150 \mu\text{g/ml}$ in NEM-Puffer) wurde unmittelbar nach Rückfaltung in An- bzw. Abwesenheit von M^{2+} in einem kontinuierlichen Saccharosegradienten (20-60 % Saccharose) über Nacht zentrifugiert, die Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert und nach Färbung mit SYPRO[®] Ruby quantifiziert.

Nach 2-tägiger Inkubation nimmt die Menge an NM in der ersten Fraktion ab. Jedoch sind auch hier keine Einflüsse von M^{2+} detektierbar. Rasterkraftmikroskopisch können keine signifikanten morphologischen Unterschiede zwischen den Fraktionen 1-5 erkannt werden. Daher werden diese Fraktionen als „lösliches NM“ definiert.

Obwohl NM keine bekannten Metallbindemotive besitzt, kann die spezifische Bindung sowohl von Cu^{2+} , als auch von Mn^{2+} und Zn^{2+} detektiert werden. Ein Einfluss von M^{2+} auf die Assemblierung von NM wird nur in ungesedeten Reaktionen beobachtet. Anscheinend ist, ähnlich wie bei der Filamentbildung, die Beeinflussung der Keimbildungsphase von NM ausschlaggebend für ein geändertes Aggregationsverhalten.

4 Diskussion

4.1 Rasterkraftmikroskopische Charakterisierung amyloider PAPBN1-Fibrillen

Die Verlängerung der Polyalaninsequenz in PAPBN1 von 10 auf 17 Alaninen ist assoziiert mit der Krankheit OMPD und führt *in vitro* zu einem geänderten Assemblierungsverhalten des Proteins. Obwohl beide Proteine amyloide Fibrillen bilden können, zeigt N-(+7)Ala (mit 17 Alaninen) im Gegensatz zu N-WT (mit 10 Alaninen) sowohl eine kürzere Keimbildungsphase in ungesedeten als auch höhere Fibrillenwachstumsraten in gesedeten Reaktionen. N-(+7)Ala besitzt wahrscheinlich eine stärkere Tendenz eine *Cross-β* Struktur auszubilden als N-WT. Die Assemblierung von N-(+7)Ala kann auch durch die Zugabe von N-WT *Seeds* beschleunigt werden, jedoch mit einer um den Faktor 2 verringerten Wachstumsrate im Vergleich zu N-(+7)Ala *Seeds*. N-(+7)Ala-Fibrillen haben eine höhere Seedingaktivität als N-WT und zeigen zudem eine höhere Resistenz gegenüber der Denaturierung mit Guanidiniumthiocyanat (Lodderstedt *et al.*, 2007).

Die Anzahl der Alanine beeinflusst auch die Morphologie der Fibrillen: N-(+7)Ala-Fibrillen zeigen im Gegensatz zu N-WT-Fibrillen keine ausgeprägt Oberflächenstruktur. Die Unterschiede können nur rasterkraftmikroskopisch detektiert werden, nicht jedoch mittels TEM. Die Oberflächenstruktur basiert auf einer unterschiedlichen Anordnung der β -Stränge in Abhängigkeit von der Anzahl der Alanine, was auch die unterschiedliche Stabilität der Fibrillen erklären könnte. Strukturelle Unterschiede in Abhängigkeit von der Länge der Polyalaninsequenz kann auch mittels Röntgenbeugungsuntersuchungen an fibrillären Peptiden detektiert werden (Shinchuk *et al.*, 2005). Eine Änderung der Struktur und der Stabilität von amyloiden Fibrillen kann nicht nur durch Variationen in der Aminosäuresequenz hervorgerufen werden. Die Konformation und Stabilität von Fibrillen des Hefeprions Sup35p wird sogar durch die Temperatur während der Fibrillenassemblierung beeinflusst (Krishnan & Lindquist, 2005; Tanaka *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2006).

4.2 Struktureller Vergleich von amyloiden Sup35p-NM-Fibrillen mit Nanofibrillen synthetischer Spinnenseide

Die Priondomäne NM des Hefeprions Sup35p wurde in dieser Arbeit als amyloides Modellprotein zum strukturellen Vergleich mit Nanofibrillen des synthetischen Spinnenseidenproteins eADF-4(C16) eingesetzt. Die amyloiden Eigenschaften beider Proteine wurden durch ThT- und CR-Bindung, CD- und FTIR-Spektroskopie und Röntgenbeugungsmessungen untersucht. eADF-4(C16)-Fibrillen können ebenso wie NM-Fibrillen mittels ThT und CR detektiert werden. Auch die Sekundärstruktur der beiden Proteine, sowohl in löslicher als auch in fibrillärer Form, unterscheidet sich nicht. Lediglich mittels FTIR und Röntgenbeugung werden strukturelle Unterschiede detektiert, die vermutlich auf einer unterschiedlichen Aminosäurezusammensetzung basieren. eADF-4(C16) kann in, für Spinnenseiden typische (Gosline *et al.*, 1999; Vollrath & Knight, 2001), Glycin- und Alanin-reiche Regionen unterteilt werden. Die Glycin-reichen Regionen sind wahrscheinlich an der Ausbildung von 3_1 -Helices beteiligt, die mittels FTIR detektiert werden können. Die Alanin-reichen Bereiche bilden β -Faltblatt-Strukturen aus. Dabei ist die Distanz zwischen den einzelnen β -Faltblätter in der für eADF-4(C16)-Fibrillen mittels Röntgenbeugung bestimmten amyloiden *Cross- β* Struktur nur 5,3 Å, im Gegensatz zu NM mit 9,4 Å, was durch die kurze Seitenkettenlänge der Aminosäure Alanin erklärt werden kann. Für fibrilläre Peptide aus Polyalaninmotiven von PAPBN1 kann mittels Röntgenbeugung ein ähnlicher Abstand bestimmt werden (Shinchuk *et al.*, 2005).

Zusammengefasst zeigen eADF-4(C16)-Fibrillen amyloide Eigenschaften, die sich aber aufgrund der Spinnenseiden-spezifischen Aminosäurezusammensetzung zum Teil von denen der NM-Fibrillen unterscheiden.

4.3 Charakterisierung von Sup35p-NM-Filamenten

Die Hefepriondomäne NM kann nicht nur zu amyloiden Fibrillen assemblieren, sondern auch alternative Formen annehmen. Die in dieser Arbeit zum ersten Mal beschriebenen NM-Filamente besitzen zwar eine fibrilläre Morphologie, haben aber ansonsten keine gemeinsamen Eigenschaften mit amyloiden Fibrillen oder Protofibrillen.

Die Höhe der NM-Filamente beträgt nur ca. 1 nm, und sie sind nicht mit den amyloid-spezifischen Farbstoffen Kongo Rot und Thioflavin T detektierbar. Zudem zeigen sie weder Resistenz gegenüber Verdau mit Proteasen, Erhitzen oder gegenüber Denaturierung mit SDS. Filamente agieren nicht als *Seed* für die Amyloidbildung und assemblieren selbst nicht zu amyloiden Fibrillen.

Die Sekundärstruktur von Filamenten und Fibrillen unterscheidet sich stark. FTIR-Messungen zeigen, dass amyloide NM-Fibrillen zu ca. 30 %, NM-Filamente jedoch nur zu 7 % aus β -Turn Strukturen bestehenden. Der Anteil an β -Faltblatt-Strukturen ist in beiden NM-Formen in etwa gleich. Das amyloid-spezifische FTIR-Maximum bei einer Wellenzahl kleiner 1630 cm^{-1} (Zandomenighi *et al.*, 2004) kann nur für NM-Fibrillen (bei 1624 cm^{-1}), nicht aber bei Filamenten (bei 1640 cm^{-1}) detektiert werden.

In Modellen von monomerem A β (Mastrangelo *et al.*, 2006) und den Fibrillen des Hefeprions Ure2p (Chan *et al.*, 2005) beträgt die mittels AFM bestimmte Höhe von zwei β -Strängen in einem β -Faltblatt 1,5-2 nm. Dies stimmt in etwa mit der Höhe der NM-Filamente überein. Die Filamente könnten daher eine Struktur aufweisen, in der jeweils zwei β -Stränge parallel zur Filamentachse verlaufen, im Gegensatz zur *Cross- β* Struktur der amyloiden Fibrillen mit senkrecht angeordneten β -Strängen (Abbildung 4-1A). Diese Struktur könnte auch die geringere Stabilität der Filamente und die fehlende Bindung amyloid-spezifischer Farbstoffe erklären.

