

Komplexe des Prion Proteins mit antiprional wirksamen Substanzen

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades

- Doktor der Naturwissenschaften -
der Fakultät für Biologie, Chemie
und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Diplom-Biochemiker

Christian Mangels

Bayreuth 2008

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2005 bis Dezember 2007 am Lehrstuhl für Struktur und Chemie der Biopolymere der Universität Bayreuth unter Leitung von PD Dr. Stephan Schwarzingen angefertigt.

Promotionsgesuch eingereicht am: 02. Januar 2008

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 09. Mai 2008

Prüfungsausschuss:

Erster Gutachter: PD Dr. Stephan Schwarzingen

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Holger Dobbek

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	1
1.1 TRANSMISSIBLE SPONGIFORME ENZEPHALOPATHIEN	1
1.1.1 Die protein-only-Hypothese	1
1.2 DAS PRION PROTEIN.....	2
1.2.1 Die zelluläre Form PrP ^C	2
1.2.2 Die infektiöse Form PrP ^{Sc}	5
1.2.3 Konversion von PrP ^C in die PrP ^{Sc} -Form.....	6
1.3 THERAPIEANSÄTZE.....	8
1.3.1 Wirkstoffe.....	8
1.3.2 Quinpramin.....	10
1.3.3 Der organische Wirkstoff 293G02.....	11
1.3.4 Prion-bindende Peptide.....	11
1.3.5 Antikörper gegen das Prion Protein.....	12
1.3.5.1 Der Prion-bindende Antikörper W226.....	13
2. ZIELE	14
3. MATERIALIEN & METHODEN	15
3.1 BAKTERIENSTÄMME UND PLASMIDE	15
3.2 OLIGODESOXYRIBONUKLEOTIDE.....	16
3.3 PEPTIDE.....	16
3.4 TRANSFORMATION ELEKTROKOMPETENTER ZELLEN	17
3.5 BESTIMMUNG VON BAKTERIENDICHTEN	17
3.6 HERSTELLUNG VON REKOMBINANTEM PRP ^C UND SCF _V W226	18
3.6.1 Überexpression und Reinigung von Prion Proteinen.....	18
3.6.2 Überexpression und Reinigung von isotopenmarkiertem scF _V W226	19
3.6.3 Affinitätschromatographie mit immobilisiertem PrP.....	20
3.7 ELEKTROPHORETISCHE VERFAHREN	20
3.7.1 SDS-Gelelektrophorese	20
3.7.2 Induktionsgele	21
3.8 CHARAKTERISIERUNG VON PROTEINEN.....	21
3.8.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	21
3.8.2 CD-Spektroskopie	22
3.8.3 Fluoreszenz-Spektroskopie.....	23
3.8.3.1 Auswertung von Fluoreszenztitrationen	23
3.8.4 NMR-Spektroskopie.....	23
3.9 KRISTALLISATION VON 4OR-GST	25
4. ERGEBNISSE	26
4.1 KLEINE ANTI-PRION-WIRKSTOFFE	26
4.1.1 Substanz 293G02 löscht NMR-Signale der globulären PrP ^C -Domäne in NMR-Spektren	26
4.1.2 Quinpramin bindet nur sehr schwach an PrP ^C	27
4.1.3 Peptide aus einer Phagendisplay-Bibliothek binden im NMR-Assay nicht an PrP ^C	27
4.1.4 Ein Peptid mit den Bindemotiven aus F _{ab} VRQ14 zeigt keine Bindung im NMR-Versuch.....	28
4.2 DIE SCHWACHE BINDUNG VON ACRIDINEN KANN IN EINEM NMR-SCHNELLTEST ZUM NACHWEIS GROBER PROTEINKOMPLEXE EINGESETZT WERDEN	30
4.3 KRISTALLISATION VON 4OR-GST	33
4.4 CHARAKTERISIERUNG DES GEGEN PRP-HELIX 1 GERICHTETEN SCF _V -ANTIKÖRPERS W226.....	36
4.4.1 Fluoreszenz-Spektroskopie am Epitop: Y145, R148 und E152 bilden ein strukturelles Epitop.....	36
4.4.2 Herstellung von kleinen Antikörperfragmenten für die NMR-Spektroskopie.....	39
4.4.3 Isotopenmarkierung, Reinigung & Charakterisierung von scF _V W226.....	39
4.4.4 NMR-spektroskopische Untersuchung von scF _V W226.....	42
4.4.4.1 Zuordnung	42
4.4.4.2 Sekundärstrukturmodell.....	47
4.4.4.3 Titration mit PrP-Helix 1-Peptid.....	48
4.4.4.4 Aufstellung eines Verschiebungsindex zur Bestimmung der Sekundärstrukturelemente	54
4.4.4.5 Eine lösliche paramagnetische Spinsonde hilft bei der Identifizierung der Proteinoberfläche	56
4.4.5 Strukturmodell des scF _V W226	58

5. DISKUSSION	61
5.1 DER WIRKSTOFF 293G02 BINDET AN PRP ^{Sc} UND AN PRP ^C	61
5.2 DIE MEISTEN GETESTETEN KLEINEN WIRKSTOFFMOLEKÜLE ZEIGEN KEINE ODER NUR EINE SEHR SCHWACHE INTERAKTION MIT PRP ^C	63
5.2.1 Quinpramin	63
5.2.2 Studien an kurzen Peptiden	65
5.3 IN EINEM NMR-SCHNELLTEST IST 9-AMINOACRIDIN ALS SONDE FÜR MAKROMOLEKÜLINTERAKTIONEN VIELSEITIG EINSETZBAR	67
5.4 KRISTALLISATION VON 4OR-GST	71
5.5 DER PRP ^C -BINDENDE ANTIKÖRPER W226	73
5.5.1 Helix 1 des Prion Proteins bildet ein strukturiertes Epitop	73
5.5.2 Single domain-Antikörper zur Reduzierung der Konstruktgröße	76
5.5.3 Fortgeschrittene Methoden der Isotopenmarkierung und Reinigung über eine Immunoaffinitätssäule sind die Voraussetzung für die NMR-Spektroskopie an scF _v W226	78
5.5.4 Die Kombination mehrdimensionaler NMR-Spektren mit einfachen 2D-Spektren selektiv markierter Proben ermöglicht die Gewinnung von Strukturinformationen in sehr komplexen Systemen	81
5.5.5 Das Homologiemodell von scF _v W226 erlaubt in Verbindung mit den NMR-Daten eine Charakterisierung des Paratops	82
5.5.6 Eine Docking-Simulation ergibt eine Kontaktfläche mit aromatischen und verborgenen, geladenen Resten	84
5.5.7 Ausblick W226	87
6. ZUSAMMENFASSUNG	89
7. SUMMARY	91
8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	93
9. LITERATURVERZEICHNIS	95
10. ANHANG	105
10.1 PLASMIDE	105
10.2 OLIGODESOXYRIBONUKLEOTIDE	110
10.3 PEPTIDE	110
10.4 NÄHRMEDIEN	112
10.4.1 Luria Bertani (LB) - Vollmedium	112
10.4.2 M9-Minimalmedium (Sambrook et al., 1989)	112
10.5 GELELEKTROPHORESE	113
10.6 PUFFER	113
10.7 CHEMIKALIEN, ENZYME & VERSCHIEDENE VERBRAUCHSMATERIALIEN	114
10.8 GERÄTE	115
10.8.1 Gelelektrophorese	115
10.8.2 Klonierung & Expression	115
10.8.3 Proteinreinigung	116
10.8.4 Spektroskopische Methoden	116
10.8.5 Zentrifugen	116
10.8.6 Autoklaven	117
10.8.7 Verschiedene	117
10.9 COMPUTER-SOFTWARE	117
10.10 MESSBEDINGUNGEN UND DATEN	118
11. DANKSAGUNG	131
12. ERKLÄRUNG	132

1. Einleitung

1.1 *Transmissible Spongiforme Enzephalopathien*

Prionerkrankungen stellen eine neue Klasse neurodegenerativer Krankheiten dar (Prusiner, 1998). Die Klasse der Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien (TSE) umfasst Krankheiten wie Scrapie in Schafen und Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) in Rindern sowie Kuru, Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom (GSS) und Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK) beim Menschen. Der Verlauf dieser generell letalen Krankheiten ist durch neuronalen Verfall, verbunden mit ataxischen Symptomen und fortschreitender Demenz gekennzeichnet. Nach dem Ausbruch der Krankheit ist im Lichtmikroskop eine schwammartige Degeneration des zentralen Nervensystems zu erkennen. Die Erkrankungen innerhalb dieser Klasse können in erblicher, spontaner oder erworbener Form auftreten.

Auch wenn der Höhepunkt der BSE-Epidemie in Großbritannien vor mehr als zehn Jahren überschritten wurde, steht BSE als bekannteste Prionerkrankung weiterhin im Blickpunkt des öffentlichen Interesses. Grund hierfür ist die noch immer unklare Verbindung zwischen dem Verzehr des Fleisches von BSE-infizierten Rindern und dem Auftreten der neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJK) (Will *et al.*, 1996). Daneben gewinnt die chronisch zehrende Krankheit der Hirsche und Elche (CWD) mit ihrer schnell fortschreitenden Ausbreitung in Kanada und Nordamerika zunehmend an Bedeutung (Salman, 2003; Sigurdson & Aguzzi, 2007).

Prionerkrankungen liegt die Formierung amyloider Fibrillen oder Plaques zugrunde. Diese sind mit mehr als 20 verschiedenen degenerativen Erkrankungen wie dem Parkinson-Syndrom, der Alzheimer'schen Krankheit oder Typ-2-Diabetes verbunden und daher von besonderer medizinischer Relevanz (Stefani & Dobson, 2003). Für die Alzheimer'sche Krankheit konnte im Maus-Modell die Möglichkeit einer Übertragung, vergleichbar der des Prion Proteins, nachgewiesen werden (Meyer-Lüthmann *et al.*, 2006).

1.1.1 Die *protein-only*-Hypothese

Die Besonderheit der Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien liegt im völlig neuen Modell der Krankheitsübertragung. Ein Protein ist hier nicht nur Ziel eines Erregers, sondern

stellt gleichzeitig auch den Erreger selber dar (Prusiner, 1998). Die Konversion des zellulären Prion Proteins, PrP^C, in eine fehlgefaltete Scrapie-Form (PrP^{Sc}) und dessen Anhäufung werden als Ursachen der Prionerkrankungen angesehen. PrP^{Sc} katalysiert dabei die Konversion von PrP^C in PrP^{Sc} und fördert so die eigene Ausbreitung. Für diese Erregerform prägte S. B. Prusiner zur Unterscheidung gegenüber Virus und Viroid den Namen Prion, abgeleitet von *proteinaceous infectious particle*. Das Modell der nukleinsäurefreien Krankheitsübertragung wurde lange Zeit kontrovers diskutiert, jedoch konnten bis heute keine Nukleinsäuren in Prionen nachgewiesen werden, die der Länge eines Virusgenoms entsprechen würden (Weissmann, 2004; Soto & Castilla, 2004). Hieraus resultiert, dass die Wirtsspezifität ebenfalls durch das Protein, also dessen Tertiärstruktur, und nicht durch Gene, codiert wird. In Einklang mit der *protein-only*-Hypothese lässt sich die Existenz sowohl von erblicher, spontaner, als auch übertragbarer CJK erklären. Auch das Ausbleiben einer Immunantwort auf einen äußeren Erreger stützt dieses Modell (Prusiner, 1998). Prionen lassen sich daher als infektiöse, fehlgefaltete Form des zellulären Prion Proteins (PrP^C) charakterisieren, die durch Stimulation der Konversion von PrP^C in PrP^{Sc} replizieren.

1.2 Das Prion Protein

Das Vorkommen des Prion Proteins erstreckt sich über die Proteome aller bisher untersuchten Säuger, ist aber auch in Fischen und Vögeln zu beobachten (Wopfner *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2002). Codiert wird das Protein vom hochkonservierten *Prnp*-Gen. Dieses liegt entweder als ein Exon vor, wie im Fall des humanen Prion Proteins (huPrP), oder es kann durch ein Intron unterbrochen werden, wie beispielsweise beim Goldhamster (shPrP). Um die Funktion des Prion Proteins aufzuklären, wurden *Knock-out*-Mäuse (*Prnp*^{0/0}) untersucht, die aber keinen veränderten Phänotyp zeigten (Martins *et al.*, 2001).

1.2.1 Die zelluläre Form PrP^C

Bei der zellulären Form des Prion Proteins, PrP^C, handelt es sich um ein 207 Aminosäuren großes, monomeres Glykoprotein, das eine Disulfidbrücke besitzt und über einen GPI-Anker mit der Zelloberfläche verbunden ist (Abb. 1.1).

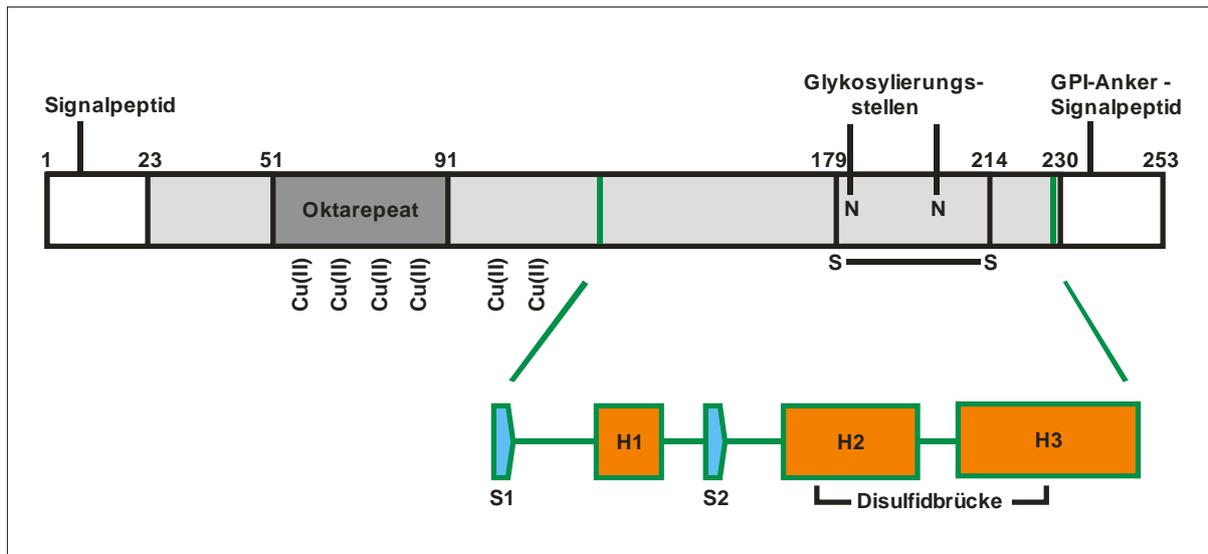


Abb. 1.1) Die Primärstruktur des humanen Prion Proteins (PrP^C)

Über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI) - Anker ist das zelluläre PrP mit der Zelloberfläche verknüpft. Das aminoterminal Signalpeptid (AS 1-22) dient dem Eintritt in das Endoplasmatische Retikulum und wird vor dem Erreichen der Zelloberfläche abgespalten. Das carboxyterminale Signalpeptid vermittelt die Anknüpfung des GPI-Ankers an Serin 230 (Nummerierungsschema des humanen Prion Proteins) und wird im Zuge der Reaktion entfernt. Die Oktarepeat-Region (AS 51-91) enthält fünf Sequenzwiederholungen und kann bis zu vier Cu(II) - Ionen binden. Zwei weitere Cu(II)-Ionen können im Bereich His 96 bis His 111 gebunden werden. Eine Glykosylierung kann an einem, beiden oder keinem der Asparagine Asn 181 & Asn 197 erfolgen. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt den globulären Bereich von PrP^C (AS 125-228) und dessen topologischen Aufbau aus den beiden antiparallelen β -Faltblattsträngen S1 und S2, sowie den Helices H1, H2 und H3. Die Cysteine 179 und 214 bilden eine Disulfidbrücke zwischen den Helices H2 und H3.

Die Struktur des löslichen Prion Proteins aus verschiedenen Säugern konnte mittels magnetischer Kernresonanz (NMR) - Spektroskopie aufgeklärt werden. Nachdem die Strukturen des Prion Proteins aus Maus (Riek *et al.*, 1997) und Goldhamster (Donne *et al.*, 1997) vorlagen, folgten im Jahr 2000 die des Menschen (Zahn *et al.*, 2000) und die des Rinds (López Garcia *et al.*, 2000). Die 2004 für das Schaf veröffentlichte Struktur (Haire *et al.*, 2004) stellt die erste mit Röntgenkristallographie gelöste PrP^C-Struktur dar. Mittlerweile veröffentlichte die Gruppe von Prof. Dr. K. Wüthrich die Strukturen für PrP^C der Mammalia Elch, Hund, Katze, Schwein und Schaf, sowie für Huhn, Frosch und Schildkröte, die alle eine gleiche Faltung aufweisen (Lysek *et al.*, 2005; Gossert *et al.*, 2005; Calzolari *et al.*, 2005).