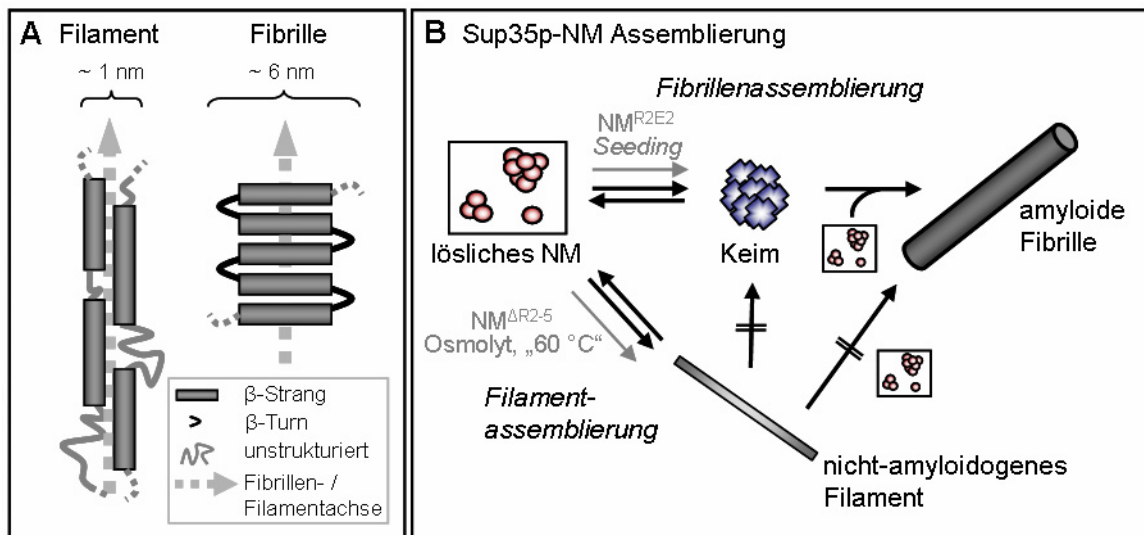


Abbildung 4-1 NM-Filamente – Modell der Struktur und des Assemblierungsweges. (A) Modell der Struktur nicht-amyloidogener Filamente und amyloider Fibrillen. Die Fibrillen weisen die charakteristische *Cross- β* Struktur mit senkrecht zur Fibrillenachse verlaufenden β -Stängen auf und haben einen Durchmesser von ~ 6 nm. Die Filamente, mit einem Durchmesser von ~ 1 nm, bestehen aus einer Mischung unstrukturierter und β -Strang-reicher Regionen, die parallel zur Filamentachse ausgerichtet sind. (B) Modell der NM-Assemblierungswege. Die Fibrillen-assemblierung ist ein keimbildungsabhängiger zweistufiger Prozess. Die Filament-assemblierung ist ein keimbildungs-unabhängiger alternativer *off-pathway* Assemblierungsweg: Filamente assemblieren nicht direkt zu Fibrillen und können auch nicht als *Seed* für lösliches NM agieren. Die indirekte Bildung amyloider Fibrillen durch Dissoziation von Filamenten kann allerdings nicht ausgeschlossen werden. NM^{R2E2} neigt weniger zur Filamentbildung als NM^{wt}, formt dafür schneller und mehr Fibrillen, während NM^{AR2-5} eine höhere Tendenz zur Filamentassemblierung aufweist. Auch äußere Faktoren können die Assemblierungswege beeinflussen: durch die Zugabe von *Seeds* wird die Fibrillen-assemblierung, in Anwesenheit von Osmolyten oder nach Inkubation bei 60 °C die Filamentassemblierung bevorzugt (grau).

Die nicht-amyloidenen Filamente werden vermutlich auf einem alternativen Assemblierungsweg neben amyloiden Fibrillen gebildet (Abbildung 4-1B). Die Filamentassemblierung ist keimbildungsunabhängig: ihre Bildung kann nicht durch Zugabe von vorgeformten Filamenten beschleunigt werden. Da die Filamente nicht direkt zu amyloiden Fibrillen umgewandelt werden und auch nicht als *Seed* agieren, handelt es sich bei den Filamenten um eine alternative *off-pathway* Form von NM. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass Filamente nach Dissoziation zu löslichem Protein erneut an der Fibrillenbildung beteiligt sein können.

Die Wahl des Assemblierungsweges hängt wahrscheinlich von kinetischen Parametern ab. Durch Erweiterung der Oligopeptidregion bei der Mutante NM^{R2E2} wird die Keimbildung, und somit die Fibrillen-assemblierung beschleunigt, und es können, im Vergleich zu NM^{wt}, mehr Fibrillen jedoch keine Filamente detektiert werden. Die Deletionsmutante NM^{AR2-5}, mit stark verlangsamter Keimbildungsrate, assembliert hauptsächlich zu Filamenten. Auch experimentelle Bedingungen können die Assemblierungswege beeinflussen: die Zugabe von *Seeds* führt zur Beschleunigung der Fibrillen- und zur Verhinderung der Filamentbildung,

während in Anwesenheit von Osmolyten oder nach längerer Inkubation bei erhöhten Temperaturen bevorzugt Filamente gebildet werden.

Oligomere *on-* und *off-pathway* Assemblierungsformen in unterschiedlichen Größen und Morphologien werden für verschiedene amyloidogene Proteine beschrieben. Die Fähigkeit dieser Proteine verschiedene Assemblierungsformen anzunehmen, spiegelt die Komplexität ihrer Faltung und Assemblierung wider. Die nicht-amyloidogene filamentäre Form von NM ist vermutlich ein alternativer kinetisch stabiler Assemblierungszustand, der unter bestimmten Bedingungen angenommen wird. Ob das Auftreten alternativer NM-Formen auch *in vivo* bei der Ausbildung des Prionphänotyps eine Rolle spielt, bleibt zu klären.

4.4 Untersuchung des Einflusses zweiwertiger Metallionen auf Sup35p-NM

4.4.1 Bindung von Metallionen an Sup35p-NM

Die Bindung von zweiwertigen Metallionen (M^{2+}) spielt für die Aktivität und Stabilität vieler Proteine eine große Rolle. Die Komplexierung von M^{2+} erfolgt meist durch die Aminosäuren Histidin und Cystein. Negativ geladene Aminosäuren oder kurzkettige Glycine in der Umgebung können die Bindung erleichtern. Zudem sind Wassermoleküle oft an der Metallkoordination beteiligt (Harding, 2004; Koch *et al.*, 1997; Regan, 1995).

Histidin ist nicht nur bei PrP (Millhauser, 2007), sondern auch bei anderen amyloiden Proteinen an der Komplexierung von M^{2+} beteiligt. Das Alzheimer Peptid A β z. B. bindet Cu^{2+} und Zn^{2+} über drei Histidine und die terminale Aminogruppe (Danielsson *et al.*, 2007; Syme *et al.*, 2004). Auch eine Interpeptid-Komplexierung unter Beteiligung von zwei A β -Molekülen wird beschrieben (Stellato *et al.*, 2006). Für α -Synuclein der Parkinson Krankheit und das amyloide Modellprotein Acylphosphatase wird allerdings eine Histidin unabhängige Cu^{2+} -Bindung beobachtet: Regionen mit negativ geladenen Aminosäuren scheinen hier für die Komplexierung verantwortlich zu sein (Capanni *et al.*, 2004; Sung *et al.*, 2006).

Obwohl für NM bisher keine Metallbindestellen bekannt sind, kann die Komplexierung der zweiwertigen Metallionen Cu^{2+} , Mn^{2+} und Zn^{2+} mit verschiedenen Methoden festgestellt werden.

Elektronenspinresonanz (EPR) ist eine häufig verwendete Methode, um die Bindung von Cu^{2+} an Proteine zu charakterisieren. Mit ihr kann die Komplexierung von Cu^{2+} sowohl von löslichem als auch von fibrillärem NM detektiert werden. Mittels Ultraschall-Resonator-

Technologie (URT) wurden die Bindungseigenschaften weiter untersucht. Für Cu^{2+} , Mn^{2+} und Zn^{2+} können Bindekonstanten im niederen mikromolaren Bereich bestimmt werden. Eine Bindung von Cu^{2+} mit ähnlichen Bindekonstanten wird auch für PrP beschrieben (Hornshaw *et al.*, 1995; Kramer *et al.*, 2001; Walter *et al.*, 2006). Jedoch kann zusätzlich eine höher affine Bindung im nanomolaren Bereich für PrP detektiert werden (Walter *et al.*, 2006; Whittal *et al.*, 2000). Für die Messung der Bindekonstante stellt die Tatsache, dass M^{2+} auch unspezifisch an das Polypeptidrückgrat binden (Lowry *et al.*, 1951), möglicherweise ein Problem dar, da die spezifische Bindung vermutlich durch Signale der unspezifischen überlagert wird. Auch durch die schnelle Oligomerisierung und Assemblierung von NM während der Messung, ist eine exakte Bestimmung der Bindekonstanten schwierig.

Die durch URT bestimmte spezifische Kupferbindekonstante kann durch Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC), eine im Gegensatz zu URT gut etablierte Methode zur Messung der Ligandenbindung, bestätigt werden.

Die Interaktion von Cu^{2+} mit Proteinen kann auch mittels VIS-CD beobachtet werden. Die Zugabe von Cu^{2+} zu NM führte zu einer Erhöhung des Signals bei 480 nm. Durch die Intensitätsänderung des CD-Signals nach Cu^{2+} -Zugabe kann für PrP die Bindekonstante bestimmt werden (Garnett & Viles, 2003). Dies ist für NM nicht möglich, da keine Änderung der Signalintensität detektiert werden kann. Die gewählten Cu^{2+} -Konzentrationen sind wahrscheinlich zu hoch, so dass die CD-aktive Bindestelle schon bei der kleinsten eingesetzten Konzentration gesättigt ist, und eine weitere Zugabe von Cu^{2+} nur zu einer unspezifischen und vermutlich CD-inaktiven Bindung führt.

4.4.2 Einfluss von Metallionen auf die Assemblierungseigenschaften von Sup35p-NM

Der Einfluss von M^{2+} auf die Bildung amyloider Fibrillen *in vitro* ist kaum untersucht. Die Charakterisierung der Fibrillenassemblierung unter physiologischen Bedingungen ist bei den meisten Amyloiden schwierig, da sie im Gegensatz zu NM nicht spontan Fibrillen bilden. Capanni *et al.* (2004) beschreiben eine Erhöhung der Aggregationsrate der Acylphosphatase in Anwesenheit von Cu^{2+} (gemessen mit ThT), können aber mikroskopisch nur amorphe und keine fibrillären Aggregate detektieren. Bei PrP wird in Anwesenheit von Cu^{2+} , Al^{3+} , Mn^{2+} oder Zn^{2+} durch ANS-Bindung eine Verzögerung der Aggregation beobachtet. Aber erst durch die zusätzliche Inkubation bei 37 °C sind auch mikroskopisch nicht nur amorphe Aggregate, sondern auch Fibrillen zu erkennen (Ricchelli *et al.*, 2006). Andererseits wird für Cu^{2+} auch eine Hemmung der Aggregation von PrP und stattdessen die Induktion der

Aggregation durch Mn^{2+} beobachtet (Levin *et al.*, 2005).

Da die Fibrillenbildung von NM gut charakterisiert ist, kann es als Modellprotein verwendet werden, um den Einfluss von M^{2+} sowohl auf die Keimbildung als auch auf das Wachstum amyloider Fibrillen zu untersuchen. Während Mn^{2+} das Assemblierungsverhalten von NM nicht beeinflusst, führt die Anwesenheit von Cu^{2+} zu einer verlängerten Keimbildungsphase und bei hohen Cu^{2+} Konzentrationen zur Ausbildung amorpher Aggregate. Vermutlich wird durch die Bindung von Cu^{2+} die partielle Faltung von löslichem NM geändert, was die Keimbildungsfähigkeit verringert oder durch amorphe Aggregation das Protein der Keimbildungsreaktion entzieht. In Anwesenheit von Zn^{2+} wird, ähnlich wie bei A β (Dong *et al.*, 2006), die Fibrillenbildung von NM beschleunigt. Durch die Bindung von Zn^{2+} könnte NM eine Konformation annehmen, die die Keimbildung beschleunigt und nicht zu amorpher Aggregation neigt. Die Metallbindung an für die Assemblierung benötigten Protein-Protein-Kontaktstellen könnte darüber hinaus die Fibrillenbildung beeinflussen.

Der Einfluss von M^{2+} auf das Fibrillenwachstum amyloider Proteine, d. h. in Anwesenheit von *Seeds*, wurde bisher noch nicht gezielt untersucht. Bei NM kann allerdings kein Effekt von M^{2+} auf das Fibrillenwachstum beobachtet werden.

In Anwesenheit von Cu^{2+} bilden sich vermehrt amorphe Aggregate, die jedoch nicht stabil sind. Liegt unmittelbar nach Rückfaltung das meiste NM amorph aggregiert vor, nimmt die Menge dieser Aggregate während der Fibrillenbildungsreaktion ab. Nach Fibrillenbildung durch *Seeding* sind kaum noch amorphe Aggregate vorhanden. Auch rasterkraftmikroskopisch können amorphe Aggregate nicht reproduzierbar detektiert werden. Das Auftreten von instabilen Aggregaten wird auch für A β , Lysozym und β_2 -Microglobulin beschrieben (Huang *et al.*, 2000; Kad *et al.*, 2003; Meersman & Heremans, 2003).

Abbildung 4-2 stellt die beschriebenen Effekte von M^{2+} auf das Assemblierungsverhalten von NM zusammenfassend dar. Während in geseedeten Reaktionen kein Einfluss von M^{2+} beobachtet werden kann, kommt es in Abwesenheit von *Seeds* durch die Zugabe von Zn^{2+} und Cu^{2+} zu einer geänderten Assemblierung.

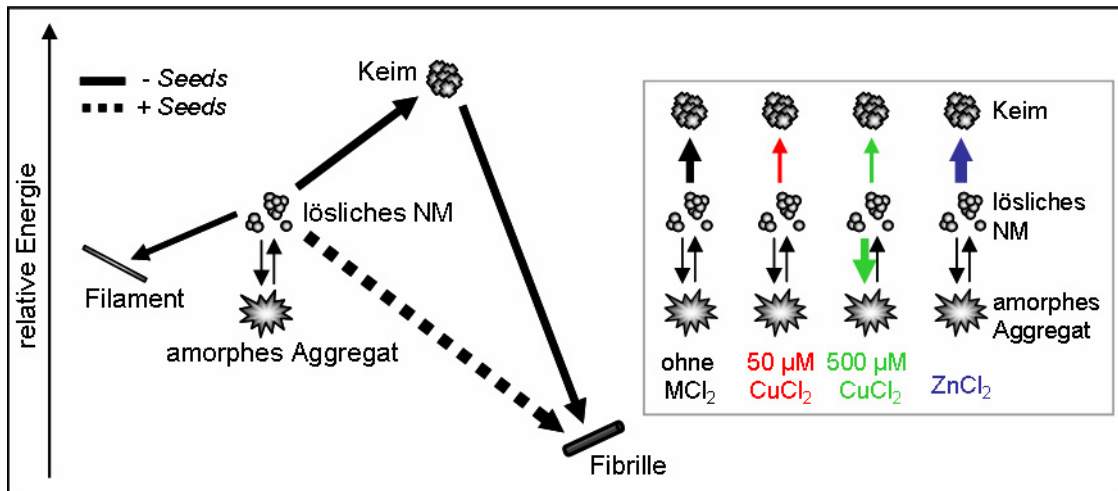


Abbildung 4-2 Einfluss von M^{2+} auf das Assemblierungsverhalten von NM. In ungeseedeten Reaktionen (durchgezogenen Linien) assembliert NM über die Ausbildung von Keimen zu thermodynamisch stabilen amyloiden Fibrillen. Alternativ dazu bildet NM nicht-amyloide Filamente oder amorphe Aggregate, die relativ instabil sind. Das amorph aggregierte NM kann (vermutlich nach Dissoziation) wieder zu Fibrillen assemblieren. In geseedeten Reaktionen (gestrichelte Linie) werden nur amyloide Fibrillen gebildet. Der Einfluss von M^{2+} ist rechts dargestellt. Die Breite der Pfeile bezieht sich auf die Geschwindigkeit der Reaktionen: je dünner ein Pfeil, desto langsamer die Reaktion.

Die unterschiedlichen Effekte von M^{2+} auf NM könnten auf die verschiedenen Eigenschaften der Metallionen zurückzuführen sein. Mn^{2+} , Cu^{2+} und Zn^{2+} unterscheiden sich u. a. in der Ionengröße, der Elektronenaffinität, den bevorzugten Liganden, der Bindungsgeometrie und ihrer Redoxaktivität (Tabelle 4-1).