Der hohen Sequenzhomologie folgend, zeigt der Vergleich der Strukturen von Prion Proteinen aus verschiedenen Säugern nur geringe strukturelle Unterschiede. Der Aufbau des Vollängen - Prion Proteins kann in einen hoch flexiblen, ungeordneten N-Terminus und eine

aminoterminaler Domäne mit globulärer Struktur gegliedert werden. Die globuläre Domäne (AS 125-228) ist aus drei α -Helices (Reste 144-154, 173-194 und 200-228) und einem kurzen antiparallelen β -Faltblatt aus den zwei Strängen 128-131 und 161-164 aufgebaut.

Die aminoterminaler Domäne hat keinen signifikanten Einfluss auf die dreidimensionale Faltung des C-Terminus, was aus Strukturvergleichen mit aminoterminal verkürzten Prion-Konstrukten hervorgeht. Lediglich in wenigen Bereichen der Strukturen gibt es Anzeichen für Kontakte, die sich auf transiente Wechselwirkungen zwischen dem flexiblen N-Terminus und der globulären Domäne reduzieren lassen. Für die Konformation der Helix-Abschnitte 187-193 und 219-226 konnte gezeigt werden, dass sie in geringem Maß von der Länge der aminoterminalen Polypeptidkette abhängig sind. Im Fall des vollständigen Prion Proteins ist der α -helikale Anteil in diesen Bereichen größer als in C-terminalen Fragmenten (Zahn *et al.*, 2000).

Lokale Variationen der PrP-Struktur sind speziesabhängig in exponierten Bereichen zu beobachten und werden als Ursache für Einschränkungen in der Übertragbarkeit von Prionerkrankungen zwischen verschiedenen Spezies verantwortlich gemacht (Billeter *et al.*, 1997; Prusiner, 1998). Dies ist vor allem im Kontext der Übertragbarkeit von BSE und vCJK von Bedeutung, da die Strukturen aus Mensch und Rind kaum solche Unterschiede aufweisen (López Garcia *et al.*, 2000).

Obwohl die Sequenz des *Prnp*-Gens hochkonserviert ist (Wopfner *et al.*, 1999), was auf eine zelluläre Funktion hinweist, ist diese bis heute nicht bekannt. Experimente mit *Knock-out*-Mäusen (*Prnp*^{0/0}), die zu diesem Zweck durchgeführt wurden, blieben weitgehend ohne Befund (Martins *et al.*, 2001). Dies deutet darauf hin, dass dem Prion Protein eine redundante oder eine nicht beobachtete Funktion zukommt. Im Zuge von Arbeiten über die Bedeutung des Prion Proteins für die Neuritenentwicklung wurde die Möglichkeit diskutiert, dass ein Funktionsverlust in *Knock-out*-Tieren über Integrine kompensiert werden könnte (Santuccione *et al.*, 2005; Hajj *et al.*, 2007).

Aus der experimentellen Beobachtung, dass das zelluläre Prion Protein zweiwertige Kupferionen binden kann (Cereghetti *et al.*, 2001), ergibt sich die mögliche Funktion eines Cu(II)-Transportproteins oder eines Regulators im Kupferhaushalt, verbunden mit dem Schutz vor oxidativem Stress (Brown, 2001). Bis zu vier Cu(II)-Ionen können von der Oktarepeat-Region gebunden werden, einem Bereich, der beim Menschen fünf Wiederholungen des PHGGGWGQ-Motivs aus acht Aminosäuren enthält, wobei die erste Kopie um eine Aminosäure verlängert ist (Goldfarb *et al.*, 1991). Parallel hierzu kann ein Bereich um die Histidine 96 und 111 ebenfalls Cu(II) binden (Jackson *et al.*, 2001). Die

Affinität wird allerdings durch die Anwesenheit der Oktarepeats gesenkt (Thompsett *et al.*, 2005). Die Möglichkeit der Bindung von Cu(II) teilt das Prion Protein mit dem Protein Doppel, welches eine Sequenz- und Strukturhomologie zu PrP^C aufweist (Lührs *et al.*, 2003), dessen Funktion aber auch ungeklärt ist (Qin *et al.*, 2003). Des Weiteren konnte für PrP^C eine Bindung von Mangan beobachtet werden, wobei sich der Bindungsmechanismus des Proteins für die beiden Schwermetalle unterscheidet (Tsenkova *et al.*, 2004).

Bisher wurden nur wenige Bindungspartner des Prion Proteins identifiziert. Hierunter befinden sich die C-terminale SH3-Domäne von Grb2 (Spielhauer & Schätzl, 2001; Lysek & Wüthrich, 2004) und neurale Zelladhäsionsmoleküle (N-CAMs) (Schmitt-Ulms *et al.*, 2001). Ebenso konnte die Bindung des stressinduzierbaren Proteins 1 (STI1) an den Bereich 113-128 des PrP^C (Zanata *et al.*, 2002) nachgewiesen werden. Diese Region gehört bereits zum flexiblen N-Terminus des Prion Proteins und enthält ein hochkonserviertes, alaninreiches Motiv (A₁₁₃GAAAAGA₁₂₀).

PrP^C besitzt außerdem die Fähigkeit, das extrazelluläre Matrix-Glykoprotein Laminin zu binden, was einen weiteren Ansatz für eine zelluläre Funktion darstellt. Da Laminin bei der Bindung an Integrine zelluläre Vorgänge wie Proliferation, Differenziation, Migration und Apoptose beeinflusst, misst man der Bindung der Laminin- γ -1-Kette eine entsprechend hohe Bedeutung bei der pathogenen Transkonformation des Prion Proteins zu (Graner *et al.*, 2000). PrP^C interagiert des Weiteren mit dem 37-kDa/67-kDa Lamininrezeptor-Vorläuferprotein (LRP), eine Eigenschaft, die auch für Doppel beobachtet werden konnte (Yin *et al.*, 2004). Diese Interaktion ist essenziell für die Propagation von PrP^{Sc} in Zellkulturen (Leucht *et al.*, 2003).

Von Bedeutung scheint das LRP ebenfalls bei der Internalisierung von PrP^C zu sein. Diese erfolgt über Vesikel, wobei ein großer Anteil nicht degradiert wird und in das Plasmalemma zurückkehrt (Martins, 2002).

1.2.2 Die infektiöse Form PrP^{Sc}

Als Hauptbestandteil von Prionen wurde die sogenannte Scrapie-Form des Prion Proteins, PrP^{Sc}, isoliert. Diese weist keine chemischen Unterschiede gegenüber PrP^C auf (Soto & Castilla, 2004) und wurde bisher nur als Oligomer isoliert (Weissmann, 2004; Silveira *et al.*, 2005). Ein wichtiges Charakteristikum zum Nachweis von PrP^{Sc} ist die Resistenz gegen den Abbau durch Protease K, eine Eigenschaft, die PrP^C nicht besitzt. Der proteasestabile Kern

von PrP^{Sc} besitzt ein apparentes Molekulargewicht von 27-30 kDa, weshalb er als PrP 27-30 bezeichnet wird. Gleichzeitig stellt er den infektiösen Bereich des Proteins dar (Nguyen *et al.*, 1995).

CD- und Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie weisen darauf hin, dass im Zuge der pathogenen Konformationsänderung α -Helices in β -Faltblätter umgefaltet werden. PrP^{Sc} besitzt einen deutlich erhöhten Anteil an β -Faltblättern von etwa 45 %, während in PrP^C nur sechs bis acht Aminosäuren eine Faltblatt-Konformation annehmen. Auf Grund der Unlöslichkeit von PrP^{Sc} ist für die Isoform eine detaillierte Strukturbestimmung durch Röntgenkristallographie oder NMR-Spektroskopie allerdings nicht möglich.

Ausgehend von Elektronenkristallographie-Experimenten wird eine parallele, linksgängige β -helikale Struktur angenommen, woraus die Ausbildung einer dreizähligen Symmetrieachse abgeleitet wird (Wille *et al.*, 2002; Govaerts *et al.*, 2004). Im Einklang mit diesem Modell lassen sich das unterschiedliche Bindungsverhalten von Antikörpern und die Protease K - Resistenz von PrP^{Sc} erklären. Während die Reste 90-120 in PrP^C im Wesentlichen an der Oberfläche liegen, ist dieser Bereich in PrP^{Sc} im Inneren der Struktur eingeschlossen (Peretz *et al.*, 1997).

1.2.3 Konversion von PrP^C in die PrP^{Sc}-Form

Ein weiterer, noch nicht hinreichend geklärter Punkt ist der Verlauf der Konversion von PrP^C in die Isoform PrP^{Sc} (Abb. 1.2). In Anbetracht der hohen Ähnlichkeit der bisher aufgeklärten PrP-Strukturen kann von einem universellen Mechanismus ausgegangen werden. Verschiedene Konversionsmodelle, zum Teil unter Einbeziehung eines weiteren Faktors, dem sogenannten Protein X (Prusiner, 1996), stehen zur Diskussion. Ein solcher Faktor, sollte er an der PrP^{Sc}-Replikation beteiligt sein, würde demnach ein molekulares Chaperon darstellen (Telling *et al.*, 1994 & 1995). PrP^{Sc} erkennt jenen Teil der Oberfläche von PrP^C, der die Reste der Region 90-144 und 180-205 einschließt; Protein X dagegen soll mit Resten der Regionen 160-180 und 205-231 interagieren (Kaneko *et al.*, 1997; Calzolari *et al.*, 2000), wobei genau diese letztgenannten Regionen Spezies-Variationen zeigen (Zahn *et al.*, 2000).

Für die Umfaltungsreaktion wird auch die Bedeutung einer teilweise entfalteten Spezies des Prion Proteins diskutiert. Eine erste strukturelle Charakterisierung eines solchen als PrP* bezeichneten Übergangszustandes konnte mittels Hochdruck-NMR durchgeführt werden (Kuwata *et al.*, 2002). Die Bedeutung teilentfalteter Zustände wird durch die Veröffentlichung

über die ersten *in vitro* erzeugten infektiösen Prionen aus rekombinantem, harnstoffdestabilisiertem Prion Protein unterstrichen (Legname *et al.*, 2004).

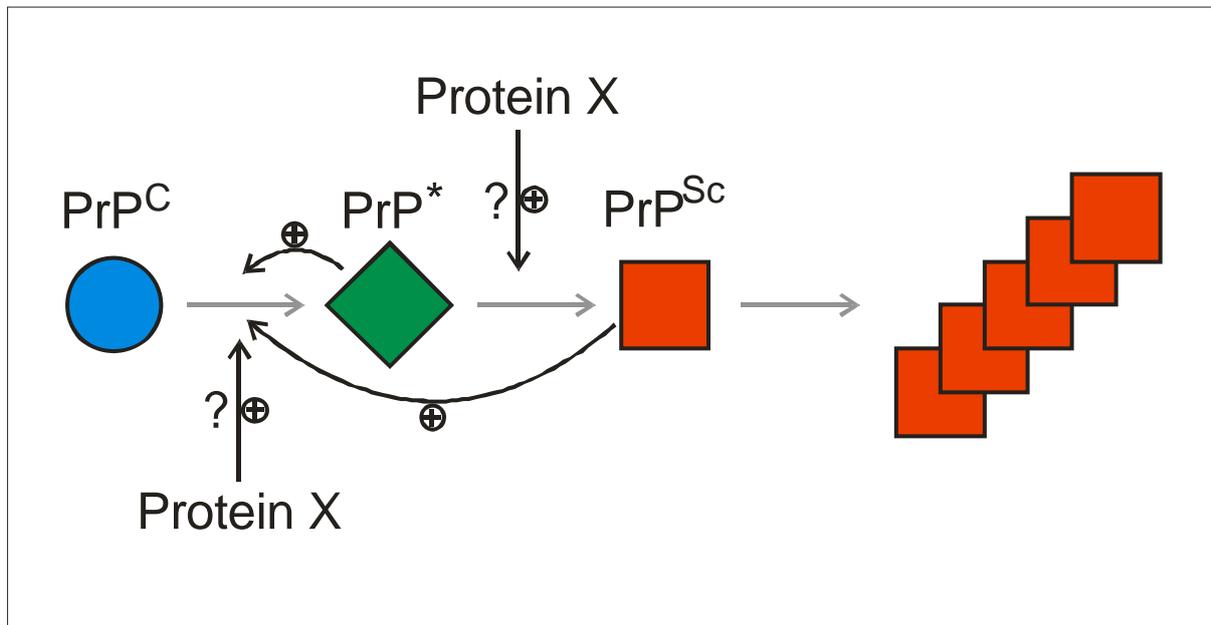


Abb. 1.2) Mögliche Wege der Konversion von PrP^C in die PrP^{Sc}-Form.

Ausgehend von PrP^C wird bei der Konversion zu PrP^{Sc} möglicherweise zunächst eine Übergangsform (PrP*) eingenommen. Diese könnte wiederum ihre eigene Etablierung fördern. Der Übergang von PrP^C oder aber PrP* zu PrP^{Sc} wird möglicherweise von PrP^{Sc} selbst, oder aber von einem unbekanntem Faktor, genannt Protein X, positiv beeinflusst. Gefolgt wird die Konversion von der Aggregation zu Multimeren.

Aktuell wird angenommen, dass niedrige PrP^{Sc}-Oligomere aus 14 bis 28 Prion-Molekülen am infektiösesten sind, während Fibrillen eine geringere Pathogenität zugeschrieben wird (Silveira *et al.*, 2005). Für die Umfaltung ist das flexible Peptid-Segment 105-120 essenziell, dem hierzu aminoterminal gelegenen Bereich kommt dagegen keine Bedeutung bei der Propagation von PrP^{Sc} zu (Lührs *et al.*, 2006).

Die Akkumulation von PrP^{Sc} im zentralen Nervensystem führt zur Entstehung amyloider Fibrillen oder Plaques. Die Formierung dieser Ablagerungen kann für mehr als 20 verschiedene degenerative Erkrankungen beobachtet werden und ist daher von besonderer medizinischer Relevanz (Stefani & Dobson, 2003).

1.3 Therapieansätze

Bisher sind neurodegenerative Erkrankungen wie die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, die Alzheimer'sche Krankheit oder das Parkinson-Syndrom nicht heilbar. Bestehende Therapien beschränken sich auf eine Verzögerung des Krankheitsprozesses und eine Reduktion der Symptome. Die Krankheiten verlaufen jedoch invariabel letal. Daher besteht weiterhin ein Bedarf an neuen, wirkungsvollen Therapieansätzen.

Ausgehend von den verschiedenen Konversionsmodellen ergeben sich unterschiedliche Ansätze. Betrachtet man Anfang und Ende der Konversion, so könnte man einerseits PrP^C stabilisieren, oder aber andererseits PrP^{Sc} destabilisieren. Ebenfalls könnte man versuchen, die Stabilität eines möglichen Übergangszustandes zugunsten von PrP^C zu erhöhen. Zieht man eine kausale Funktion von Protein X bei der Umfaltung in Betracht, so könnte ein Ligand mit Protein X um dessen Epitop konkurrieren und eine Bindung des Faktors verhindern.

Allen bisher beschriebenen Ansätzen ist gemein, dass sie die Etablierung von PrP^{Sc} und somit die Formierung neuer Fibrillen stoppen sollen. Als weiterer Therapieansatz wäre der Abbau bereits entstandener Fibrillen möglich. Die Unsicherheit hierbei besteht darin, dass der Mechanismus der Krankheit weitgehend unklar ist. Neueren Erkenntnissen zufolge sind nicht amyloide Strukturen, sondern deren Vorläufer, also Oligomere, in weitaus größerem Maße cytotoxisch (Silveira *et al.*, 2005). Demnach könnten fibrilläre Ablagerungen sogar eine neuroprotektive Funktion besitzen und ein Abbau von Fibrillen möglicherweise sogar das eigentlich infektiöse Agens wieder freisetzen.

1.3.1 Wirkstoffe

Unabhängig vom Wirkmechanismus wurde mit der Suche nach Substanzen begonnen, die eine Zunahme von PrP^{Sc} verhindern. Da Prionen zu einem großen Teil im zentralen Nervensystem lokalisiert sind, sollte ein Medikament die Blut-Hirn-Schranke passieren können, da anderenfalls eine intraventrikuläre Verabreichung (Doh-Ura *et al.*, 2004), verbunden mit dem Risiko der notwendigen Operation, erfolgen müsste. Des Weiteren soll ein geeigneter Wirkstoff keine Nebeneffekte zeigen und in der nötigen Dosierung nicht toxisch sein.

Abgesehen vom Idealfall einer präventiven Wirkung müsste ein Wirkstoff, der die Konversion nur stoppt, zu einem möglichst frühen Zeitpunkt nach der Infektion dargereicht

werden, um die Inkubationszeit der Krankheit, das heißt, die Zeitspanne zwischen der Infektion und dem Erscheinen der ersten klinischen Symptome, zu verlängern. Im Fall von Krankheiten wie der spontanen oder der erblichen Creutzfeldt-Jakob-Krankheit lässt sich die Inkubationszeit auf eine präklinische Krankheits-Phase vor dem Auftreten von Symptomen übertragen. Hierzu wäre aber eine frühzeitige Diagnose nötig. Der heutige Stand der Technik erlaubt jedoch nur eine symptomabhängige Diagnose, also zu einem Zeitpunkt, bei dem bereits erhebliche Schäden am zentralen Nervensystem vorliegen und der demnach für derartige Therapien viel zu spät ist. Eine Verbesserung der Diagnosemöglichkeiten scheint sich bisher allerdings nicht abzuzeichnen. Eine effektive Therapie sollte daher nicht nur die Formierung von PrP^{Sc} stoppen, sondern auch bereits eingetretene Schäden vermindern.

Für die Wirkstoffsuche wird in den meisten Fällen die Resistenz von PrP^{Sc} gegen Protease K-Verdau genutzt. Mit antiprionalen Substanzen behandelte, persistent scrapieinfizierte Zellkulturen zeigen einen verminderten Anteil an proteasestabilem PrP im Vergleich zur Negativkontrolle. Neben den in der Prionenforschung etablierten Tiermodellen Maus und Goldhamster wurden vor allem scrapieinfizierte Neuroblastomzellen, ScN2a, für die Suche nach möglichen Wirkstoffen eingesetzt. ScN2a-Zellen zeichnen sich durch eine deutlich kürzere Inkubationszeit aus und konnten erfolgreich für die Identifizierung von Wirkstoffen eingesetzt werden (Korth *et al.*, 2001). Parallel hierzu konnte für einige Stoffe eine Verlängerung der Inkubationszeit nach der Infektion von Nagetieren beobachtet werden (Shaked *et al.*, 2003). Als Maß für die Effektivität einer Substanz wird die Konzentration bestimmt, die im Vergleich zum Kontrollversuch eine 50 %-ige Reduktion der PrP^{Sc}-Bildung, gemessen an der Resistenz gegen Proteinase K-Verdau, erzielt. Des Weiteren sollte dieser sogenannte EC₅₀-Wert deutlich kleiner als die Konzentration sein, ab der eine toxische Wirkung eintritt, wobei der Grenzwert in der Regel in Zellviabilitätstests ermittelt wird.

Keiner der Wirkstoffe konnte allerdings eine Wirkung erzielen, wenn er erst zum Zeitpunkt des Auftretens von neurologischen Fehlfunktionen verabreicht wurde. Für die meisten Wirkstoffe kommen Einschränkungen wie eine zu geringe Penetration der Blut-Hirn-Schranke oder eine inakzeptabel hohe Toxizität hinzu (Korth *et al.*, 2001; Caughey *et al.*, 2003; May *et al.*, 2003).

Organische Wirkstoffe stellen die am meisten untersuchte Klasse von anti-Prion-Wirkstoffen dar. Zum einen wurden bereits zugelassene, hirngängige Therapeutika gezielt auf eine Inhibierung von PrP^{Sc} untersucht, zum anderen wurden große Bibliotheken organischer Leitsubstanzen auf PrP-bindende Komponenten durchsucht und eine therapeutische Wirkung der Treffer anschließend verifiziert.

Aus dem ersten Ansatz ging unter anderem das klassische Malaria-Therapeutikum Quinacrin hervor, welches zur Klasse der Acridin-Derivate gehört. Es passiert die Blut-Hirn-Schranke und zeigt in Zellkulturversuchen einen EC_{50} -Wert von $0.3 \mu\text{M}$, wobei eine Beeinträchtigung des Zellwachstums erst ab einer Konzentration von $2.0 \mu\text{M}$ eintritt (Doh-Ura *et al.*, 2000). Erste Untersuchungen zur Aufklärung des Wirkmechanismus deuteten auf eine Bindung des Acridin-Derivats an PrP^{C} hin, welche als Grundlage der therapeutischen Wirkung interpretiert wurde (Vogtherr *et al.*, 2003).

Als Kontrollsubstanz für Experimente bezüglich des Wirkungsmechanismus von Acridin-Derivaten bietet sich die Verwendung von 9-Aminoacridin an, da dieses PrP^{C} bindet, aber keine biologische Aktivität zeigt (Korth *et al.*, 2001). Mittels 9-Aminoacridin konnte so eine direkte Bindung von Quinacrin an PrP^{C} als Grundlage der therapeutischen Wirkung ausgeschlossen werden, da beide an identische, oberflächenexprimierte Doppelyrosinmotive des PrP^{C} mit vergleichbarer Dissoziationskonstante binden (Mangels, 2004). Trotz der unklaren Funktion wurde Quinacrin in Einzelfällen auf Patientenwunsch zur vCJK-Therapie eingesetzt (Love, 2001). Die Behandlungen mussten aber auf Grund der Lebertoxizität von Quinacrin abgebrochen werden.

1.3.2 Quinpramin

Versuche zur Verbesserung der Wirkung führten, ausgehend von der Quinacrin-Aktivität, zur Untersuchung von Bisacridinen (May *et al.*, 2003) und Acridin-Konjugaten. In diesen Substanzklassen wurden bis zu zehnfach potentere Wirkstoffe gefunden, gemessen an der Quinacrin-Wirkung (May *et al.*, 2003). Eine derartige Substanz ist das Quinpramin, in dem Quinacrin mit dem Iminodibenzyl-Derivat Desipramin, einem trizyklischen Antidepressivum, konjugiert ist (Klingenstein *et al.*, 2006).

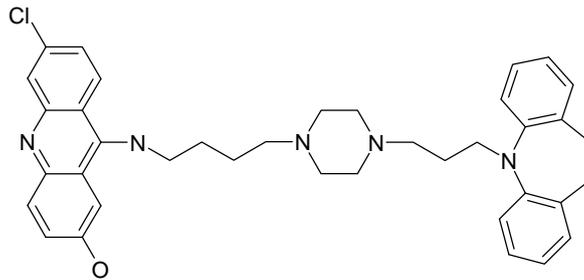


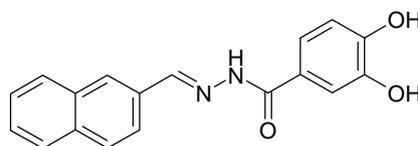
Abb. 1.3) Quinpramin

Die antiprionale Substanz Quinpramin ((6-Chloro-2-methoxy-acridin-9-yl)-(4-{4-[3-(10,11-dihydro-dibenzo[b,f]azepin-5-yl)-propyl]-piperazin-1-yl}-butyl)-amin) setzt sich aus den beiden Hälften Quinacrin (links) und Desipramin (rechts) zusammen.

1.3.3 Der organische Wirkstoff 293G02

Da eine PrP-bindende Substanz nicht automatisch auch eine anti-Prion-Wirkung besitzen muss, sollte ein Test zur Wirkstoffsuche diesen Umstand bereits berücksichtigen. Hieraus leitet sich der Ansatz ab, die Inhibierung der Bindung von PrP^C an PrP^{Sc}-Aggregate als Auswahlkriterium zu nutzen. Mit der SIFT-Methode (*scanning for intensely fluorescent targets*) wird daher die Bindung von rekombinantem Maus-PrP an PrP^{Sc}-Aggregate aus humanen CJD-Fällen über einen fluorophormarkierten, monoklonalen Antikörper (mAb), welcher an humanes, aber nicht an Maus-PrP bindet, detektiert.

Aus einer Bibliothek, welche 10.000 organische Substanzen mit optimierten, pharmakologischen Eigenschaften umfasste, wurde das *N'*-Benzyliden-benzohydrazid-Derivat 293G02 anhand dieses Kriteriums identifiziert. Die Verifizierung der anti-Prion-Wirkung in einer scrapieinfizierten Zelllinie führte zu einem EC₅₀-Wert von 2 µM.



293G02

1.3.4 Prion-bindende Peptide

Von natürlichen Binderegionen zellulärer oder extrazellulärer, PrP^C-bindender Faktoren

abgeleitete Peptide lassen sich ebenfalls für therapeutische Zwecke einsetzen. Einerseits kann so die Wechselwirkung mit einem anderen Protein verhindert werden, das aktiv an der Strukturumwandlung beteiligt ist, wie etwa dem Faktor X oder dem Prion Protein selbst. Andererseits kann beispielsweise die zelluläre Form PrP^C stabilisiert und somit die Energiebarriere für die pathogene Transkonformation zu PrP^{Sc} erhöht werden. Hierzu eignen sich Bindemotive von bekannten PrP-bindenden Proteinen, wie das des 37-kDa/67-kDa Lamininrezeptor-Vorläuferproteins (Rieger *et al.*, 1997). Neben diesen natürlichen Motiven wurden aber auch Zufalls-Bibliotheken auf PrP-bindende Peptide durchsucht.

1.3.5 Antikörper gegen das Prion Protein

Therapie-Ansätze zur Heilung der Alzheimer'schen Krankheit konzentrieren sich auf Antikörper, die gegen das Protein A β gerichtet sind. Während die Wirksamkeit verschiedener Konstrukte im Tiermodell belegt werden konnte, ist der Mechanismus dieser anti-A β -Antikörper noch weitgehend ungeklärt (Levites *et al.*, 2006). Auch in der Prionenforschung gewinnt die Verwendung von Antikörpern zunehmend an Bedeutung. Durch ihre hohe Spezifität und starke Bindung eignen sich Antikörper nicht nur zur Diagnose von Prionerkrankungen (Luginbühl *et al.*, 2006), sondern bieten sich auch für therapeutische Zwecke an (Donofrio *et al.*, 2005). Ebenso wie für organische Komponenten oder Peptide kann die Wirkung entweder auf einer Stabilisierung von PrP^C oder aber auf einer Konkurrenz mit einem Bindungspartner von PrP^C beruhen. Neben vollständigen, monoklonalen Antikörpern können klassische, monovalente Antikörperfragmente wie F_{ab} und scF_v oder aber konstruierte Formen für diese Aufgaben eingesetzt werden (Abb. 1.4). Während die Stärke der mAbs vor allem in ihrer Stabilität liegt, zeichnen sich F_{ab} und scF_v durch ihre stark verminderte Größe bei unveränderter Selektivität aus. Um die pharmakokinetischen Eigenschaften weiter zu verbessern, wurde entweder die Konstruktgröße bis zum *single domain*-Antikörper, welcher aus einer isolierten, variablen Domäne besteht, weiter verkleinert, oder aber eine Spezifität für ein zweites Ziel hinzugefügt (Abb. 1.4). Bivalente Konstrukte, wie etwa Diabodies, können so ein zweites Antigen binden, welches beispielsweise dem Passieren der Blut-Hirn-Schranke dient.

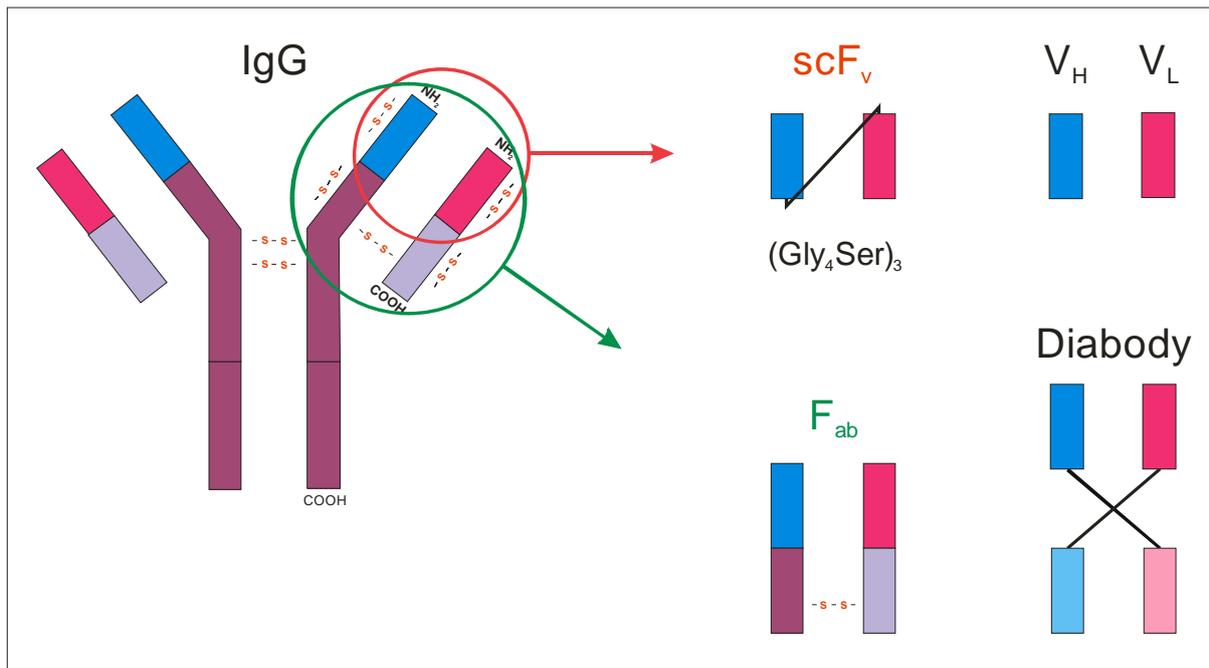


Abb. 1.4) Schematische Darstellung eines Immunglobulin G - Antikörpers, sowie verschiedener Antikörperfragmente

Dargestellt sind ein vollständiger Immunglobulin G (IgG) - Antikörper, sowie die monovalenten Antikörperfragmente F_{ab} , scF_v und V_H/V_L *single domain*-Antikörper, als auch ein bivalentes *Diabody*-Konstrukt. Variable, antigenbindende Domänen der schweren Kette sind in blau und die der leichten Kette in magenta wiedergegeben.

1.3.5.1 Der Prion-bindende Antikörper W226

Durch Immunisierung von *Knock-out*-Mäusen mit PrP^{Sc} entstand die Hybrididoma-Zelllinie W226. Der monoklonale Immunglobulin G (IgG) - Antikörper bindet Helix 1 in PrP^C mit subnanomolarer Affinität und besitzt im Tierversuch starke anti-Prion-Aktivität. Der aus den variablen Fragmenten klonierte Einzelstrang-Antikörper scF_v W226 zeigt dieselbe therapeutische Aktivität und weist im Biacore-Test eine Dissoziationskonstante von 4 nM auf (PD Dr. Carsten Korth, unveröffentlichte Ergebnisse).

2. Ziele

Wie in der Einleitung bereits erörtert wurde, verlaufen Prionerkrankungen letal und eine Therapie ist trotz intensiver Forschung nicht verfügbar. In bisher erfolgten Wirkstoffsuchen konnten zwar verschiedene Leitsubstanzen identifiziert werden, es sind aber keine strukturellen Informationen über den Komplex aus Wirkstoff und Zielprotein vorhanden, welche essenzielle Voraussetzungen für ein rationales Wirkstoffdesign sind.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, Strukturinformationen über die zelluläre Form des Prion Proteins im Komplex mit therapeutisch wirksamen Liganden zu gewinnen.

Insbesondere sollen hierzu mittels verschiedener biophysikalischer Methoden

- als wirksam beschriebene, kleine, organische Moleküle und Peptide auf ihre Wechselwirkung mit dem Prion Protein hin untersucht und
- die Binderegion des therapeutisch aktiven Antikörperfragmentes scF_v W226 mit seinem Epitop, der Helix 1 des Prion Proteins, strukturell charakterisiert werden.

Ferner sind die Struktur der kupferbindenden Oktarepeat-Region des Prion Proteins, welche in erhöhter Kopienzahl ebenfalls die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit auslöst, und die Details ihrer Wechselwirkung mit PrP^C und PrP^{Sc} von Interesse für mögliche diagnostische und therapeutische Anwendungen. Es ist daher ein weiteres Ziel dieser Arbeit, Methoden und Bedingungen zu identifizieren, die eine strukturelle Untersuchung der Oktarepeat-Region erlauben.

3. Materialien & Methoden

3.1 Bakterienstämme und Plasmide

Für die Expression rekombinanter Proteine wurden nachfolgend aufgeführte *E. coli*-Stämme verwendet:

Stamm	Genotyp
BL21 (DE3) pLysS	B, F ⁻ , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>gal</i> , λ(DE3) [pLysS (Cm ^R)]
BL21 Star TM (DE3)	B, F ⁻ , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>gal</i> , <i>rne131</i> , λ(DE3)
BL21 Rosetta TM (DE3)	B, F ⁻ , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>gal</i> , λ(DE3) [pRARE (Cm ^R)]
BL21 Rosetta-gami TM (DE3)	Δ(<i>ara-leu</i>)7697, Δ <i>lacX74</i> , Δ <i>phoA</i> <i>PvuII</i> , <i>phoR</i> , <i>araD139</i> , <i>ahpC</i> , <i>galE</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , λ(DE3) F' <i>[lac+ lacI^q pro]</i> <i>gor522::Tn10</i> (Tet ^R) <i>trxB</i> [pRARE (Cm ^R)]

E. coli BL21 (DE3) pLysS wurde zur Expression von huPrP(23-231), His₆-shPrP(23-231) und *single domain*-Antikörperkonstrukten verwendet, BL21 StarTM (DE3) und BL21 Rosetta-gamiTM (DE3) dienten ebenfalls der Expression von *single domain*-Konstrukten und rekombinantes scF_v W226-Protein wurde in BL21 RosettaTM (DE3) exprimiert.