	Radius (Å)	Elektronenaffinität (eV)	Bevorzugte Liganden	Bevorzugte Bindungsgeometrie	Redoxaktivität
Mn^{2+}	0,78	16	Carboxylgruppen, Stickstoff enthaltende Gruppen	oktaedrisch > andere	+
Cu^{2+}	0,65	20	Aminogruppen, Thiolgruppen	linear, trigonal, tetraedrisch	+
Zn^{2+}	0,65	18	Aminogruppen, Thiolgruppen, Carboxylgruppen	tetraedrisch > octaedrisch > 5-fach koordiniert	-

Tabelle 4-1 Eigenschaften von Mn^{2+} , Cu^{2+} und Zn^{2+} (nach Frausto da Silva & Williams, 2001).

Die Eigenschaften der Metallionen und die Position der Metallbindestelle im Protein sind vermutlich mitverantwortlich für das Assemblierungsverhalten amyloider Proteine. Bei A β führt die Bindung von Cu^{2+} oder Zn^{2+} zur Aggregation, die Bindestellen befinden sich allerdings außerhalb der Region, welche die β -Faltblatt-Struktur bildet (Dong *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2000; Mastrangelo *et al.*, 2006; Syme *et al.*, 2004). Bei PrP könnte die Bindung von Cu^{2+} an verschiedene Bindestellen im Protein (Oligopeptidregion, His 96, His 111), die

unterschiedlich stark in die Amyloidbildung involviert sind (Jones *et al.*, 2004), die verschiedenen beschriebenen Effekte erklären. Die Destabilisierung der nativen Form durch Komplexierung von Cu^{2+} wird für die *de novo* Fibrillenbildung bei β_2 -Microglobulin verantwortlich gemacht (Eakin *et al.*, 2002).

Da bei NM der Einfluss von M^{2+} auf die Assemblierung nur in ungesedeten Reaktionen beobachtet wird, ist hier scheinbar nur die Beeinflussung der Keimbildungsphase ausschlaggebend für ein geändertes Assemblierungsverhalten.

4.4.3 Mögliche Bindestellen für Metallionen an Sup35p-NM

Da die Oligopeptidwiederholungen von NM weder Histidine noch negativ geladene Aminosäuren enthalten, ist die detektierte Bindung von M^{2+} in dieser Region unwahrscheinlich (Box 4-1). Möglicherweise findet die Bindung an das in der Mittelregion enthaltene Histidin unter Beteiligung des stark negativ geladenen Bereichs am carboxyterminalen Ende von NM statt. Eine Komplexierung in dieser unstrukturierten und nicht an der Ausbildung der Fibrillen beteiligten Region von NM würde auch die detektierte Bindung von Cu^{2+} an bereits assemblierte Fibrillen erklären.

MSDSNQGNNQ	QNYQQYSQNG	NQQQGNNRYQ	GYQAYNAQAQ	<u>PAGGYYQNYQ</u>
<u>GYSGYQQGGY</u>	<u>QQYNPDAGYQ</u>	<u>QQYNPQGGYQ</u>	<u>QYNPQGGYQQ</u>	<u>QFN PQGGRGN</u>
YKNFNYNL	QGYQAGFQPQ	SQGMSLNDFQ	KQQKQAAPKP	KKTLKLVSSS
GIKLANATKK	VGTKPAESDK	KEEEKSAETK	EPTKEPTKVE	EPVKKEEKPV
QTEEKTEEKS	ELPKVEDLKI	SESTHNTNNA	NVTSADALIK	EQEEEV DDEV
VND				

Box 4-1 Aminosäuresequenz von NM. Positiv geladene Aminosäuren sind grün, negativ geladene Aminosäuren blau und Histidin rot markiert. Die Oligopeptidwiederholungen sind unterstrichen und das den aminoterminalen Bereich N von der Mittelregion M trennende Methionin fett dargestellt.

Dass die Fibrillenbildung von NM in Anwesenheit von M^{2+} möglich ist und die Geschwindigkeit des Fibrillenwachstums nicht beeinflusst wird, spricht zusätzlich für eine Komplexierung von M^{2+} in dem nicht direkt an der Assemblierung beteiligten Bereich der Mittelregion M von NM. Auch die Stabilität des dicht gepackten β -Faltblatt-reichen Grundgerüsts der Fibrillen ist durch M^{2+} nicht gestört. Dies spiegelt sich in der unveränderten Resistenz der Fibrillen gegenüber der Denaturierung mit SDS wider. Die charakteristische

Proteaseresistenz der Fibrillen wird jedoch von M^{2+} beeinflusst. Die sich nur in M befindenden Schnittstellen der Protease V8 sind wahrscheinlich durch partielle Konformationsänderungen nach Komplexierung von M^{2+} besser zugänglich. Die Zugänglichkeit der in N gelegenen Schnittstellen der Protease Chymotrypsin wird von Mn^{2+} und Zn^{2+} nicht beeinflusst. In Anwesenheit von Cu^{2+} zeigen Fibrillen eine erhöhte Chymotrypsinresistenz. Möglicherweise sind die Schnittstellen durch eine nach Cu^{2+} -Bindung kompaktere Faltung von M an der Außenseite der Fibrillen schlechter zugänglich. Für eine kompaktere Struktur in Anwesenheit von Cu^{2+} spricht auch die mittels AFM detektierte Höhe der Fibrillen. Fibrillen, die in Anwesenheit von Cu^{2+} assemblierten, besitzen einen geringeren Durchmesser als Fibrillen, die ohne M^{2+} oder in Anwesenheit von Mn^{2+} bzw. Zn^{2+} gebildet wurden.

Eine Komplexierung von M^{2+} durch intermolekulare Wechselwirkungen verschiedener NM-Moleküle kann ausgeschlossen werden, da nach Zugabe von M^{2+} keine Abnahme der Konzentration von monomerem NM beobachtet wird. Auch auf die Bildung von nicht-amyloiden Filamenten oder anderer Oligomere kann kein Einfluss von M^{2+} detektiert werden. Für die Filamentassemblierung oder Oligomerisierung ist wahrscheinlich nur N verantwortlich, und wird nicht von in M komplexierten M^{2+} beeinträchtigt. M wird dagegen aufgrund seiner hohen Ladungsdichte für die Löslichkeit von NM benötigt. Wird die Ladungsverteilung gestört könnte dies zu vermehrter Aggregation führen. Das Auftreten amorpher Aggregate kann vor allem in Anwesenheit von $500 \mu M CuCl_2$ detektiert werden. Bei dieser hohen Cu^{2+} -Konzentration handelt es sich vermutlich nicht nur um einen Effekt durch spezifische Bindung in M, sondern auch durch unspezifische Bindung an das Polypeptidrückgrat.

Die Bedeutung der im Rahmen dieser Arbeit detektierten Einflüsse zweiwertiger Metallionen für andere amyloide Proteine bleibt zu klären. Es scheint jedoch für den Effekt auf die Amyloidbildung wichtig zu sein, welche intrinsischen Eigenschaften das untersuchte M^{2+} aufweist und in welchem Bereich des Proteins die Metallbindung stattfindet.

Zusammenfassung

Prionen sind eine Klasse von Proteinen, die sowohl in einer löslichen aktiven als auch in einer aggregierten inaktiven Konformation vorliegen können. Die inaktive Form kann sich in einer selbst-replizierenden Weise vermehren, indem sie ihre Struktur auf die des aktiven Proteins überträgt. Während Prionen bei Säugetieren für eine Reihe von Krankheiten verantwortlich sind, werden nicht-pathogene Prionproteine von Hefen genutzt, um bestimmte Eigenschaften epigenetisch auf nicht-Mendelschem Weg auf Tochterzellen zu übertragen. Der Translationsterminationsfaktor Sup35p von *S. cerevisiae* ist das wohl am besten charakterisierte Hefepriion. Sup35p verliert in seiner Prionform seine Aktivität und ist für die Ausbildung des Prionphänotyps [PSI⁺] *in vivo* verantwortlich. *In vitro* bildet Sup35p Fibrillen mit amyloiden Eigenschaften. Durch Gemeinsamkeiten mit Säugerprionen und anderen amyloidogenen Proteinen und durch seine Nichtpathogenität stellt Sup35p ein attraktives Modellsystem, sowohl zur Erforschung der Prionbiologie *in vivo*, als auch zur Charakterisierung von Amyloiden *in vitro* dar.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Priondomäne NM von Sup35p *in vitro* nicht nur amyloide Fibrillen bildet, sondern alternativ dazu in einer filamentären Form vorliegt, die sich sowohl morphologisch, als auch bezüglich ihrer Stabilität und Sekundärstruktur von den Fibrillen unterscheidet. Diese „Filamente“ können nicht direkt zu amyloiden Fibrillen umgewandelt werden, und sie agieren nicht als *Seed* für die Fibrillenassemblierung. Da sie zudem nicht durch Bindung der amyloid-spezifischen Farbstoffe Kongo Rot und Thioflavin T nachgewiesen werden können, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Filamenten nicht um Protofibrillen, sondern um eine kinetisch stabile nicht-amyloide Form von NM handelt, die auf einem alternativen Weg gebildet wird. Die Wahl des Assemblierungsweges hängt dabei von kinetischen Parametern ab. Unter Bedingungen, die die Assemblierung von Fibrillen beschleunigen, konnten keine, oder nur wenige Filamente detektiert werden.

Als gut charakterisiertes amyloides Modellprotein wurde NM dazu genutzt, den Einfluss zweiwertiger Metallionen (M^{2+}) auf die Amyloidentstehung, der seit einiger Zeit für viele amyloide Proteine kontrovers diskutiert wird, genauer zu untersuchen. Obwohl NM keine bekannten Metallbindemotive besitzt, konnte die Bindung von Cu^{2+} , Mn^{2+} und Zn^{2+} mit einer Affinität im niederen mikromolaren Bereich detektiert werden. Die Komplexbildung findet vermutlich in der nicht direkt an der Fibrillenbildung beteiligten Mittelregion von NM statt. Weder die Sekundärstruktur noch die chemische Stabilität der Fibrillen wurde von M^{2+} beeinflusst. Auch die Geschwindigkeit des Fibrillenwachstums wurde in Anwesenheit von

M^{2+} nicht geändert. Es wurde allerdings ein Effekt auf die Keimbildung zu Beginn der Fibrillenassamblierung beobachtet. Der Zusatz von Zn^{2+} beschleunigte diese Reaktion, während Cu^{2+} die Keimbildungsphase verlängerte, vermutlich durch vermehrtes Auftreten amorpher, instabiler, Aggregate.

Darüber hinaus wurden NM-Fibrillen als Modell-Amyloid strukturell mit morphologisch ähnlichen Fibrillen des synthetischen Spinnenseidenproteins eADF-4(C16) verglichen. Mittels Farbstoffbindung, CD- und FTIR-Spektroskopie und Röntgenbeugungsanalysen wurde festgestellt, dass sich eADF-4(C16)-Fibrillen in ihren amyloiden Eigenschaften kaum von NM-Fibrillen unterscheiden. Nur FTIR- und Röntgenbeugungsmessungen zeigten minimale strukturelle Unterschiede, die auf die verschiedene Aminosäurezusammensetzung der beiden Proteine, vor allem auf die Spinnenseiden typischen Polyalaninmotive zurückgeführt werden können.

Die Erweiterung einer natürlich vorkommenden Polyalaninsequenz führt auch bei PABPN1, einem amyloidogenen Protein, das an der Entstehung der okulopharyngealen Muskeldystrophie beteiligt ist, zu morphologischen Unterschieden zwischen Fibrillen des Wildtyp-Proteins und der krankheitsassoziierten Polyalaninmutante, die im Rahmen dieser Arbeit erstmals rasterkraftmikroskopisch beobachtet und charakterisiert wurden.

Literatur

Anfinsen CB (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223-230

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

Arrondo JL & Goni FM (1999) Structure and dynamics of membrane proteins as studied by infrared spectroscopy. *Prog Biophys Mol Biol* **72**, 367-405

Atkins PW (1990) Physikalische Chemie. *VHC*, Weinheim, Deutschland

Baskakov IV, Legname G, Baldwin MA, Prusiner SB & Cohen FE (2002) Pathway complexity of prion protein assembly into amyloid. *J Biol Chem* **277**, 21140-21148

Binning G, Quate F & Gerber C (1986) Atomic Force Microscope. *Phys Rev Lett* **56**, 930-933

Bocharova OV, Breydo L, Salnikov VV & Baskakov IV (2005) Copper(II) inhibits in vitro conversion of prion protein into amyloid fibrils. *Biochemistry* **44**, 6776-6787

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254

Brown DR & Kozlowski H (2004) Biological inorganic and bioinorganic chemistry of neurodegeneration based on prion and Alzheimer diseases. *Dalton Trans* **13**, 1907-1917

Brown DR (1998) Prion protein-overexpressing cells show altered response to a neurotoxic prion protein peptide. *J Neurosci Res* **54**, 331-340

Brown DR, Hafiz F, Glasssmith LL, Wong BS, Jones IM, Clive C & Haswell SJ (2000) Consequences of manganese replacement of copper for prion protein function and proteinase resistance. *EMBO J* **19**, 1180-1186

Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, Fraser PE, Kruck T, von Bohlen A, Schulz-Schaeffer W, Giese A, Westaway D & Kretzschmar H (1997) The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* **390**, 684-687

Burns CS, Aronoff-Spencer E, Dunham CM, Lario P, Avdievich NI, Antholine WE, Olmstead MM, Vrielink A, Gerfen GJ, Peisach J, Scott WG & 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

Cantor CR & Schimmel PR (1980) Biophysical Chemistry. *Freeman & Co*, San Francisco, USA

- Capanni C, Taddei N, Gabrielli S, Messori L, Orioli P, Chiti F, Stefani M & Ramponi G (2004) Investigation of the effects of copper ions on protein aggregation using a model system. *Cell Mol Life Sci* **61**, 982-991
- Caughey B & Lansbury PT Jr (2003) Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: Separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci* **26**, 267-298
- Cerpa W, Valera-Nallar L, Reyes AE, Minniti AN & Inestrosa NC (2005) Is there a role for copper in neurodegenerative diseases? *Molecular Aspects of Medicine* **26**, 405-420
- Chalikian TV, Sarvazyan AP, Funck T, Cain CA & Breslauer KJ (1994) Partial Molar Characteristics of Glycine and Alanine in Aqueous Solutions at High Pressures Calculated from Ultrasonic Velocity Data. *J Phys Chem* **98**, 321-328
- Chan JCC, Oyler NA, Yau WM & Tycko R (2005) Parallel beta-sheets and polar zippers in amyloid fibrils formed by residues 10-39 of the yeast prion protein Ure2p. *Biochemistry* **44**, 10669-10680
- Chattopadhyay M, Walter ED, Newell DJ, Jackson PJ, Aronoff-Spencer E, Peisach J, Gerfen GJ, Bennett B, Antholine WE & Millhauser GL (2005) The octarepeat domain of the prion protein binds Cu(II) with three distinct coordination modes at pH 7.4. *J Am Chem Soc* **127**, 12647-12656.
- Chernoff YO, Lindquist SL, Ono B, Inge-Vechtomov SG & Liebman SW (1995) Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [*psi*⁺]. *Science* **268**, 880-884
- Chiti F & Dobson CM (2006) Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annu Rev Biochem* **75**, 333-366
- Colfen H & Antonietti M (2000) Field-flow fractionation techniques for polymer and colloid analysis. *New Developments in Polymer Analytics I* **150**, 67-187
- Collins SR, Douglas A, Vale RD & Weissman JS (2004) Mechanism of prion propagation: amyloid growth occurs by monomer addition. *PLoS Biol* **2**, e321
- Cox BS (1965) [*PSI*], a cytoplasmic suppressor of super-suppressors in yeast. *Heredity* **20**, 505-521
- Daniels M & Brown DR (2002) Purification and preparation of prion protein: synaptic superoxide dismutase. *Methods Enzymol* **349**, 258-267
- Danielsson J, Pierattelli R, Banci L & Graslund A (2007) High-resolution NMR studies of the zinc-binding site of the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *FEBS J* **274**, 46-59
- Dobson CM (2004) Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Semin Cell Dev Biol* **15**, 3-16
- Dong J, Shokes JE, Scott RA & Lynn DG (2006) Modulating amyloid self-assembly and fibril morphology with Zn(II). *J Am Chem Soc* **128**, 3540-3542

Donne DG, Viles JH, Groth D, Mehlhorn I, James TL, Cohen FE, Prusiner SB, Wright PE & Dyson HJ (1997) Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**,13452-13457

Eakin CM, Knight JD, Morgan CJ, Gelfand MA & Miranker AD (2002) Formation of a copper specific binding site in non-native states of beta-2-microglobulin. *Biochemistry* **41**, 10646-10656