Der pLysS-Stamm exprimiert T7-Lysozym, das geringe Mengen von T7-RNA-Polymerase bindet und dadurch die basale Expression senkt. BL21 RosettaTM (DE3) - Zellen entsprechen in ihrer genetischen Ausstattung BL21 (DE3), enthalten aber zusätzlich das Plasmid pRARE, welches tRNAs für seltene *E. coli*-Codons bereitstellt. Diese tRNAs verbessern die Expression rekombinanter Proteine aus Organismen, deren *codon usage* sich von *E. coli* unterscheidet. Die Nichtbeachtung der *codon usage* bei der Expression eukaryotischer Proteine kann zu Translationsproblemen führen (Makrides, 1996).

Zur Expression von huPrP(23-231) wurde ein pET17b-Vektor verwendet, den Herr Dr. Uwe Bertsch bereitgestellt hatte. Ein pET15b-Vektor, dessen Insert für His₆-shPrP(23-231) codiert,

wurde aus dem Labor von Prof. Dr. Dieter Willbold erhalten. Herr PD Dr. Carsten Korth stellte den Vektor pET22b-W226 zur Verfügung, der das W226 scF_v-Konstrukt als Insert enthält. Dieses folgt im selben Leseraster der pelB-Signalsequenz, die dem Export des translatierten Proteins in das Periplasma dient, um dort eine Ausbildung der intramolekularen Disulfidbrücken zu ermöglichen. Die *single domain*-Varianten des Antikörpers W226 wurden von Frau Christine Viehrig in die Vektoren pET22b und pET15b kloniert. Alle verwendeten Plasmide sind im Anhang aufgeführt (Kap. 10.1).

Aus der Arbeitsgruppe von PD Dr. Carsten Korth wurde rekombinantes 4OR-GST erhalten. Dieses Fusionsprotein aus der humanen Oktarepeat-Sequenz (4OR) und der Glutathion-S-Transferase aus *Schistosoma japonicum* (SjGST) war mit einem pGEX-4T-3 Vektor (GE Healthcare, Freiburg, D) exprimiert worden, welcher auf der Sequenz von SjGST basiert.

3.2 Oligodesoxyribonukleotide

Die für diese Arbeit verwendeten Oligodesoxyribonukleotide (Kap. 10.2) wurden von der Firma biomers.net GmbH (Ulm, D) mittels Festphasensynthese hergestellt, über HPLC-Chromatographie gereinigt und massenspektrometrisch charakterisiert. Die gefriergetrocknete DNA wurde in sterilem ddH₂O aufgenommen, so dass die Endkonzentration 100 pmol/μl entsprach.

3.3 Peptide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden kurze Peptide untersucht, die in Phagendisplay-Studien als PrP^C-bindend identifiziert worden waren. Diese Peptide wurden von Prof. Dr. Theodoros Sklaviadis (Universität Thessaloniki) zur Verfügung gestellt. Für Interaktionsstudien mittels NMR-Spektroskopie wurden diese, wie das vorgelegte ¹⁵N-His₆-huPrP(23-230), in 25 mM deuteriertem Natriumacetat, 10 % (v/v) D₂O, 0.01 % (w/v) NaN₃ und 0.1 % (w/v) DSS gelöst. Peptide für die exakte Epitopbestimmung in PrP-Helix 1 und ein aus dem PrP^C-bindenden Antikörper VRQ14 abgeleitetes Peptid wurden von der PANATecs GmbH (Tübingen, D) bezogen. Diese wurden in einem Festphasenverfahren synthetisiert, mittels RP-HPLC gereinigt und massenspektrometrisch analysiert.

Für spektroskopische Analysen wurden die Peptide im entsprechenden Puffer wie scF_v W226 bzw. wie PrP^C gelöst. Ungelöstes Material wurde durch Zentrifugation entfernt und die Konzentration der Lösung mittels Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt. Eine detaillierte Auflistung der verwendeten Peptide ist im Anhang aufgeführt (Kap. 10.3).

3.4 Transformation elektrokompenter Zellen

Im Zuge dieser Arbeit erfolgte die Transformation *via* Elektroporation. Zu 50 µl aufgetauten, elektrokompenten Zellen wurde 1 µl sequenziertes Plasmid pipettiert, vermischt und in eine 0.1 cm Elektroporationsküvette (BioRad, Hercules, CA, USA) überführt. Die Transformation erfolgte in einem MicroPulserTM Elektroporator (BioRad, Hercules, CA, USA) mittels 1.8 kV Puls. Dem Reaktionsansatz wurden anschließend 950 µl LB-Medium ohne Antibiotika hinzugefügt. Abhängig vom Kompetenzgrad der Zellen wurden entweder bereits hiervon 100 µl auf dem entsprechenden Selektivmedium ausplattiert, oder es folgte eine Zentrifugation (6.000 rpm, 4 min, 4 °C), um im Anschluss das Volumen auf 100 µl einzuengen, die pelletierten Zellen in diesem zu resuspendieren und auf Selektivmedium auszuplattieren. Transformations-Ansätze wurden bei 37 °C ÜN im Brutschrank (Modell 200, Memmert, Schwabach, D) inkubiert. Transformationen wurden unmittelbar vor einer Zellanzucht durchgeführt (Kap 3.6). Die Selektion erfolgreicher Tranformanten erfolgte über die plasmidvermittelte Ampicillin-Resistenz, weshalb allen festen und flüssigen Medien Ampicillin oder Carbenicillin zugesetzt wurde. Die *E. coli* Stämme BL21 (DE3) pLysS, BL21 RosettaTM (DE3) und BL21 Rosetta-gamiTM (DE3) wurden zusätzlich auf Chloramphenicol-Resistenz, der letztgenannte Stamm außerdem auf Kanamycin- und Tetracyclin-Resistenz selektiert. Hierbei wurden sterilfiltrierte Stammlösungen so eingesetzt, dass die Endkonzentration 100 µg/ml bei Ampicillin, 200 µg/ml bei Carbenicillin, 34 µg/ml bei Chloramphenicol, 15 µg/ml bei Kanamycin bzw. 12.5 µg/ml bei Tetracyclin betrug.

3.5 Bestimmung von Bakteriendichten

Das Wachstum von Zellsuspensionen wurde anhand der optischen Dichten (OD) bei 600 nm mit einem Uvikon 930 UV/VIS-Zweistrahlspektrophotometer (Kontron Instruments,

München, D) in Halb-Mikro-Küvetten (Polystyrol, 1 cm Schichtdicke, Sarstedt, Nümbrecht, D) verfolgt. Als Referenz und zur Verdünnung diente das jeweilige Nährmedium, wobei die Verdünnungen so gewählt wurden, dass die Messungen im linearen Bereich des Photometers, typischerweise $OD_{600} < 1$, erfolgten. Eine OD_{600} von 1 entspricht dabei einer Zelldichte von $\sim 10^9$ Zellen/ml.

3.6 Herstellung von rekombinantem PrP^C und scF_v W226

3.6.1 Überexpression und Reinigung von Prion Proteinen

Prion Proteine, wie His₆-huPrP(23-230), huPrP(23-231) und shPrP(23-230) wurden als *inclusion bodies* exprimiert. Die Zellen wurden nach Standardprotokollen (Sambrook *et al.*, 1989) in Schüttelkulturen bis zu einer $OD_{600} = 0.7$ angezogen, durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und nach 4 - 5 h geerntet. Die ¹⁵N-Isotopenmarkierung von Prion Proteinen wurde nach der Methode von Marley *et al.* (2001) durchgeführt.

Die Reinigung erfolgte unter denaturierenden Bedingungen und umfasste eine oxidative Rückfaltung des auf einer Nickelaffinitätssäule (Ni-NTA Superflow, Qiagen, Hilden, D; HisTrap HP, GE Healthcare, Freiburg, D) immobilisierten Proteins. Gereinigtes Prion Protein wurde gegen ddH₂O dialysiert und an einer Christ Alpha 1-4 Gefriertrocknungsanlage (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D) zur Lagerung lyophilisiert. Die Probengefäße wurden zur Vermeidung von PrP-haltigen Aerosolen mit Steriflip[®]-Kappen (0.22 µm, Millipore, Bedford, MA, USA) versehen und die Proteinlösungen in flüssigem Stickstoff gefroren. Die so vorbereiteten Proben wurden je nach Volumen für ca. 48 h gefriergetrocknet. Die Rückfaltung folgte der Veröffentlichung von Donne *et al.* (1997).

Bei der Reinigung von Prion Proteinen verschiedener Spezies und verschiedener Längen wurden die pH-Werte der verwendeten Puffer und die eingesetzten Proteinkonzentrationen an die unterschiedlichen isoelektrischen Punkte (pI) und das Aggregationsverhalten der verschiedenen Konstrukte angepasst. Während die hier beschriebenen Vollängen-Konstrukte ähnlich hohe pI-Werte im Bereich von 9.0 bis 9.5 aufweisen und die Reinigung unterhalb des isoelektrischen Punktes bei pH-Werten von typischerweise pH = 5.8 erfolgte, besitzen verkürzte Konstrukte, wie PrP (90-230) und PrP (121-230) saure pI-Werte und wurden daher oberhalb von diesem bei pH = 8.0 gereinigt.

3.6.2 Überexpression und Reinigung von isotopenmarkiertem scF_v W226

E. coli BL21 RosettaTM (DE3) - Zellen wurden frisch mit pET22b-W226 transformiert, eine LB-Vorkultur wurde hiermit angeimpft und ÜN inkubiert. Nachfolgend wurde eine M9-Vorkultur über Tag angezogen und ÜN im Kühlschrank gelagert. Die Hauptkultur wurde 1:50 mit dieser Vorkultur angeimpft und bei 37 °C bis OD₆₀₀ ~ 1.4 inkubiert (10 l-BIOSTAT[®]B-Fermenter, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D). Nach dem Absenken der Temperatur auf 30 °C erfolgte die Induktion durch Zugabe von 250 µM IPTG. Nach 40 min wurde durch Zufügen von 100 µg/ml Rifampicin die bakterielle RNA-Polymerase gehemmt. Die Zellen wurden nach 4 h geerntet und das Pellet ÜN bei -20 °C gelagert.

Die Pellets wurden angetaut (4 °C, 30 min) und je Liter Kultur in 20 ml (50 mM Tris pH 8, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF) resuspendiert (4 °C, 60 min). Anschließend wurde zur Lyse 1 % Triton X-100 und 1 mg/ml Lysozym hinzugegeben und auf einem Überkopfschüttler durchmischt (RT, 30 min). Nach Zugabe von 20 mM MgCl₂ und 1.000 U DNaseI wurde für weitere 30 min gemischt. Die Suspension wurde auf 50 ml (20 mM Tris pH 8, 5 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 1 % Triton X-100, 1 mM PMSF) aufgefüllt und 20 min bei 18.000 g (Rotanta 430 R, Hettich, Tuttlingen, D) pelletiert.

Der Überstand wurde auf eine frisch mit 100 mM NiSO₄ beschickte 5 ml HisTrap HP - Säule (GE Healthcare, Freiburg, D) geladen (1 ml/min) und mit 5 Säulenvolumina (SV) 20 mM Tris pH 8, 5 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 1% Triton X-100 äquilibriert (5 ml/min).

1. Waschschrift: 10 SV Äquilibrierungspuffer (5 ml/min; 10 min)
2. Waschschrift: 5 SV 20 mM Tris pH 8, 30 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 1% Triton (5 ml/min, 5 min)
3. Waschschrift: 10 SV 20 mM Tris pH 8, 5 mM Imidazol, 1 M NaCl (5 ml/min, 10 min)

Die Elution erfolgte in fünf Fraktionen mit je 5 SV 20 mM Tris pH 8, 300 mM Imidazol, 300 mM NaCl. Jeder Fraktion wurden 2 mM EDTA und 1 mM PMSF zugefügt.

Die weitere Reinigung wurde an einer Affinitätschromatographiesäule *via* immobilisiertem shPrP(23-231) vorgenommen (Kap. 3.6.3). Die Säule wurde mit TBSTE (20 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 % (v/v) Tween-20) äquilibriert (5 SV), anschließend unter *gravity flow* sequenziell mit dem Eluat der vorangegangenen Nickelaffinitätschromatographie beladen und gründlich mit TBS (20 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl) gewaschen (10 SV). Es wurde dreimal mit je 5 ml Glycin (50 mM, pH 2.5) eluiert, wobei in das Auffanggefäß zur

Neutralisierung je 500 µl 1 M Tris pH 8.8 vorlegt wurden. Die Säule wurde sofort mit TBSTE re-äquilibriert (5 SV), das Eluat sterilfiltriert, gegen Natrium-Phosphat (10 mM, pH 7.0) dialysiert und anschließend konzentriert.

3.6.3 Affinitätschromatographie mit immobilisiertem PrP

Die Reinigung des scF_v W226 (Kap. 3.6.2) umfasste die Verwendung einer Antigen-Immunoaffinitätssäule, auf der rekombinantes His₆-shPrP(23-231) immobilisiert worden war. Hierzu wurden 3 ml *N*-Hydroxysuccinimid-Sepharose (GE Healthcare, Freiburg, D) zu 35 ml vorgekühlter 1 mM HCl gegeben, vorsichtig vermischt und 2 min bei 3.000 g und 4 °C (Rotanta 430 R, Hettich, Tuttingen, D) pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und der Matrix das vorbereitete Protein zugefügt. Das verwendete His₆-shPrP(23-231) war, wie unter 3.6.1 beschrieben, exprimiert, gereinigt, und rückgefaltetes Protein gegen ddH₂O dialysiert worden. Alle weiteren Schritte wurden den Herstellerangaben (GE Healthcare, Freiburg, D) entsprechend ausgeführt.

3.7 Elektrophoretische Verfahren

3.7.1 SDS-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese wurden Proben auf ihre Proteinzusammensetzung, Proteingröße und Reinheit untersucht. Es wurden 15 % SDS-Gele (Kap. 10.2.2) in Kombination mit SDS-Laufpuffer (Tab. 10.1) in einer Mighty Small II SE250/SE260 Elektrophoresekammer (Hofer/Pharmacia, Freiburg, D) verwendet. Der Auftrags- und Denaturierungspuffer Roti[®]-Load 1, 4 x (Roth, Karlsruhe, D) wurde mit ddH₂O 1:1 (v/v) verdünnt und den Proben im 1:1-Volumenverhältnis zugegeben. Als Standard wurden 4 µl *low range* BioRad-Proteinstandard (BioRad, München, D) mit 96 µl Roti[®]-Load 1, 1 x (Roth, Karlsruhe, D) zusammengefügt. Auf die Gele wurden je Tasche 10 µl Probe bzw. 7 µl Standard aufgetragen. Die Proben wurden zuvor 5 min bei 100 °C in einem Blockthermostat BT 100 (Kleinfeld Labortechnik, Gehrden, D) denaturiert. Ein EPS 301 Netzgerät (Pharmacia, Freiburg, D) wurde der Anzahl der Gele entsprechend auf eine konstante

Feldstärke programmiert. Gefärbt wurden die Gele für 30 min in Coomassie-Färber (Tab. 10.1), danach für 30 min in Entfärber I und bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrunds in Entfärber II eingelegt und auf einem ST 5 Schüttler (CAT, Stauf, D) geschüttelt.

3.7.2 Induktionsgele

Die Induktionsgele entsprachen in der Durchführung der SDS-Gelelektrophorese (Kap. 3.7.1). Die Abweichungen hiervon betrafen ausschließlich die Probenvorbereitung. Es wurde unmittelbar vor der Induktion und anschließend stündlich bis zur Ernte je ein Volumen entnommen, welches einem OD₆₀₀-Wert von 1 entsprach. Die Proben wurden jeweils direkt nach ihrer Entnahme zentrifugiert (14.000 rpm, 2 min), der Überstand verworfen und das Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Pellets wurden in je 100 µl 1 x Roti[®]-Load 1 (Roth, Karlsruhe, D) gründlich resuspendiert (TTS 2 Mixer, IKA, Wilmington, NC, USA), 5 min bei 100 °C denaturiert (Blockthermostat BT 100, Kleinfeld Labortechnik, Gehrden, D), erneut vollständig durchmischt und weitere 5 min bei 100 °C denaturiert. Unmittelbar vor dem Auftragen der Proben wurde 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert.

3.8 Charakterisierung von Proteinen

Neben den elektrophoretischen Methoden dienten vor allem spektroskopische Methoden der Proteincharakterisierung.

3.8.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde die Absorption bei 280 nm an einem Uvikon 930 UV/VIS-Zweistrahlenspektrophotometer (Kontron Instruments, München, D) in Schwarzwand-Quarzküvetten mit 1 cm Schichtdicke (Hellma, Mühlheim, D) gemessen. Als Referenz und zur Verdünnung diente ddH₂O, wobei die Verdünnungen so gewählt wurden, dass die Messungen im linearen Bereich des Photometers erfolgten. Ausgehend vom Lambert-Beer'schen-Gesetz, ließen sich die Proteinkonzentrationen berechnen. Dabei wurden die molaren Extinktionskoeffizienten auf Basis der Aromatenabsorption der enthaltenen

Tryptophane und Tyrosine, sowie der Anzahl der Disulfidbrücken (Pace *et al.*, 1995) mit der im Internet verfügbaren Software ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) für wässrige Puffer bestimmt:

$$\varepsilon(280)\text{H}_2\text{O} = 5500 (\# \text{ Trp}) + 1490 (\# \text{ Tyr}) + 125 (\# \text{ Cystine}) \quad (\text{Gl. 4.1})$$

3.8.2 CD-Spektroskopie

Mit Hilfe CD-spektroskopischer Untersuchungen wurde die korrekte Faltung rekombinanter Proteine überprüft. Hierfür wurden Fern-UV-CD-Spektren an einem Circular dichrograph J-810 (Jasco, Groß-Umstadt, D) in einer Quarzküvette (Hellma, Mühlheim, D) mit einer Schichtdicke von 1 mm aufgenommen. Das Protein lag in 10 mM Natrium-Phosphat (pH 7.0) vor, wobei derselbe Puffer als Referenz diente. Die Spektren wurden über einen Wellenlängenbereich von 260-185 nm mit einer Bandbreite von 1 nm, einer Auflösung von 1 nm, einer Empfindlichkeit von 100 mdeg und einer Messgeschwindigkeit von 20 nm/min gemessen. Es wurden jeweils acht Spektren akkumuliert und um das Pufferspektrum korrigiert. Die aus dem Differenzspektrum erhaltene Elliptizität θ wurde mit Hilfe von Gleichung 4.3 (Schmid, 1989) in die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest $[\theta]_{\text{MRW}}$ umgerechnet und gegen die Wellenlänge aufgetragen.

$$[\theta]_{\text{MRW}} = \frac{\theta \cdot 100}{c \cdot d \cdot N_{\text{AS}}} \quad (\text{Gl. 4.2})$$

c: Proteinkonzentration (in mol/l); **d:** Schichtdicke der Küvette (in cm); **N_{AS}:** Anzahl der Aminosäuren; **θ :** gemessene Elliptizität (in deg); **$[\theta]_{\text{MRW}}$:** mittlere molare Elliptizität pro Aminosäurerest (deg cm² d mol⁻¹)

Sekundärstrukturvorhersagen wurden mit dem im Internet verfügbaren Programm DICHROWEB (<http://www.cryst.bbk.ac.uk/cdweb/html/home.html>) durchgeführt (Whitmore & Wallace, 2004).

3.8.3 Fluoreszenz-Spektroskopie

Proben für die Fluoreszenz-Spektroskopie wurden in Natrium-Phosphat-Puffern vorbereitet und unlösliche Partikel vor der Messung durch Zentrifugation (14.000 rpm, 4 min) entfernt. Fluoreszenz-Experimente wurden bei 25 °C an einem Fluorolog-3-τ-Spektrometer (Spex-Horiba-Jobin Yvone, München, D) durchgeführt, welches mit einem automatischen Microlab[®] 500 Titrator (Hamilton, Bonaduz, CH) ausgestattet war. Die als Messsonde verwendete Tryptophanfluoreszenz wurde bei 295 nm mit einer Bandbreite von 2.5 nm angeregt und bei 350 nm mit einer Bandbreite von 5 nm detektiert.

In die Fluoreszenzrührküvette (1 cm Pfadlänge, Hellma, Mühlheim, D) wurden 2 ml Proteinlösung vorgelegt und die Testsubstanz bei mittlerer Rührgeschwindigkeit automatisch hinzugefügt, wobei sich das Volumen um maximal 5 % (v/v) des Ausgangsvolumens erhöhte. In einem typischen Teilschritt wurden nach einer Mischzeit von 45 s 20 Datenpunkte, mit einer Dauer von je 0.5 s, aufgenommen.

3.8.3.1 Auswertung von Fluoreszenztitrationen

Die Daten wurden um den jeweiligen Verdünnungsfaktor korrigiert und mit dem Programm GraFit 3 (Erithacus Software Ltd., Staines, UK) anhand folgender Gleichung ausgewertet, welche die Bindung an einer Bindungsstelle berücksichtigt (Goodrich & Kugel, 2006):

$$F = F_{\min} + \frac{(p + L + K_d - \sqrt{(p + L + K_d)^2 - 4 * p * L}) * (F_{\max} - F_{\min})}{2 * p} \quad (\text{Gl. 4.3})$$

F: beobachtete Fluoreszenz; **F_{min}:** Fluoreszenz des freien Proteins; **F_{max}:** Fluoreszenz des Proteins im Komplex; **p:** Konzentration des Proteins (in M); **L:** Konzentration des Liganden (in M); **K_d:** Dissoziationskonstante (in M)

3.8.4 NMR-Spektroskopie

Die Magnetische Kernresonanz (NMR) - Spektroskopie wurde in dieser Arbeit zur Kontrolle der korrekten Faltung rekombinanter Prion Proteine und Antikörper, für Titrationsstudien und zur Strukturanalyse angewandt.

Wenn nicht anders angegeben, lagen die untersuchten Proben entweder in 25 mM deuteriertem Natriumacetat oder in 10 mM Natrium-Phosphat, pH 7.0 vor. Der pH-Wert wurde mit der entsprechenden Säure oder Base nachgestellt. Als Lock-Substanz diente 10 % (v/v) D₂O und 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat (DSS) wurde als interner Standard zur Referenzierung der chemischen Verschiebungen eingesetzt. Zur Vorbeugung von bakteriellem Wachstum wurde den Proben 0.01 % (w/v) Natriumazid zugefügt. Im Fall von HSQC-Titrationsen wurden die zu untersuchenden Liganden im identischen Puffer gelöst und der pH-Wert auf 0.02 Einheiten genau eingestellt. Alle Proben wurden vor der Messung zentrifugiert (14.000 rpm, 4 min), um Feststoffe aus den Proben zu entfernen. Nach erfolgter Messung wurde der pH-Wert der Probe erneut kontrolliert, um den Einfluss eines schwankenden pH-Werts auf die Messung ausschließen zu können. Alle Experimente mit dem Antikörperfragment W226 wurden bei 35 °C durchgeführt, während Bindungsstudien an humanen Prion Protein bei 20 °C und für shPrP bei 25 °C erfolgten. Die Messungen wurden an NMR-Spektrometern der Baureihen DRX und AVANCE mit Protonenfrequenzen von 400, 600, 700, und 800 MHz (Bruker, Karlsruhe, D) durchgeführt (Kap. 10.6.4).

Für den Schnelltest wurden *inversion recovery*-Experimente verwendet. Zur Gewährleistung einer vollständigen Relaxation wurde ein verlängertes Intervall von 8 s zwischen den einzelnen Messungen genutzt. Die Experimente wurden jeweils fünf Mal mit den Relaxationsintervallen 0.1 s, 0.75 s, 1.3 s, 1.9 s und 2.5 s durchgeführt, wobei eine optimierte Samplingstrategie (Eisenmann *et al.*, 2004) Anwendung fand. Die Wasserunterdrückung erfolgte durch Vorsättigung während des *Recycle-Delays*.

Zur sequenziellen Zuordnung der Rückgratresonanzen wurden mit einer ²H/¹³C/¹⁵N-markierten Probe des scF_v W226 TROSY (*transverse relaxation-optimized NMR spectroscopy*)-Varianten (Pervushin *et al.*, 1997) von HNCO-, HNCA-, HN(CA)CO-, HN(CO)CA-, HNCACB- und HN(CO)CACB-Spektren aufgenommen (Kap. 10.10) (Grzesiek *et al.*, 1992; Wittekind & Müller, 1993; Muhandiram & Kay, 1994).

Für die Interaktionsstudien wurden ¹H, ¹⁵N-HSQC-Experimente durchgeführt, wobei zur Wasserunterdrückung typischerweise die WATERGATE-Sequenz (Sklenar *et al.*, 1993) Einsatz fand.

Pulslängen und -leistungen wurden jeweils auf die entsprechende Probe unter Verwendung der Wasserresonanz kalibriert. Spektrale Weiten wurden für das entsprechende Experiment optimiert. Die Prozessierung der Daten erfolgte anhand lehrstuhlinterner Programme (Schweimer, 2000). Die Auswertung der *inversion recovery*-Experimente wurde mit dem Programm MATLAB (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA) durchgeführt.

3.9 Kristallisation von 4OR-GST

Alle Kristallisationsansätze wurden bei 18 °C unter Verwendung von Iwaki-Kristallisationsplatten für 24 Proben und einem Reservoirdurchmesser von 16 mm (Iwaki, Scitech Div., Asahi Techno Glass, Japan) oder CrystalQuick®-Kristallisationsplatten für 96 Proben (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D) in Kombination mit der *hanging drop*- bzw. *sitting drop*-Technik durchgeführt.

Ausgehend von veröffentlichten Kristallisationsbedingungen (Lim *et al.*, 1994; McTigue *et al.*, 1995; Andujar-Sanchez *et al.*, 2005) für Glutathion-S-Transferase aus *Schistosoma japonicum* (SjGST) wurden Kristallisationsansätze mit Ammoniumsulfat bzw. Polyethylenglykol (PEG) als Hauptpräzipitanz durchgeführt. Die Reservoirlösungen enthielten 0.8 M, 1.6 M, 2.4 M und 3.1 M Ammoniumsulfat und wurden jeweils mit 0.1 M Puffersystemen (pH 4 - pH 9) bzw. 10 % (w/v) - 50 % (w/v) PEG 3350 jeweils mit 0.1 M Puffersystemen (pH 5 - pH 8) kombiniert. Anwendung fand das Dampfdiffusionsverfahren mit der *hanging drop*-Methode mit 500 µl Reservoirvolumen und 4 µl Tropfenvolumen (2 µl Reservoirlösung + 2 µl SjGST-4OR, 7 mg/ml in 10 mM Natrium-Phosphat, pH 7.5, 150 mM NaCl). Ebenfalls durchgeführt wurde ein sogenannter Index™ Screen (Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA) in Kombination mit der mit der *sitting drop*-Methode.

4. Ergebnisse

4.1 Kleine anti-Prion-Wirkstoffe

Es wurden im Rahmen dieser Arbeit kleine, organische Moleküle auf ihre Wechselwirkung mit dem Prion Protein untersucht, die, wie in Zellkulturmodellen gezeigt wurde, antiprional wirksam sind. Des Weiteren wurden Interaktionsstudien mit kleinen Peptiden, die in Phagendisplay-Studien von Prof. Dr. Theodoros Sklaviadis (Universität Thessaloniki) als PrP^C-bindend identifiziert worden waren, durchgeführt. Schließlich wurde ein Peptid getestet, welches aus den variablen Schleifen eines PrP^C-bindenden Antikörpers abgeleitet wurde.

4.1.1 Substanz 293G02 löscht NMR-Signale der globulären PrP^C-Domäne in NMR-Spektren

In einem Hochdurchsatz-Test hat die Gruppe von Prof. Dr. Kretzschmar 10.000 pharmazeutisch relevante, organische Substanzen auf ihre Bindung an das Prion Protein mittels SIFT (*scanning for intensely fluorescent targets*) analysiert und die aussichtsreichsten Substanzen in scrapieinfizierten Zellkulturen auf ihre anti-Prion-Wirksamkeit getestet (Bertsch *et al.*, 2005). Die wirksamste Substanz, 293G02, wurde hier mittels NMR-Spektroskopie auf eine mögliche Bindung an PrP^C untersucht.

Die schlechte Löslichkeit von 293G02 in wässrigen Puffern verhinderte die Herstellung einer geeigneten Stammlösung für eine NMR-HSQC-Titration. Basierend auf der Überlegung, dass nur wenig 293G02 in Lösung geht, das gelöste 293G02 dann aber an das Prion Protein bindet, wurde eine Probe von ¹⁵N-markiertem huPrP(23-231) mit festem 293G02 versetzt, bei RT 1 h lang inkubiert und unlösliche Substanz abzentrifugiert. Der Vergleich mit dem HSQC-Spektrum vor der Zugabe zeigt, dass Resonanzen der globulären Domäne des PrP verschwinden, während die des unstrukturierten Aminoterminus keine Veränderungen zeigen (Abb. 4.1).

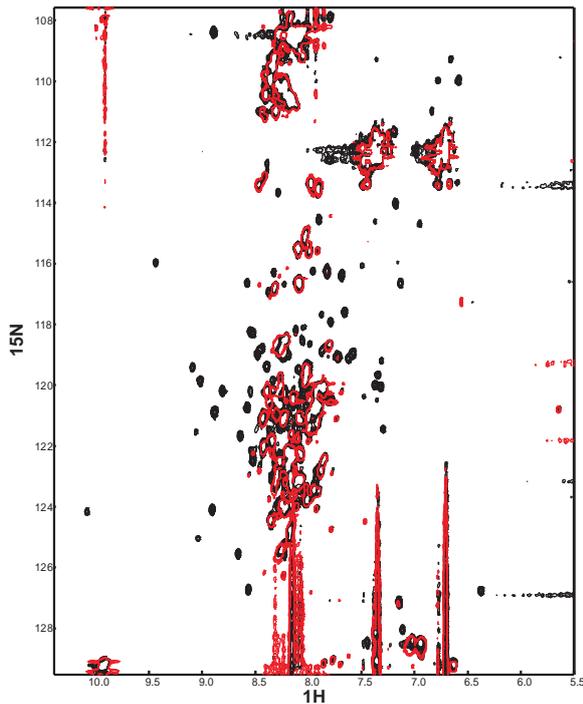


Abb. 4.1) Effekte des Wirkstoffes 293G02 auf das ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektrum von huPrP(23-231)

Die HSQC-Spektren für huPrP(23-231) in Abwesenheit (schwarz) und Gegenwart (rot) von 293G02 zeigen einen nahezu vollständigen Verlust der Signale der strukturierten, globulären Domäne des Prion Proteins, die im Spektrum außerhalb des Zentrums von 8.5 - 7.5 ppm der Protonendimension liegen (Messbedingungen: pH 6.1; ca 100 μM ^{15}N -huPrP(23-231); 293 K; 700 MHz; CryoProbeTM).

4.1.2 Quinpramin bindet nur sehr schwach an PrP^C

Zur Klasse der Quinacrin-Konjugate gehört die Substanz Quinpramin, die eine fünffach höhere anti-Prion-Wirkung als Quinacrin besitzt (Klingenstein *et al.*, 2006). Obwohl Quinpramin eine bessere Löslichkeit als das bereits untersuchte Bisacridin PAC 01 (Mangels, 2004) besitzt, konnte eine NMR-Titration nur bis zu einer Endkonzentration von 640 μM durchgeführt werden. Der Vergleich von HSQC-Spektren für ^{15}N -huPrP(23-231) in Abwesenheit und Gegenwart der antiprionalen Substanz zeigte bei fünffachem Überschuss schwache Verschiebungen, die wie bei Quinacrin auf eine Bindung im millimolaren Bereich schließen lassen. In Fluoreszenzstudien ließ sich keine direkte Bindung nachweisen (Daten nicht gezeigt).

4.1.3 Peptide aus einer Phagendisplay-Bibliothek binden im NMR-Assay nicht an PrP^C

Als weitere potenzielle Wirkstoffklasse wurden kurze Peptide mittels NMR-Spektroskopie auf Interaktionen mit PrP^C untersucht. Mit einer Phagendisplay-Bibliothek waren in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Theodoros Sklaviadis Peptide gesucht worden, die eine Wechselwirkung mit dem Prion Protein zeigen. Für die ermittelten Peptide I, II, III und IV

(Tab. 4.1) konnte im *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) eine Bindung an das Prion Protein bestätigt werden (Prof. Dr. Theodoros Sklaviadis, unveröffentlichte Ergebnisse).

Tab. 4.1: Peptide aus Phagendisplay-Studien von Prof. Dr. Theodoros Sklaviadis.

Wiedergegeben sind die Sequenzen der in den NMR-spektroskopischen Bindungsstudien verwendeten Peptide, sowie deren Überschuss gegenüber der eingesetzten Konzentration an ^{15}N -His₆-huPrP(23-230).