Everett CM & Wood NW (2004) Trinucleotide repeats and neurodegenerative disease. *Brain* **127**, 2385-2405

Fairbanks G, Steck TL & Wallach DF (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10**, 2606-2617

Flechsig E, Shmerling D, Hegyi I, Raeber AJ, Fischer M, Cozzio A, von Mering C, Aguzzi A & Weissmann C (2000) Prion protein devoid of the octapeptide repeat region restores susceptibility to scrapie in PrP knockout mice. *Neuron* **27**, 399-408

Fling SP & Gregerson DS (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem* **155**, 83-88

Fowler DM, Koulov AV, Alory-Jost C, Marks MS, Balch WE & Kelly JW (2006) Functional Amyloid Formation within Mammalian Tissue. *PLoS Biol* **4**, e6

Fowler DM, Koulov AV, Balch WE & Kelly JW (2007) Functional amyloid – from bacteria to humans. *Trends Biochem Sci* **32**, 217-224

Frausto da Silva JJR & Williams RJP (2001) The Biological Chemistry of the Elements. 2. Auflage, *Oxford University Press*, Oxford, UK

Gaeta A & Hider RC (2005) The crucial role of metal ions in neurodegeneration: the basis for a promising therapeutic strategy. *Br J Pharmacol* **146**, 1041-1059

Garnett AP & Viles JH (2003) Copper binding to the octarepeats of the prion protein. Affinity, specificity, folding, and cooperativity: insights from circular dichroism. *J Biol Chem* **278**, 6795-6802

Giese A, Levin J, Bertsch U & Kretzschmar H (2004) Effect of metal ions on de novo aggregation of full-length prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* **320**, 1240-1246

Gill SC & von Hippel PH (1989) Calculation of Protein Extinction Coefficients from Amino-Acid Sequence Data. *Analytical Biochemistry* **182**, 319-326

Glover JR, Kowal AS, Schirmer EC, Patino MM, Liu JJ & Lindquist S (1997) Self-seeded fibers formed by Sup35, the protein determinant of [PSI⁺], a heritable prionlike factor of *S. cerevisiae*. *Cell* **89**, 811-819

Gosal WS, Morten IJ, Hewitt EW, Smith DA, Thomson NH & Radford, SE (2005) Competing pathways determine fibril morphology in the self-assembly of beta2-microglobulin into amyloid. *J Mol Biol* **351**, 850-864

- Gosline JM, Guerette PA, Ortlepp CS & Savage KN (1999) The mechanical design of spider silks: from fibroin sequence to mechanical function. *J Exp Biol* **202**, 3295-3303
- Govaerts C, Wille H, Prusiner SB & Cohen FE (2004) Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 8342-8347
- Griffith JS (1967) Self-replication and scrapie. *Nature* **215**, 1043-1044
- Guijarro JI, Sunde M, Jones JA, Campbell ID & Dobson CM (1998) Amyloid fibril formation by an SH3 domain. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 4224-4228
- Harding MM (2004) The architecture of metal coordination groups in proteins. *Acta Cryst D* **60**, 849-859
- Harper JD & Lansbury PT Jr (1997) Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu Rev Biochem* **66**, 385-407
- Harper JD, Wong SS, Lieber CM & Lansbury PT (1997) Observation of metastable A β amyloid protofibrils by atomic force microscopy. *Chem Biol* **4**, 119-125
- Hess S (2003) Diplomarbeit, Lehrstuhl für Biotechnologie, TU München
- Heukeshoven J & Dernick R (1988) Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* **9**, 28-32
- Hornshaw MP, McDermott JR & Candy JM (1995) Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* **207**, 621-629
- Huang TH, Yang DS, Fraser PE & Chakrabartty A (2000) Alternate aggregation pathways of the Alzheimer beta-amyloid peptide. An in vitro model of preamyloid. *J Biol Chem* **275**, 36436-36440
- Huemmerich D, Helsen C, Quedzuweit S, Oschmann J, Rudolph R & Scheibel T (2004) Primary Structure Element of Spider Dragline Silks and Their Contribution to Protein Solubility. *Biochemistry* **43**, 13604-13612
- Hutter G, Heppner FL & Aguzzi A (2003) No superoxide dismutase activity of cellular prion protein in vivo. *Biol Chem* **384**, 1279-1285
- Jahn TR & Radford SE (2005) The Yin and Yang of protein folding. *FEBS J* **272**, 5962-5970
- Jones CE, Abdelraheim SR, Brown DR & Viles JH. (2004) Preferential Cu²⁺ coordination by His96 and His111 induces beta-sheet formation in the unstructured amyloidogenic region of the prion protein. *J Biol Chem* **279**, 32018-32027
- Jones CE, Klewpatinond M, Abdelraheim SR, Brown DR & Viles JH (2005a) Probing copper²⁺ binding to the prion protein using diamagnetic nickel²⁺ and ¹H NMR: the unstructured N terminus facilitates the coordination of six copper²⁺ ions at physiological concentrations. *J Mol Biol* **346**, 1393-1407

- Jones S, Batchelor M, Bhelt D, Clark AR, Collinge J & Jackson GS (2005b) Recombinant prion protein does not possess SOD-1 activity. *Biochem J* **392**, 309-312
- Kad NM, Myers SL, Smith DP, Smith DA, Radford SE & Thomson NH (2003) Hierarchical assembly of beta2-microglobulin amyloid in vitro revealed by atomic force microscopy. *J Mol Biol* **330**, 785-797
- Kayed R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW & Glabe CG (2003) Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* **300**, 486-489
- Kenney JM, Knight D, Wise MJ & Vollrath F (2002) Amyloidogenic nature of spider silk. *Eur J Biochem* **269**, 4159-4163
- Kheterpal I, Chen M, Cook KD & Wetzel R (2006) Structural differences in A β amyloid protofibrils and fibrils mapped by hydrogen exchange – mass spectrometry with online proteolytic fragmentation. *J Mol Biol* **361**, 785-795
- Kim NH, Choi JK, Jeong BH, Kim JI, Kwon MS, Carp RI & Kim YS (2005) Effect of transition metals (Mn, Cu, Fe) and deoxycholic acid (DA) on the conversion of PrPC to PrPres. *FASEB J* **19**, 783-785
- Klewpatinond M & Viles JH (2007) Empirical rules for rationalising visible circular dichroism of Cu²⁺ and Ni²⁺ histidine complexes: Applications to the prion protein. *FEBS Letters* **581**, 1430-1434
- Klunk WE, Pettegrew JW & Abraham DJ (1989) Quantitative Evaluation of Congo Red Binding to Amyloid-like Proteins with a Beta-pleated Sheet Conformation. *J Histochem Cytochem* **37**, 1273-1281
- Koch KA, Pena MMO & Thiele DJ (1997) Copper-binding motifs in catalysis, transport, detoxification and signalling. *Chemistry & Biology* **4**, 549-560
- Kodali R & Wetzel R (2007) Polymorphism in the intermediates and products of amyloid assembly. *Curr Opin Struct Biol* **17**, 1-10
- Kramer ML, Kratzin HD, Schmidt B, Romer A, Windl O, Liemann S, Hornemann S & Kretschmar H (2001) Prion protein binds copper within the physiological concentration range. *J Biol Chem* **276**, 16711-16719
- Krammer C, Suhre MH, Diemer C, Hess S, Schaetzel HM, Scheibel T & Vorberg I (2007) Fusion with yeast Sup35p-NM modulates cytosolic PrP aggregation in mammalian cells. *FASEB J*, akzeptiert zur Überarbeitung
- Krishnan R & Lindquist SL (2005) Structural insights into a yeast prion illuminate nucleation and strain diversity. *Nature* **435**, 765-772
- Krzewska J, Tanaka M, Burston SG & Melki R (2007) Biochemical and functional analysis of the assembly of full-length Sup35p and its prion-forming domain. *J Biol Chem* **282**, 1679-1686
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685

- Lashuel HA & Lansbury PT Jr (2006) Are amyloid diseases caused by protein aggregates that mimic bacterial pore-forming toxins? *Q Rev Biophys* **39**, 167-201
- Lee S & Eisenberg D (2003) Seeded conversion of recombinant prion protein to a disulfide-bonded oligomer by a reduction-oxidation process. *Nat Struct Biol* **10**, 725-730
- Levin J, Bertsch U, Kretschmar H & Giese A (2005) Single particle analysis of manganese-induced prion protein aggregates. *Biochem Biophys Res Commun* **329**, 1200-1207
- Liebman SW, Bagriantsev SN & Derkatch IL (2006) Biochemical and genetic methods for characterization of [PIN⁺] prions in yeast. *Methods* **39**, 23-34
- Liu JJ & Lindquist S (1999) Oligopeptide-repeat expansions modulate 'protein-only' inheritance in yeast. *Nature* **400**, 573-576
- Lodderstedt G, Hess S, Hause G, Scheuermann T, Scheibel T & Schwarz E (2007) Effect of aculopharyngeal muscular dystrophy-associated extension of seven alanines on the fibrillation properties of the N-terminal domain of PABPN1. *FEBS J* **274**, 346-355
- Lottspeich F & Zorbas HH (1998) Bioanalytik. 1. Auflage. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, Deutschland
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJ (1951) Protein measurements with the Folin reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275
- Manning M & Colon W (2004) Structural basis of protein kinetic stability: resistance to dodecyl sulfate suggests a central role for rigidity and a bias toward beta-sheet structure. *Biochemistry* **43**, 11248-11254
- Mastrangelo IA, Ahmed M, Sato T, Liu W, Wang C, Hough P & Smith SO (2006) High-resolution atomic force microscopy of soluble Abeta42 oligomers. *J Mol Biol* **358**, 106-119
- Meersman F & Heremans K (2003) Temperature-induced dissociation of protein aggregates: accessing the denatured state. *Biochemistry* **42**, 14234-14241
- Millhauser GL (2007) Copper and the Prion Protein: Methods, Structures, Function, and Disease. *Annu Rev Phys Chem* **58**, 299-320
- Moriyama H, Edskes HK & Wickner RB (2000) [URE3] prion propagation in *Saccharomyces cerevisiae*: requirement for chaperone Hsp104 and curing by overexpressed chaperone *Ydj1p*. *Mol Cell Biol* **20**, 8916-8922
- Nordstedt C, Naslund J, Tjernberg LO, Karlstrom AR, Thyberg J & Terenius L (1994). The Alzheimer a beta peptide develops protease resistance in association with its polymerization into fibrils. *J Biol Chem* **269**, 30773-30776
- O'Brien R, Ladbury JE & Chowdry BZ (2000) Isothermal titration calorimetry of biomolecules. In Harding SE & Chowdry BZ (Herausg.), Protein-Ligand interactions: hydrodynamics and calorimetry. *Oxford University Press*, Oxford, UK
- Orem NR, Geoghegan JC, Deleault NR, Kasczak R & Supattapone S (2006) Copper (II) ions potently inhibit purified PrPres amplification. *J Neurochem* **96**, 1409-1415

- Pace CN & Schmid FX (1997) How to determine the molar absorption coefficient of a protein. In Creighton TE (Herausg.), *Protein Structure: A Practical Approach*, 253-259. *IRL Press*, Oxford, UK
- Patchett ML, Neal TL, Schofield LR, Strange RC, Daniel RM & Morgan HW (1988) Heat treatment purification of thermostable cellulose and hemicellulase enzymes expressed in *E. coli*. *Enzyme Microb Technol* **11**, 113-115
- Prusiner SB (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**, 136-144
- Prusiner SB (1998) Prions. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 13363-13383
- Quaglio E, Chiesa R & Harris DA (2001) Copper converts the cellular prion protein into a protease-resistant species that is distinct from the scrapie isoform. *J Biol Chem* **276**, 11432-11438
- Rammensee S, Huemmerich D, Hermanson KD, Scheibel T & Bausch AR (2006) Rheological characterization of hydrogels formed by recombinantly produced spider silk. *Appl Phys A* **82**, 261-264
- Regan L (1995) Protein design: novel metal-binding sites. *Trends Biochem Sci* **20**, 280-285
- Ricchelli F, Buggio R, Drago D, Salmona M, Forloni G, Negro A, Tognon G & Zatta P (2006) Aggregation/fibrillogenesis of recombinant human prion protein and Gerstmann-Straussler-Scheinker disease peptides in the presence of metal ions. *Biochemistry* **45**, 6724-6732
- Ross ED, Edkes HK, Terry MJ & Wickner RB (2005) Primary sequence independence for prion formation. *Proc Acad Sci USA* **102**, 12825-12830
- Sambrook J & Russell D (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, USA
- Scheibel T (2004) Amyloid Formation of a Yeast Prion Determinant. *J Mol Neurisci* **23**, 13-22
- Scheibel T, Bloom J & Lindquist SL (2004) The elongation of yeast prion fibers involves separable steps of association and conversion. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 2287-2292
- Scheibel T & Buchner J (2006) Protein aggregation as a cause for disease. In Gaestel M (Herausg.), *Molecular chaperones in health and disease; Handbook of experimental pharmacology* 172, 199-219. *Springer Verlag*, Berlin/Heidelberg, Deutschland
- Scheibel T, Kowal AS, Bloom JD & Lindquist SL (2001) Bidirectional amyloid fiber growth for a yeast prion determinant. *Curr Biol* **11**, 366-369
- Scheibel T & Lindquist SL (2001) The role of conformational flexibility in prion propagation and maintenance for Sup35p. *Nat Struct Biol* **8**, 958-962
- Scheuermann T, Schulz B, Blume A, Wahle E, Rudolph R & Schwarz E (2003) Trinucleotide expansions leading to an extended poly-L-alanine segment in the poly (A) binding protein PABPN1 cause fibril formation. *Protein Science* **12**, 2685-2692

- Schmid FX (1997) Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes. In Creighton TE (Herausg.), *Protein structure: A practical approach*, 261-297. *IRL Press*, Oxford, UK
- Serio TR, Cashikar AG, Kowal AS, Sawicki GJ, Moslehi JJ, Serpell L, Arnsdorf MF & Lindquist SL (2000) Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant. *Science* **289**, 1317-1321
- Serpell L, Sunde M & Blake C (1997) The molecular basis for amyloidosis. *Cell Mol Life Sci* **53**, 871-887
- Serpell LC (2000) Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly. *Biochim Biophys Acta* **1502**, 16-30
- Shewmaker F, Wickner RB & Tycko R (2006) Amyloid of the prion domain of Sup35p has an in-register parallel β -sheet structure. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 19754-19759
- Shinchuk LM, Sharma D, Blondelle SE, Reixach N, Inouye H & Kirschner DA (2005) Poly-(L-alanine) expansions form core β -sheets that nucleate amyloid assembly. *Proteins* **61**, 579-589
- Shorter J & Lindquist S (2005) Prions as adaptive conduits of memory and inheritance. *Nature Reviews* **6**, 435-450
- Slota U, Hess S, Spiess K, Stromer T, Serpell L & Scheibel T (2007) Spider silk and amyloid fibrils: a structural comparison. *Macromol Biosci* **7**, 183-188
- Sondheimer N & Lindquist S (2000) Rnq1: an epigenetic modifier of protein function in yeast. *Mol Cell* **5**, 163-172
- Stellato F, Menestrina G, Serra MD, Potrich C, Tomazzolli R, Meyer-Klaucke W & Morante S (2006) Metal binding in amyloid beta-peptides shows intra- and inter-peptide coordination modes. *Eur Biophys J* **35**, 340-351
- Stockel J, Safar J, Wallace AC, Cohen FE & Prusiner SB (1998) Prion protein selectively binds copper(II) ions. *Biochemistry* **37**, 7185-7193
- Suhre MH (2003) Masterarbeit, Lehrstuhl für Biotechnologie, TU München
- Sunde M, Serpell L, Bartlam M, Fraser P, Pepys M & Blake C (1997) Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J Mol Biol* **273**, 729-739
- Sung YH, Rospigliosi C & Eliezer D (2006) NMR mapping of copper binding sites in alpha-synuclein. *Biochim Biophys Acta* **1764**, 5-12
- Syme CD, Nadal RC, Rigby SE & Viles JH (2004) Copper binding to the amyloid-beta (A β) peptide associated with Alzheimer's disease: folding, coordination geometry, pH dependence, stoichiometry, and affinity of A β (1-28): insights from a range of complementary spectroscopic techniques. *J Biol Chem* **279**, 18169-18177
- Tamm LK & Tatulian SA (1997) Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers. *Q Rev Biophys* **4**, 365-429