Peptid I:	LPLTPLP, freie Termini	36 x Überschuss gegenüber PrP
Peptid II:	ATTRTLPGGG, freie Termini	13 x Überschuss gegenüber PrP
Peptid III:	LMPHSSQGGG, freie Termini	21 x Überschuss gegenüber PrP
Peptid IV:	KCCYPVPGGG, freie Termini	19 x Überschuss gegenüber PrP

Eine Wechselwirkung mit ^{15}N -His₆-huPrP(23-230) konnte trotz der hohen eingesetzten Peptidkonzentrationen (typischerweise > 0.5 mM) in ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektren für alle vier Peptide nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

4.1.4 Ein Peptid mit den Bindemotiven aus F_{ab} VRQ14 zeigt keine Bindung im NMR-Versuch

Der F_{ab} VRQ14 bindet ovines Prion Protein im Bereich der letzten zwei Windungen der PrP-Helix 2, wobei diese Interaktion hauptsächlich über zwei variable Schleifen des F_{ab}-Fragmentes vermittelt wird. Um zu testen, ob kurze Peptide grundsätzlich mit hoher Affinität an das Prion Protein binden können, wurde, basierend auf der Kristallstruktur von VRQ14 mit PrP (Eghiaian *et al.*, 2004; PDB-Eintrag 1TQB), ein Peptid entworfen (Abb. 4.2), das die beiden Bindemotive des Antikörpers enthielt. Um die Aggregationstendenz des Peptids zu reduzieren, wurde das antiparallele β -Faltblatt, das die beiden Motive trennt, entfernt. Die Binderegionen wurden durch eine verkürzte Schleife verbunden, die vorher die beiden Faltblatt-Stränge verband. Das resultierende Peptid besitzt die Sequenz Ac-DSGKTYSPGQSYLVSR-CONH₂.

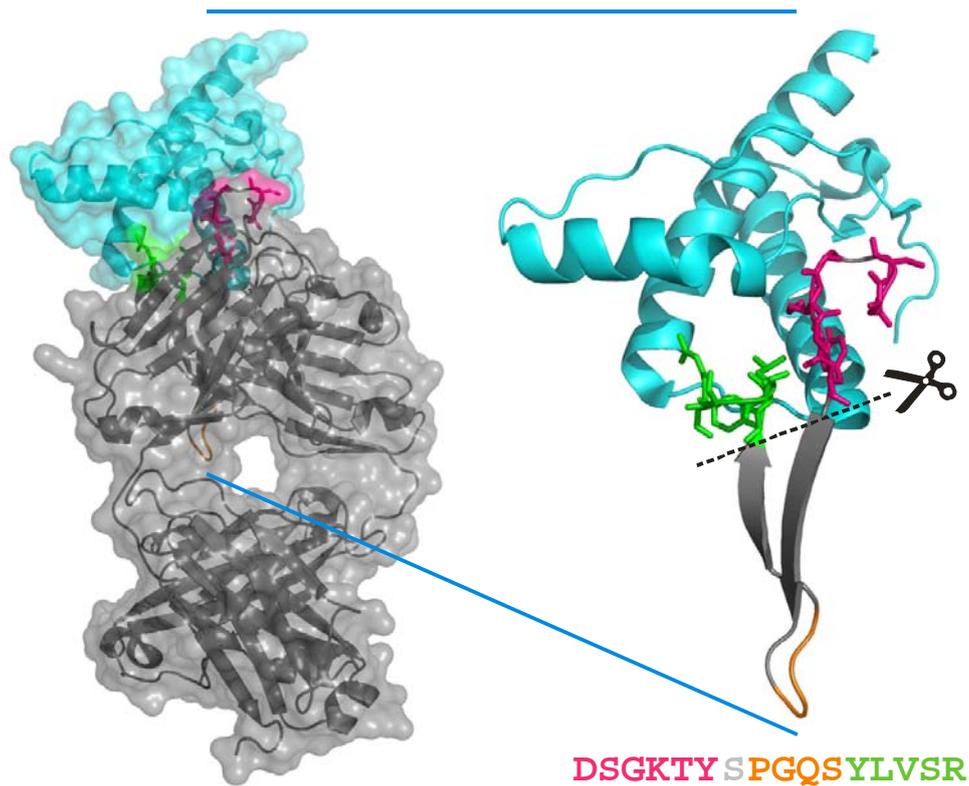


Abb. 4.2) Struktur des F_{ab} VRQ14 im Komplex mit PrP^C

Dargestellt sind der Komplex (links) aus F_{ab} VRQ14 (grau) und PrP^C (hellblau) und in der Vergrößerung (rechts) die Motive der CDR 1 (magenta) und CDR 2 (grün) der leichten Kette, sowie die Schleifen-Region (orange), die im abgeleiteten Peptid (Sequenz angegeben) die beiden Motive verbindet. Die Abbildung basiert auf der Kristallstruktur von Eghiaian *et al.* (2004), PDB-Eintrag 1TQB und wurde mit dem Programm PyMOL (DeLano Scientific LLC, San Francisco, CA, USA) erstellt.

Eine HSQC-Titration des Peptids (PANATEcs GmbH, Tübingen, D) mit ¹⁵N-huPrP(23-231) bis zu einem 20-fachen Überschuss an Peptid ergab allerdings auch in diesem Fall keine sichtbaren Änderungen zum Basisspektrum ohne Peptid-Zugabe (Daten nicht gezeigt).

4.2 Die schwache Bindung von Acridinen kann in einem NMR-Schnelltest zum Nachweis großer Proteinkomplexe eingesetzt werden

Mittlerweile ist eine Anzahl an Liganden des Prion Proteins aus verschiedenen Untersuchungen bekannt, deren strukturelle Charakterisierung, beispielsweise mittels NMR-Spektroskopie, für die Leitsubstanzfindung von Interesse ist. Hierfür müssen aber die experimentellen Bedingungen, wie Protein- und Ligandenkonzentrationen, sowie Ionen- und Pufferstärken, für die NMR-Spektroskopie angepasst werden. Um den Zeitaufwand für die Reinigung großer Mengen an Protein und die Messdauer mehrdimensionaler NMR-Experimente zu verringern, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Schnelltest entwickelt, der es ermöglicht, in kurzer Zeit und bei kleinem Probenbedarf zu ermitteln, ob sich Interaktionsstudien unter NMR-Bedingungen durchführen lassen.

Ausgehend von dem T_1 -Zeit basierten NMR-Test von Ludwiczek *et al.* (2004) konnte dieser unter Verwendung früherer Ergebnisse (Mangels, 2004) weiter optimiert werden. 9-Aminoacridin (9-aa) dient hier als Reporter für Interaktionen des Prion Proteins mit weiteren Proteinen. Über die Messung der T_1 -Relaxationszeit mittels vergleichsweise einfacher, eindimensionaler ^1H -*inversion recovery*-NMR-Experimente kann die Bindung von 9-Aminoacridin an PrP^{C} nachgewiesen werden. Obwohl 9-aa nur transient an das Prion Protein bindet, genügt die kurzzeitige Bildung eines Komplexes von sehr großer Molekülmasse, da die dadurch erfolgte Zunahme der Molaren Masse zu einer verkürzten Relaxationszeit für 9-aa führt. Bindet ein Interaktionspartner des Prion Proteins an diesen Komplex, nimmt die Relaxationszeit weiter ab und ermöglicht so den Nachweis der Interaktion (Abb. 4.3 a).

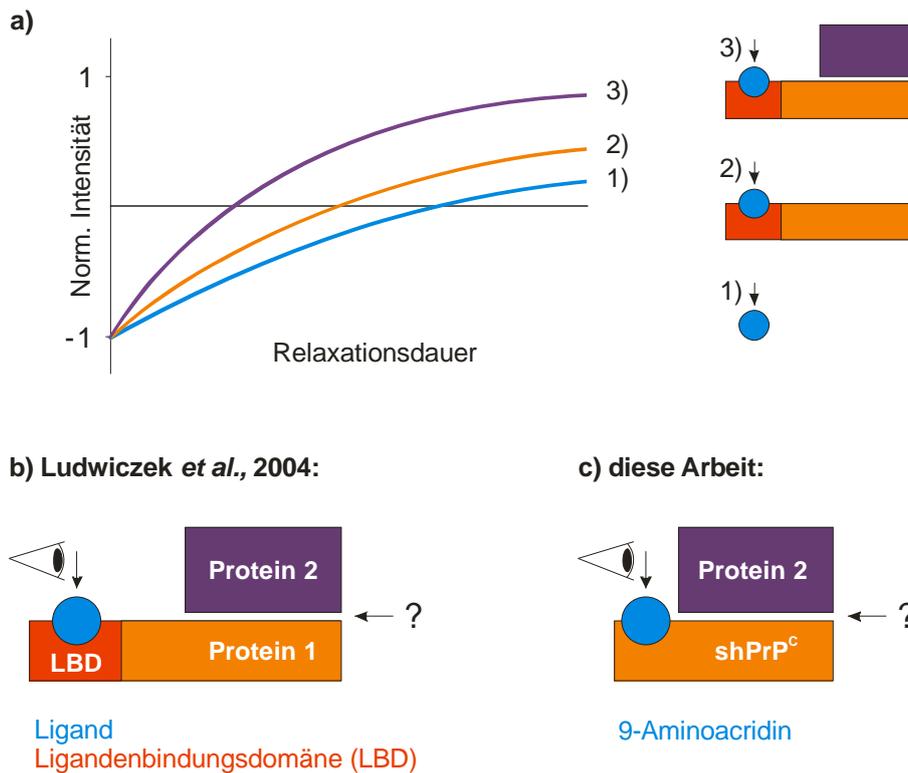


Abb. 4.3) Schematische Darstellung des dem Schnelltest zugrunde liegenden Messprinzips

a) Gezeigt ist die schematische Darstellung eines typischen langsamen Relaxationsverhaltens für ein kleines, organisches Molekül (1). Bindet dieser Ligand an ein Protein, führt die Zunahme der Molaren Masse zu einer Verkürzung der Relaxationszeit (2). Bildet sich nun durch Interaktion mit einem weiteren Protein ein Biomakromolekül-Komplex, nimmt die Relaxationszeit weiter ab (3).

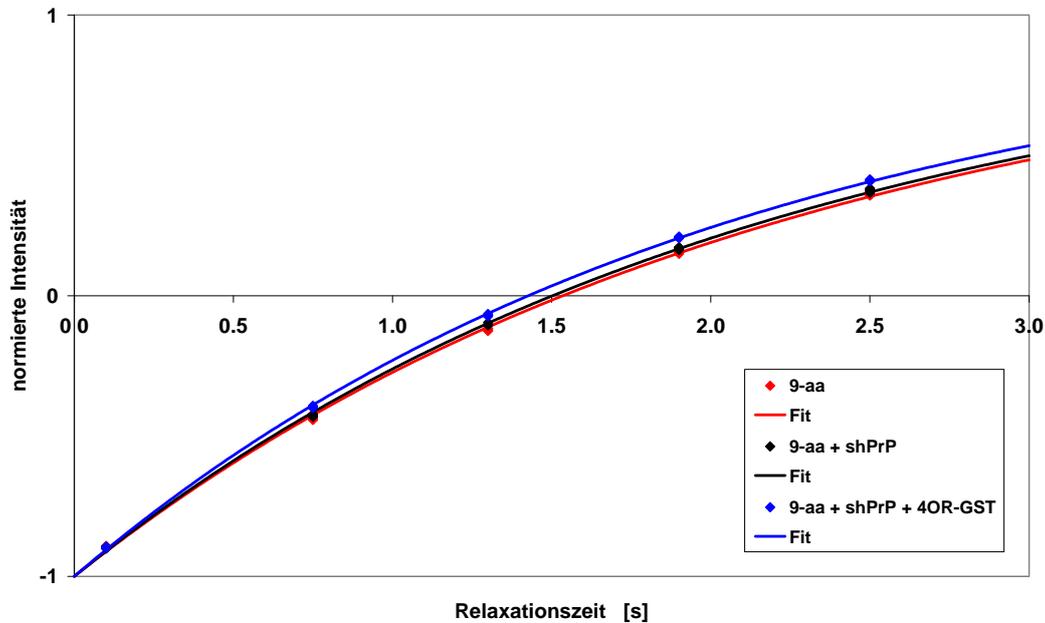
b) In dem von Ludwiczek *et al.* (2004) publizierten Test wird zur Untersuchung der Interaktion zweier Proteine (Protein 1 & Protein 2) an das Protein 1 eine Ligandenbindungsdomäne (LBD) kloniert. Diese bindet das organische Reportermolekül, dessen Relaxationsverhalten charakterisiert wird.

c) Der im Zuge dieser Arbeit modifizierte Schnelltest verzichtet auf eine Ligandenbindungsdomäne und nutzt die intrinsische, schwache Affinität von 9-Aminoacridin (blau) an oberflächenexponierte Doppelaromatenmotive in PrP^c (orange).

Für die Bindung von vier isolierten Oktarepeats des Prion Proteins (4OR) an PrP^c konnte gezeigt werden, dass diese sowohl vom pH-Wert, als auch von der Anwesenheit von Metallionen abhängig ist (Leliveld *et al.*, 2006). Ein Bindungstest zwischen dem 4OR-Motiv, gekoppelt an SjGST (4OR-GST), und His₆-shPrP(23-231) wird durch die Aggregation des Vollängen Prion Proteins bei pH-Werten über 5.5 und die Größe des Komplexes eingeschränkt. Bindungstests sind daher nur bis zu einem pH-Wert von 5.5 möglich. Hier sollte die Frage geklärt werden, ob unter diesen Bedingungen eine Bindung noch mittels

hochaufgelöster NMR-Spektroskopie beobachtbar ist. Gemessen wurden dazu die Relaxationszeiten von 9-aa, 9-aa + shPrP, 9-aa + 4OR-GST und 9-aa + shPrP + 4OR-GST. Als Kontrollen wurden zusätzlich shPrP und 4OR-GST jeweils einzeln gemessen (Abb. 4.4).

a)



b)

Relaxationsraten [s^{-1}]	
9-aa	0.4758 ± 0.0007
9-aa + shPrP	0.4830 ± 0.0007
9-aa + 4OR-GST	0.5030 ± 0.0011
9-aa + shPrP + 4OR-GST	0.5218 ± 0.0010

Abb. 4.4) Auswertung der mit dem Schnelltest ermittelten Relaxationsdaten für die Interaktion von 4OR-GST mit shPrP

a) Auftragung der für 9-aa, 9-aa + shPrP, 9-aa + shPrP + 4OR-GST ermittelten Messwerte. Jeder Zeitpunkt wurde 5 x in zufälliger Reihenfolge entsprechend dem optimierten Samplingschema von Eisenmann *et al.* (2004) aufgenommen.

b) Die gezeigten Relaxationsraten wurden durch Anpassung der nichtlinearen Regression an einen monoexponentiellen Abfall bestimmt, die Fehler mittels Monte-Carlo-Simulationen (Eisenmann *et al.*, 2004).

Durch den Test konnte in kurzer Zeit gezeigt werden, dass die zu beobachtende Interaktion unter NMR-Bedingungen nur sehr schwach und eine weitere Untersuchung daher nicht sinnvoll ist.

Derselbe Test wurde von Herrn Dr. Jan Ziegler für die Wechselwirkung von PrP^C und dem Lamininrezeptor-Vorläuferprotein verwendet. Eine Interaktion beider Proteine war aus *yeast two-hybrid assays* bekannt (Hund *et al.*, 2001) und konnte mit dem Schnelltest unter NMR-Bedingungen nachgewiesen werden (Ziegler, 2007).

4.3 Kristallisation von 4OR-GST

Wie bereits beschrieben wurde, besteht eine kausale Beziehung zwischen der Anzahl an Kopien innerhalb der kupferbindenden Oktarepeat-Region und der erblichen Form der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit. NMR-Experimente zeigten, dass ein Peptid aus drei Oktarepeats in Abwesenheit von Kupfer eine bevorzugte Struktur in Lösung einnimmt und als pH-abhängiger Aggregationskeim wirken kann (Zahn, 2003). Eine Struktur der gesamten Oktarepeat-Region, die auch als Ziel für eine mögliche anti-Prion-Therapie gilt, ist bisher weder in der freien, noch in der für die mögliche Funktion der Kupferhomöostase relevanten kupferbeladenen Form bekannt.

Durch den großen Fusionspartner, der Glutathion-S-Transferase aus *Schistosoma japonicum* (SjGST), verbessert sich die Löslichkeit der Sequenz aus vier Oktarepeats erheblich. Bedingt durch die Größe des Fusionspartners eignet sich 4OR-GST (31 kDa) allerdings nur sehr eingeschränkt für die NMR-Spektroskopie. Alternativ bietet sich die Proteinkristallographie als Methode zur Strukturbestimmung an. Für kurze Peptidsequenzen und Proteinfragmente konnte gezeigt werden, dass sie als GST-Fusionsproteine kristallisiert werden können. Die Kristallisationsbedingungen werden hierbei hauptsächlich durch GST bestimmt, in der Regel ohne dabei die Struktur des Fusionspartners zu beeinflussen (Lim *et al.*, 1994).