- Tanaka M, Chien P, Naber N, Cooke R & Weissman JS (2004) Conformational variations in an infectious protein determine prion stain differences. *Nature* **428**, 323-327
- Tanaka M, Collins SR, Toyama BH & Weissman JS (2006) The physical basis of how prion conformations determine strain phenotypes. *Nature* **442**, 585-589
- True HL & Lindquist SL (2000) A yeast prion provides a mechanism for genetic variation and phenotypic diversity. *Nature* **407**, 477-483
- Uptain SM & Lindquist S (2002) Prions as protein-based genetic elements. *Annu Rev Microbiol* **56**, 703-741
- Uversky VN & Fink AL (2004) Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. *Biochim Biophys Acta* **1698**, 131-153
- Vassar PS & Culling CFA (1959) Fluorescent stains with special reference to amyloid and connective tissues. *Arch Pathol* **68**, 487-494
- Vendrely C & Scheibel T (2006) Mammalian versus yeast prions – biochemical insights in structure and assembly mechanisms. In Douphet BV (Herausg.), Prions: New Research, 251-284. *Nova Publisher*, Hauppauge, NY, USA
- Viles JH, Cohen FE, Prusiner SB, Goodin DB, Wright PE & Dyson HJ (1999) Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 2042-2047
- Vollrath F & Knight DP (2001) Liquid crystalline spinning of spider silk. *Nature* **410**, 541-548
- Walsh DM, Lomakin A, Benedek GB, Condron MM & Teplow DB (1997) Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *J Biol Chem* **272**, 22364-22372
- Walter ED, Chattopadhyay M & Millhauser GL (2006) The affinity of copper binding to the prion protein octarepeat domain: evidence for negative cooperativity. *Biochemistry* **45**, 13083-13092
- Welker E, Raymond LD, Scheraga HA & Caughey B (2002) Intramolecular versus intermolecular disulfide bonds in prion proteins. *J Biol Chem* **277**, 3477-3481
- Wetzel R (2006) Kinetics and Thermodynamics of Amyloid Fibril Assembly. *Acc Chem Res* **39**, 671-679
- Whittal RM, Ball HL, Cohen FE, Burlingame AL, Prusiner SB & Baldwin MA (2000) Copper binding to octarepeat peptides of the prion protein monitored by mass spectrometry. *Protein Sci* **9**, 332-343
- Wickner RB (1994) [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **264**, 566-569
- Wopfner F, Weidenhofer G, Schneider R, von Brunn A, Gilch S, Schwarz TF, Werner T & Schatzl HM (1999) Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J Mol Biol* **289**, 1163-1178.

Xing Y & Higuchi K (2002) Amyloid fibril proteins. *Mech Ageing Dev* **123**, 1625-1636

Zahn R, Liu A, Luhrs T, Riek R, von Schroetter C, Lopez Garcia F, Billeter M, Calzolari L, Wider G & Wuthrich K (2000) NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 145-150

Zandomenighi G, Krebs MRH, McCammon MG & Fändrich M (2004) FTIR reveals structural differences between native beta-sheet proteins and amyloid fibrils. *Protein Science* **13**, 3314-3321

Zimm BH (1948) Apparatus and Methods for Measurement and Interpretation of the Angular Variation of Light Scattering - Preliminary Results on Polystyrene Solutions. *J Chem Phys* **16**, 1099-1116

Abkürzungen

Acrylodan	6-Acryloyl-2-dimethylaminonaphtalen
AF4	Asymmetrische Flussfeldflussfraktionierung
AFM	<i>Atomic force microscopy</i> (Rasterkraftmikroskopie)
Amp	Ampicillin
ANS	8-Anilino-naphthalen-1-sulfonat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AU	<i>arbitrary units</i> (willkürliche Einheiten)
CD	Circulardichroismus
CHY	Chymotrypsin
CR	Kongo Rot
CRBB	<i>Congo red binding buffer</i> (Kongo Rot Bindepuffer)
Da	Dalton
ϵ	Extinktionskoeffizient
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPR	<i>Electron paramagnetic resonance</i> (Elektronenspinresonanz)
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
FTIR	fourier-transformiertes Infrarot
GdmCl	Guanidiniumhydrochlorid
H ₂ O _{dd}	Quarzbdestilliertes Wasser
HST	Harnstoff
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactosid
ITC	<i>Isothermal titration calorimetry</i> (Isotherme Titrationskalorimetrie)
λ	Wellenlänge
LMW	<i>low molecular weight</i> (Molekulargewichtsstandard)
M	Molar
M ²⁺	Zweiwertige Metallkationen
MCl ₂	Metallchlorid
MQ-H ₂ O	Reinstwasser (Millipore-filtriertes Wasser)
MW	relative Molekülmasse
MWCO	<i>molecular weight cut off</i> , Ausschlussgröße
NEM	N-Ethylmorpholin
NM	Sup35p-NM
NMC	Sup35p Volllängenprotein
OD	optische Dichte
OMPD	Okulopharyngeale Muskeldystrophie
p.a.	<i>pro analysis</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
Phe	Phenylalanin
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RI	<i>Refractive Index</i> (Brechungsindex)
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

ThT	Thioflavin T
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
üN	über Nacht
URT	Ultraschall-Resonator-Technologie
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
V8	Endoproteinase Glu-C (Staphylococcus aureus Stamm V8)
VIS	visuell
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht

Publikationen

Hess S, Lindquist SL & Scheibel T (2007) Alternate assembly pathways of the amyloidogenic yeast prion determinant Sup35p-NM. *EMBO Rep*, akzeptiert zur Überarbeitung

Slotta U, Hess S, Spiess K, Stromer T, Serpell L & Scheibel T (2007) Spider silk and amyloid fibrils: a structural comparison. *Macromol Biosci* **7**, 183-188

Lodderstedt G, Hess S, Hause G, Scheuermann T, Scheibel T & Schwarz E (2007) Effect of oculopharyngeal muscular dystrophy-associated extension of seven alanines on the fibrillation properties of the N-terminal domain of PABPN1. *FEBS J* **274**, 346-355

Krammer C, Suhre M, Diemer C, Hess S, Schaetzel H, Scheibel T & Vorberg I (2007) Fusion with yeast Sup35p-NM modulates cytosolic PrP aggregation in mammalian cells. *FASEB J*, akzeptiert zur Überarbeitung

Kaiser-Schulz G, Heit A, Quintanilla-Martinez L, Hammerschmidt F, Hess S, Jennen L, Rezaei H, Wagner H & Schaetzel HM (2007) PLGA microsphere co-encapsulated recombinant tandem PrP with CpG-ODN breaks self-tolerance to PrP in wt mice and induces CD4 and CD8 T cell responses. *J Immunol*, im Druck

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2003 bis Mai 2007 am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München am Lehrstuhl für Biotechnologie in der Arbeitsgruppe *Fiberlab* angefertigt.

Bei Prof. Johannes Buchner möchte ich mich sehr herzlich für die Aufnahme an seinem Lehrstuhl bedanken.

Mein besonderer Dank gilt vor allem Dr. Thomas Scheibel für die Bereitstellung des Themas, für die vielen hilfreichen und motivierenden Gespräche und für jegliche Unterstützung. Danke, dass ich ein *Fiber* sein durfte.

Vielen Dank auch an Prof. Sevil Weinkauf und ihrem Team für die vielen "Gastaufenthalte" am AFM und am TEM.

Für die Hilfe bei den FTIR-Messungen möchte ich mich bei Sebastian Rammensee herzlich bedanken.

Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Biotechnologie möchte ich für das gute Arbeitsklima und die vielen gegenseitigen Hilfen danken. Besonders möchte ich mich bei den Technischen Assistenten und bei Frau Hilber für ihre Unterstützung im Labor- und Büroalltag bedanken.

Allen aktuellen und ehemaligen *Fibers* und Valerie danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre, für jegliche Hilfe, für Diskussionen und nicht-wissenschaftliche Gespräche, für nette Kaffee- und Kuchenpausen und all die gemeinsamen außeruniversitären Aktivitäten. Ohne Euch hätte ich wahrscheinlich diverse „Kupferkrisen“ nicht überstanden. Vielen Dank für die schöne Zeit!

Besonders möchte ich mich noch bei Andy, Anja, Christian, Kristina, Lin, Lukas, Markus, Michi, Ute und Valerie für das Korrekturlesen dieser Arbeit und bei Charlotte und Michi für die kleine und große Unterstützung an der „Prionenfront“ bedanken.

Meinen „Unimädels“ Cora und Doris danke ich für viele nette Abende mit guten und bei Bedarf aufbauenden Gesprächen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie und Tobi bedanken, die immer für mich da waren und auf deren Hilfe und Unterstützung ich in allen Lebenslagen vertrauen konnte.