Von den getesteten Bedingungen (Kap. 3.9) ergab der Test mit Ammoniumsulfat keine Ergebnisse und auch ein optimierter PEG-Screen brachte keine Kristalle hervor, die sich für Refraktionsuntersuchungen eigneten. Hingegen wurden im daraufhin durchgeführten IndexTM-Screen vielversprechende Ausgangsbedingungen gefunden. Diese führten über einen weiteren Optimierungsschritt zu Bedingungen (Reservoirlösung: 23 % (w/v) PEG 3350, 0.1 M HEPES pH 7.5), die im Diffraktometer gut streuende, allerdings sehr kleine Kristalle ergaben (Abb. 4.5 a). Die Kristalle gehören der Raumgruppe P2₁2₁2 an und haben sechs

Moleküle in der asymmetrischen Einheit. Eine Erhöhung des Tropfenvolumens auf 6 μl Proteinlösung führte schließlich zu Kristallen bis zu einer Größe von ca. 150 x 150 μm Kantenlänge.

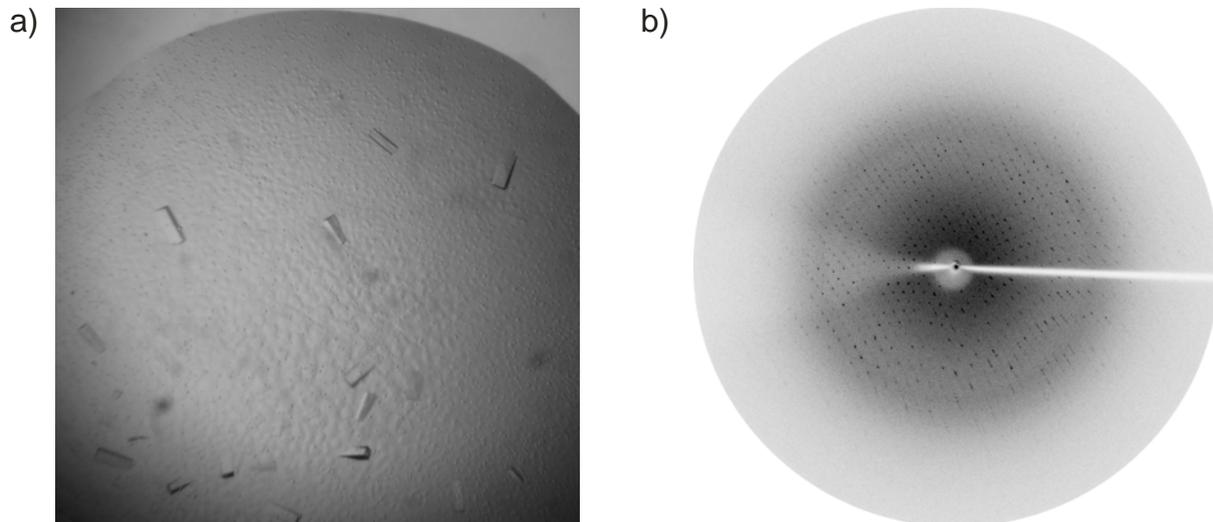


Abb. 4.5) Kristallisation von 4OR-GST

a) Kristalle von 4OR-GST

4OR-GST wurde im Dampfdiffusionsverfahren mit der *hanging drop*-Methode bei 18 °C kristallisiert. Die Reservoirlösung enthielt 23 % (w/v) PEG 3350, 0.1 M HEPES pH 7.5 und wurde im Tropfen 1:1 mit 2 μl Proteinlösung (7 mg/ml in 10 mM Natrium-Phosphat, 150 mM NaCl, pH 7.5) kombiniert.

b) Diffraktionsbild eines 4OR-GST - Kristalls

Diffraktionsdaten wurden bei -180 °C an einer rotierenden Kupferanode (Nonius FR591, Bruker AXS, Karlsruhe, D), ausgerüstet mit einem mar345dtb-Bilddetektor (marresearch GmbH, Hamburg, D), gesammelt. GST-4OR kristallisierte in der Raumgruppe $P 2_1 2_1 2$. Die Elementarzelle hat die Dimensionen 58.55 x 96.65 x 266.64 Å mit den Winkeln $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$.

Die Kristalle wurden unmittelbar vor der Messung direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren, da die Verwendung von Cryoprotektanzlösung (Reservoirlösung + 15 % 2R,3R-Butandiol) zur Bildung von Rissen führte und in der Folge die Qualität des Diffraktionsbildes senkte. Mit den getesteten Kristallen konnten so Auflösungen bis 2.8 Å erreicht werden (Abb. 4.5 b).

Die Auswertung des Beugungsmusters durch Herrn Prof. Dr. Holger Dobbek ergab aber, dass lediglich die Glutathion-S-Transferase strukturiert im Kristall vorlag, während für die vier

Oktarepeats keine Elektronendichte detektiert werden konnte. Dies deutet darauf hin, dass sich die Oktarepeats, wie in Lösung, in flexibler Konformation befinden oder aber, dass in verschiedenen Elementarzellen unterschiedliche Konformere der Oktarepeats vorliegen.

Da sich metallbindende Motive durch die Anwesenheit des Metallions stabilisieren lassen, wurde versucht, die Oktarepeat-Sequenz durch Einbringen von Cu(II)-Ionen zu stabilisieren. Hierzu können bestehende Kristalle in eine kupferhaltige Lösung umgesetzt werden. Es zeigte sich aber, dass eine wässrige Lösung mit 5 mM CuSO₄, welche ein schnelles Beladen der Kupferbindungsstellen erlaubt, ungeeignet ist, weil CuSO₄ im HEPES-Puffer ausfällt. Präzipitiertes Kupfer wurde daher abzentrifugiert und die Kristalle mit den entsprechend dem Löslichkeitsprodukt restlichen, in Lösung verbliebenen, Kupferionen für einen längeren Zeitraum (ca. 14 Tage) inkubiert. Obwohl Metallzentren in vielen Fällen zu einer Verbesserung der Auflösung beitragen, wurde entgegen den Erwartungen bei einem Kristall mit ca. 100 x 100 µm in einem vorläufigen Diffraktionstest nur eine Auflösung von 2.8 Å erreicht (Vollständigkeit = 99.7 %, R_{merge} = 13.4 %). Die eigentliche Messung musste gerätebedingt abgebrochen werden und der Kristall konnte für spätere Messungen wegen mangelnder Stabilität in flüssigem Stickstoff nicht konserviert werden.

Um die Kupferionen schneller und kontrollierter einbauen zu können, wurde nach einem alternativen Puffer gesucht. Es zeigte sich, dass CuSO₄ in Tris-Puffern in hohen Konzentrationen gelöst werden kann und dass kleine Kristalle ohne Beschädigung in kupferhaltiger Mutterlauge, eine Lösung aus 10 µl 23 % (w/v) PEG 3350, 0.1 M Tris pH 7.5, 5 mM CuSO₄ inkubiert werden können. Allerdings bildete ein anschließend umgesetzter Kristall von einer für Diffraktionsversuche geeigneten Größe (150 x 150 µm) beim Pufferwechsel sofort Risse aus. Die Rissbildung verringerte sich innerhalb weniger Stunden geringfügig und der Kristall zeigte eine zunehmende, kupferbedingte Blaufärbung. Trotz der verbleibenden Risse streute der Kristall noch bis 2.9 Å (Raumgruppe P 2₁ 2₁ 2, Vollständigkeit = 99.5 %, R_{merge} = 13.1 %). Eine vorläufige Auswertung der Diffraktionsbilder durch Herrn Prof. Dr. Holger Dobbek ergab, dass drei Cu-Atome an der Oberfläche von GST gebunden waren. Obwohl für den Bereich der vier Oktarepeats keine ausreichenden Elektronendichten zur Bestimmung einer Struktur vorlagen, konnten erstmals vereinzelte Bereiche mit Elektronendichten in der Oktarepeat-Sequenz detektiert werden. Eine weitere Optimierung der Bedingungen konnte im Rahmen dieser Arbeit wegen technischen Problemen an der Röntgenstrahlenquelle nicht durchgeführt werden. Wie bereits weiter oben erwähnt, weisen auch diese Kristalle eine geringe Stabilität auf und konnten für spätere Messungen nicht konserviert werden.

4.4 Charakterisierung des gegen PrP-Helix 1 gerichteten scF_v-Antikörpers W226

Wie eingangs erwähnt (Kap 1.3.5.1), bindet der monoklonale Antikörper W226 an die Helix 1 in PrP^C mit subnanomolarer Affinität und besitzt eine starke anti-Prion-Aktivität in Zellkulturen. Der hiervon abgeleitete scF_v W226 besitzt dieselbe medizinische Aktivität und weist eine nur geringfügig verminderte Dissoziationskonstante von 4 nM auf (PD Dr. Carsten Korth, unveröffentlichte Ergebnisse).

4.4.1 Fluoreszenz-Spektroskopie am Epitop: Y145, R148 und E152 bilden ein strukturelles Epitop

Helix 1 des Prion Proteins war als Epitop des Antikörpers W226 im *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) bestimmt worden (PD Dr. Carsten Korth, unveröffentlichte Ergebnisse). Grundlage der detaillierten Untersuchung des Epitops anhand von Peptiden ist die besondere Stabilität der PrP-Helix 1-Struktur, die auch für das isolierte Motiv beobachtet werden kann. Mit NMR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass dieses Peptid im zeitlichen Mittel zu 30 bis 40 % als α -Helix vorliegt (Ziegler *et al.*, 2003). Da Alanin eine Aminosäure mit hoher Helix-Propensität ist, sollte sich der Helix-Gehalt von Alanin-Mutanten ebenfalls im Bereich des Wildtypwerts bewegen.

Um den Helix-Gehalt der Alanin-Mutanten (Tab. 4.2 a) mit dem des Wildtyp-Helix 1-Peptids vergleichen zu können, wurde der AGADIR-Algorithmus verwendet (<http://www.embl-heidelberg.de/Services/serrano/agadir/agadir-start.html>). Dieser erlaubt die Anpassung der Parameter Pufferstärke, Temperatur und pH-Wert an die experimentellen Bedingungen und ermittelt für eine Peptidsequenz den Helix-Gehalt unter den jeweiligen Bedingungen (Muñoz & Serrano, 1994; 1995a; 1995b). Zwar waren die so erhaltenen Werte systematisch niedriger als für eine Bestimmung mittels CD- oder NMR-Spektroskopie (Ziegler *et al.*, 2003), ermöglichten aber den Vergleich des Helix-Gehalts von wt und mutierten Peptiden (Tab. 4.2 b). Die erhaltenen Werte wurden dazu verwendet, um mögliche Effekte der Helix-Propensität auf die Bindungsstudien zu erkennen. Eine Bibliothek von Alanin-Mutanten konnte daher verwendet werden, um den Beitrag der einzelnen Aminosäuren auf die Bindung des Antikörpers über Fluoreszenz-Titrationen zu bestimmen.

Ausgehend von der Tryptophan-Fluoreszenz des Antikörpers wurde für das Wildtyp-Peptid

huPrP 143-157 eine Dissoziationskonstante von $0.4 \mu\text{M}$ bestimmt. Die Auswertung der 13 Alanin-Mutanten des Peptids führte zu drei Gruppen: Peptide mit unveränderter Dissoziationskonstante, drei Peptide mit schwacher Affinität (E146, Y149 und R151) und drei Peptide (Y145, R148 und E152), die keine Bindung zeigen. Die schwach bindenden Mutanten sind dabei direkte Nachbarn der nicht-bindenden Peptide ($145 \rightleftharpoons 146$, $148 \rightleftharpoons 149$ und $151 \rightleftharpoons 152$).

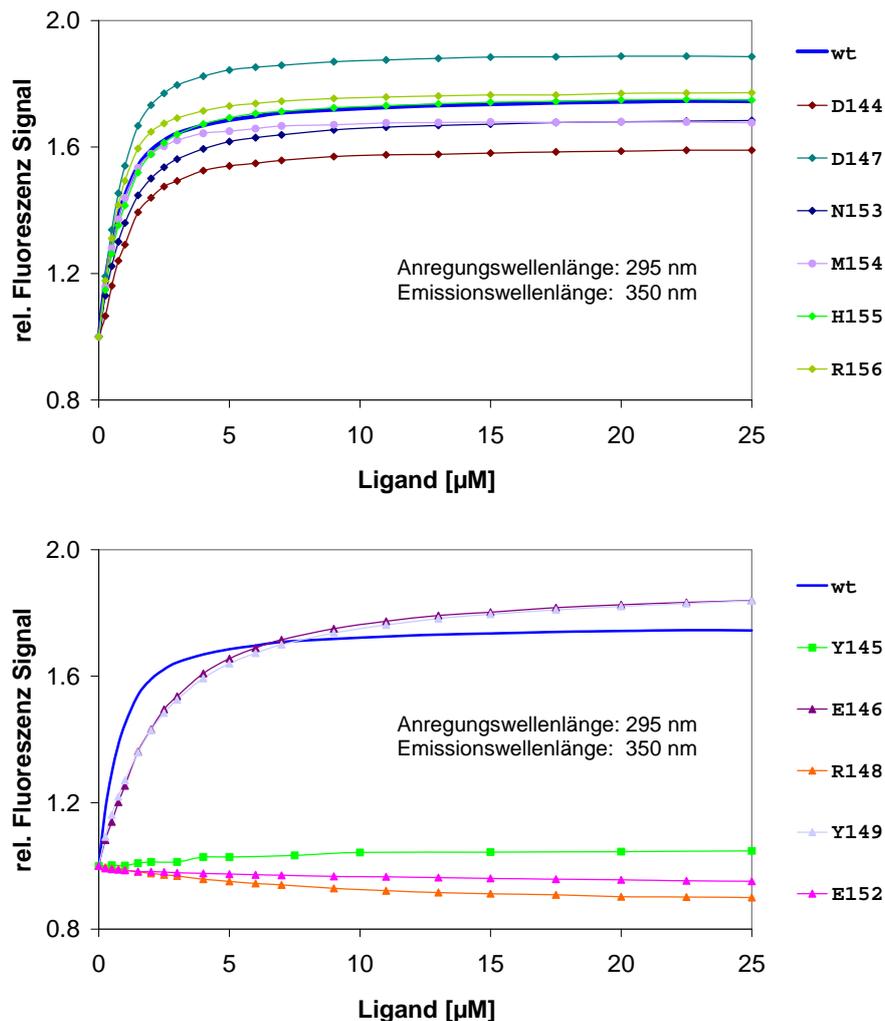


Abb. 4.6) Diagramme Alanin-Scan: W226 + Helix 1 (huPrP 143-157)

- Wiedergegeben sind die Werte für das Wildtyp-Peptid (blau) und Mutanten mit vergleichbarer Dissoziationskonstante
- Während die Mutanten E146 und Y149 eine schwache Bindung an W226 zeigen, binden die Mutanten Y145, R148 und E152 nicht.

Messung der Tryptophan-Fluoreszenz des vorgelegten Antikörpers; die Konzentration des vorgelegten scF_v in der Messzelle war $0.5 \mu\text{M}$, die zur Titration verwendeten Stammlösungen hatten eine Konzentration von $500 \mu\text{M}$.

Tab. 4.2) PrP-Helix 1-Peptide zur Charakterisierung des W226-Epipops mittels Alanin-Scan

a) Übersicht über die im Alanin-Scan verwendeten Peptidsequenzen

b) Wiedergabe der mit dem AGADIR-Algorithmus bestimmten Helix-Propensitäten (pH 7.20;

Temperatur: 298 K; Ionenstärke: 0.0100 mM; N-Terminus: acetyliert; C-Terminus: amidiert)

c) Wiedergabe der in den Fluoreszenz-Titrationsen ermittelten Dissoziationskonstanten inklusive Fehler

a)		b)	c)
wt	SDYEDRYRENMHRY	14.6 %	0.41 ± 0.11 μM
S143	ADYEDRYRENMHRY	12.9 %	0.88 ± 0.04 μM
D144	SAYEDRYRENMHRY	11.2 %	0.80 ± 0.06 μM
Y145	SDAEDRYRENMHRY	15.7 %	n.b.
E146	SDYADRYRENMHRY	13.1 %	2.0 ± 0.10 μM
D147	SDYEARYRENMHRY	13.9 %	0.53 ± 0.06 μM
R148	SDYEDAYYRENMHRY	9.1 %	n.b.
Y149	SDYEDRAYRENMHRY	13.9 %	2.0 ± 0.01 μM
R151	SDYEDRYYAENMHRY	9.2 %	1.5 ± 0.50 μM
E152	SDYEDRYYRANMHRY	8.5 %	n.b.
N153	SDYEDRYYREAMHRY	18.2 %	0.71 ± 0.01 μM
M154	SDYEDRYYRENAHRY	8.8 %	0.39 ± 0.02 μM
H155	SDYEDRYYRENMARY	28.5 %	0.60 ± 0.01 μM
R156	SDYEDRYYRENMHAY	7.6 %	0.40 ± 0.01 μM

Überträgt man diese Positionen auf die Struktur des humanen Prion Proteins (Calzolari & Zahn, 2003), ergibt sich eine zusammenhängende Fläche aus ausschließlich oberflächenexponierten Seitenketten (Abb. 4.7).

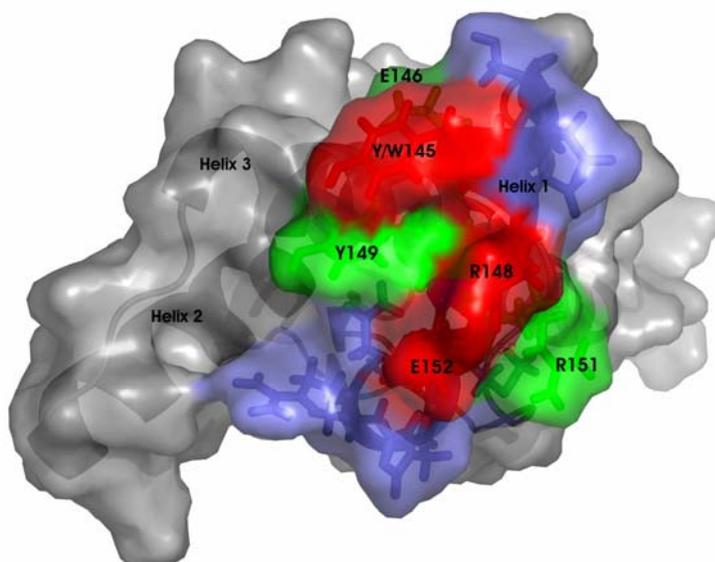


Abb. 4.7) Strukturelles Epitop des scF_v W226, dargestellt anhand der durchschnittlichen NMR-Struktur von huPrP(121-230) bei pH 7.0

Die für die Bindung des scF_v W226 essenziellen Positionen Y145, R148 und E152 (rot) sind vollständig oberflächenexponiert und bilden, zusammen mit den ebenfalls beteiligten Positionen E146, Y149 und R151 (grün), ein polares, geladenes Epitop.

Die Abbildung basiert auf der NMR-Struktur von Calzolari & Zahn (2003), PDB-Eintrag 1QLX und wurde mit dem Programm PyMOL (DeLano Scientific LLC, San Francisco, CA, USA) erstellt.

4.4.2 Herstellung von kleinen Antikörperfragmenten für die NMR-Spektroskopie

Um die Größe des scF_v W226 weiter zu reduzieren, und somit die Durchführbarkeit der NMR-Spektroskopie zu verbessern, wurden *single domain*-Antikörper entworfen. Ausgehend vom ursprünglichen Vektor pET22b-W226 wurden Primer zur Klonierung von *heavy chain* (V_H) und *light chain* (V_L) *single domain*-Antikörpern konstruiert (Kap. 10.1). Als Aminoterminus für die *single domain*-Antikörper wurden die jeweiligen Positionen der Start-Primer zur Klonierung des scF_v W226 verwendet (Kap. 10.2). Die C-Termini beider Ketten wurden anhand der Struktur eines homologen Antikörpers festgelegt. Beide Domänen wurden jeweils in pET-22b und pET-15b Plasmide kloniert, um unterschiedliche Kultivierungsbedingungen und damit verbunden unterschiedliche Reinigungsstrategien zu testen.

Zwei Varianten beider Konstrukte wurden mit technischer Unterstützung durch Frau Christine Viehrig kloniert. Induktions- und Expressionstests im 1-Liter-Maßstab mit BL21 StarTM (DE3) -, BL21 RosettaTM (DE3) -und BL21 Rosetta-gamiTM (DE3) - Zellen verliefen durchweg vielversprechend. Die Reinigungen dieser Testkulturen verliefen normal, führten aber zu Aggregation, sobald das reine Protein in höherer Konzentration vorlag. Konzentrationen im Bereich von einigen hundert Mikromolar, wie sie für NMR-Experimente zur Zuordnung und Strukturaufklärung notwendig sind, waren daher mit diesen *single domain*-Konstrukten nicht zu erreichen.

4.4.3 Isotopenmarkierung, Reinigung & Charakterisierung von scF_v W226

Auf Grund der Größe des scF_v-Antikörpers waren anspruchsvolle Formen der Isotopenmarkierung, wie die Anzucht in D₂O und die selektive ¹⁵N-Markierung einzelner Aminosäuren, notwendig. Da es sich um kostenintensive Medien handelt, sollte das Kulturvolumen der jeweiligen Anzucht möglichst klein gewählt werden. Der Optimierung von Expression und Reinigung zur Steigerung der Effizienz kam daher eine entsprechende Bedeutung zu.

Während die Ansätze zur selektiven Markierung einem Vollmedium entsprachen und die Zellen daher sehr gut wuchsen, führte die Anzucht in D₂O zu einer deutlichen Senkung der Ausbeute. Diese lag noch unter der einer doppelt markierten Probe. Eine Kultivierung mit

12 g ^{13}C -Glucose und 6 g ^{15}N -Ammoniumsulfat in 4 l D_2O wurde daher für eine NMR-Probe (400 μl , 840 μM) benötigt, mit der alle mehrdimensionalen NMR-Experimente (Kap. 4.4.4.1) und die Titration mit PrP-Helix 1-Peptid (4.4.4.3) gemessen wurden.

Eine selektive ^{15}N -Markierung des scF_v wurde durch die gezielte Verwendung ^{15}N -markierter Aminosäuren während der Kultivierung erreicht. Sieben markierte Aminosäuren wurden so kombiniert, dass anhand ihrer chemischen Verschiebungen von C α und C β eine zweifelsfreie Unterscheidung gewährleistet war, was zu vier Expressionsansätzen führte (Tab. 4.3). Bei der Kombination und Auswahl der Aminosäuren wurde ebenfalls der Stoffwechsel in weitere markierte Aminosäuren berücksichtigt und ausgenutzt. Die Kultur Nr. 1 (Alanin, Glycin und Tyrosin) ermöglichte so beispielsweise die gleichzeitige Betrachtung von sechs verschiedenen Aminosäuren.

Tab. 4.3) Kombination der ^{15}N -markierten Aminosäuren in den einzelnen Kulturen, ihre Häufigkeit in der scF_v W226 - Sequenz und ihr Stoffwechsel

Kultur 1	Ala	25				
	Gly	36	=> Ser	38	=> Cys	4
	Tyr	14	=> Phe	8		
Kultur 2	Leu	29				
	Val	15				
Kultur 3	Arg	12				
Kultur 4	Thr	21				

Vollständig gereinigtes Protein besaß auf Grund der sehr hohen Spezifität der Immunoaffinitätssäule einen entsprechend hohen Reinheitsgrad (Abb. 4.8) und wurde dabei gleichzeitig auf eine korrekte Faltung selektiert, wie sich mittels CD- und NMR-Spektroskopie zeigen ließ.

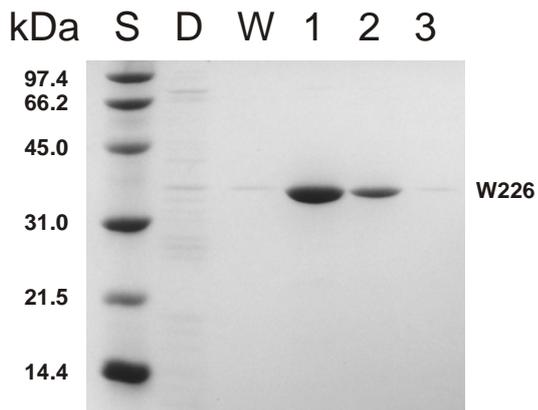


Abb. 4.8) Reinigung von scF_v W226 über Antigenaffinitätschromatographie

Die Untersuchung der Reinheit der Fraktionen einer Reinigung von scF_v W226 mittels SDS-Gelelektrophorese (Kap. 3.7.1) verdeutlicht den hohen Reinheitsgrad der Eluate. Standard (S), Durchfluss (D), Waschschrift (W) und Eluat 1 - 3

Für das CD-Spektrum des scF_v W226 wurde mit dem Programm DICHROWEB (Whitmore & Wallace, 2004) unter Verwendung des CDSSTR-Algorithmusses mit dem Referenzdatensatz 7 (Manavalan & Johnson, 1987; Sreerama & Woody, 2000) eine Zusammensetzung aus 16 % Helix-, 32 % Faltblatt- sowie 23 % Schleifen-Gehalt und 28 % ungeordneter Bereiche ermittelt (Abb. 4.9).

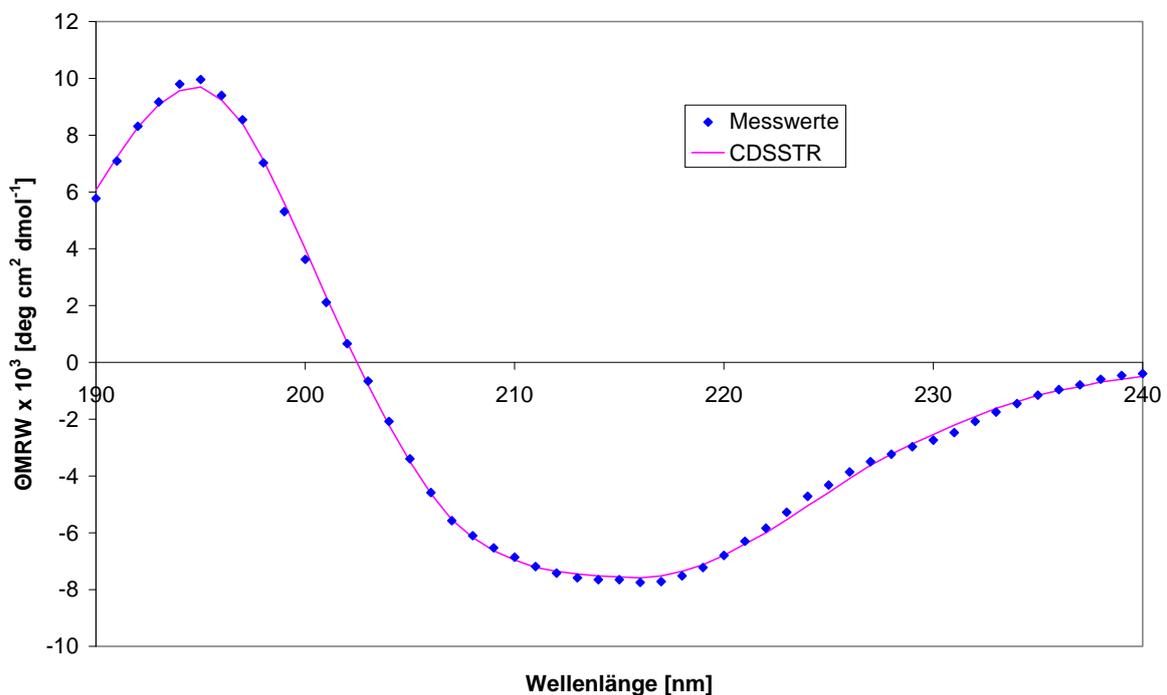


Abb. 4.9) Fern-UV-CD-Spektrum des scF_v W226

Wiedergegeben sind die für den scF_v W226 (10 mM Natrium-Phosphat, pH 7.0) aufgenommenen Datenpunkte, sowie die durch das Programm DICHROWEB (Methode CDSSTR) rückgerechneten Messwerte für den Bereich 240-190 nm.

4.4.4 NMR-spektroskopische Untersuchung von scF_v W226

4.4.4.1 Zuordnung

Die sequenzspezifische Zuordnung der Rückgratresonanzen erfolgte zunächst mit teilweise automatisierten Programmen, die anhand von Listen für die Signalpositionen in den aufgenommen, mehrdimensionalen NMR-Spektren und der Aminosäure-Sequenz des Proteins Vorschläge für zusammenhängende Signale ausgeben.

Das Programm ks_assign (Schweimer, 2000) lieferte mit den ausgegebenen Zuordnungen kurzer Bereiche einen ersten Ansatzpunkt für die weitere manuelle Auswertung. Ebenfalls von Bedeutung waren generierte Hinweise auf mögliche Fehler und Verstöße innerhalb der Signallisten, die eine gezielte Überarbeitung der Werte für die chemischen Verschiebungen ermöglichte. Die wiederholte Kombination aus Programm-Ausführung und Kontrolle der Eingabelisten führte zu einer Verlängerung der bereits zugeordneten Bereiche, ließ sich aber nicht beliebig fortsetzen. Neben Prolin, welches kein Rückgratssignal in HSQC-Spektren liefert, führten vor allem Serin und Glycin zu einem Abbruch einer Zuordnung, da diese innerhalb der Sequenz sehr häufig (38 Ser bzw. 36 Gly) vorkommen. Dies erschwert eine zweifelsfreie Identifikation, gerade für Glycin, welches keine C β -Signale zur Unterscheidung liefert, führt häufiger aber auch zu einer Überlagerung der Signale und resultiert so in schwer auffindbaren oder scheinbar fehlenden Signalen.

Generell wurde die Zuordnung durch das Vorhandensein einer relativ hohen Anzahl an repetitiven Elementen innerhalb der Aminosäuresequenz erschwert. So weisen beispielsweise die Sequenzbereiche AS117 - AS120, sowie AS260 - AS263 das identische Motiv VYFC auf, während AS229 - AS232 und AS236 - AS239 beide das Motiv RFSG besitzen.

Neben diesen ersten zugeordneten Bereichen, deren manuelle Verifikation anhand der C α -, C β - und CO-Positionen vorgenommen wurde, hatte das Programm zusammenhängende Bereiche aus drei oder vier Aminosäuren ermittelt, die der implementierte Algorithmus aber innerhalb des großen Sequenzraumes nicht zuordnen konnte. Des Weiteren sucht das Programm für jede Sequenzposition nach möglichen Vorgängern. Die Anzahl der Positionen, für die Vorschläge vorlagen, hatte sich im Zuge des beschriebenen iterativen Prozesses erhöht, wobei sich die Vorschläge gleichzeitig präzisierten.

Mittels der beschriebenen Vorgehensweise konnten ca. 50 Rückgratresonanzen sequenzspezifisch zugeordnet werden. Die Verlängerung bestehender Zuordnungen und das Schließen von Lücken zwischen bereits zusammenhängend zugeordneten Bereichen wurden

zunächst manuell vorgenommen. Hierzu wurden die entsprechenden C α -, C β - und CO-Positionen innerhalb der HNCACB-, HN(CO)CACB-, HNCO- und HN(CA)CO-Spektren gesucht. Ohne vorherige Eingrenzung der Signalanzahl erwies sich dieser Ansatz aber für ein Protein dieser Größe als nicht praktikabel.

Das für NMRView5 (Johnson & Blevins, 1994) erhältliche SMARTNOTEBOOK-Modul (Slupsky *et al.* 2003) stellt in drei Fenstern (Abb. 4.10 a) das HNCACB- sowie das HN(CO)CACB-Spektrum für eine Position (i) und das HNCACB-Spektrum für die Vorgängerposition (i-1) dar und ermöglicht so eine gezielte Überprüfung von Konnektivitäten anhand der angezeigten C α - und C β -Signale. Die Kontrolle der CO-Positionen erfolgte separat, da das Programm keine HNCO- und HN(CA)CO-Spektren einliest. Das Modul zeichnet sich aber dadurch aus, dass es für gefundene Abschnitte, was in der Regel zwei bis drei zusammenhängenden Aminosäuren entsprach, in einem weiteren Fenster alle Möglichkeiten einer Zuordnung innerhalb des Sequenzraumes markiert. Hierbei werden aber nur die chemischen Verschiebungen der zusammenhängenden Positionen ausgewertet und nicht die zusätzlich enthaltenen Informationen über den Vorgänger des ersten Signals. Über die im HNCACB-Spektrum der ersten Position (i) enthaltenen chemischen Verschiebungen der C α - und C β -Signale des Vorgängers (i-1) verlängert sich der Bereich, für den Verschiebungswerte vorliegen, um eine Position. Da auf Grund des großen Sequenzraumes für zwei zusammenhängende Aminosäuren in der Regel zehn Zuordnungen und für drei aufeinander folgende Positionen noch immer etwa vier Möglichkeiten der Zuordnung bestanden, kam dem Einbeziehen dieser zusätzlichen Information eine entsprechende Bedeutung zu. Weitere Funktionen des Programms zur Vereinfachung der Zuordnung waren im vorliegenden Fall nur von geringem praktischen Nutzen, was zum einen an der Größe der Sequenz und zum anderen an den maschinell schwer zu verarbeitenden Spektren lag. Auf Grund von Kompatibilitätsproblemen konnten die manuell überarbeiteten Listen, die für das Programm ks_assign erstellt worden waren, hier nicht genutzt werden, so dass automatisch erstellte Signallisten verwendet werden mussten. Wegen der stark unterschiedlichen Signalintensitäten innerhalb der Sequenz von W226 musste ein sehr niedriger Schwellenwert für die automatisierte Listenerstellung gewählt werden. Dadurch bedingt enthielten diese Signallisten einerseits Artefakte (Abb. 4.10 b), die die Anzahl falscher Zuordnungsvorschläge erhöhte, andererseits fehlten aber auf Grund der Moleküldynamik auch sehr viele echte Signale (s. unten), die daher vom Programm nicht berücksichtigt werden konnten (Abb. 4.10 c).

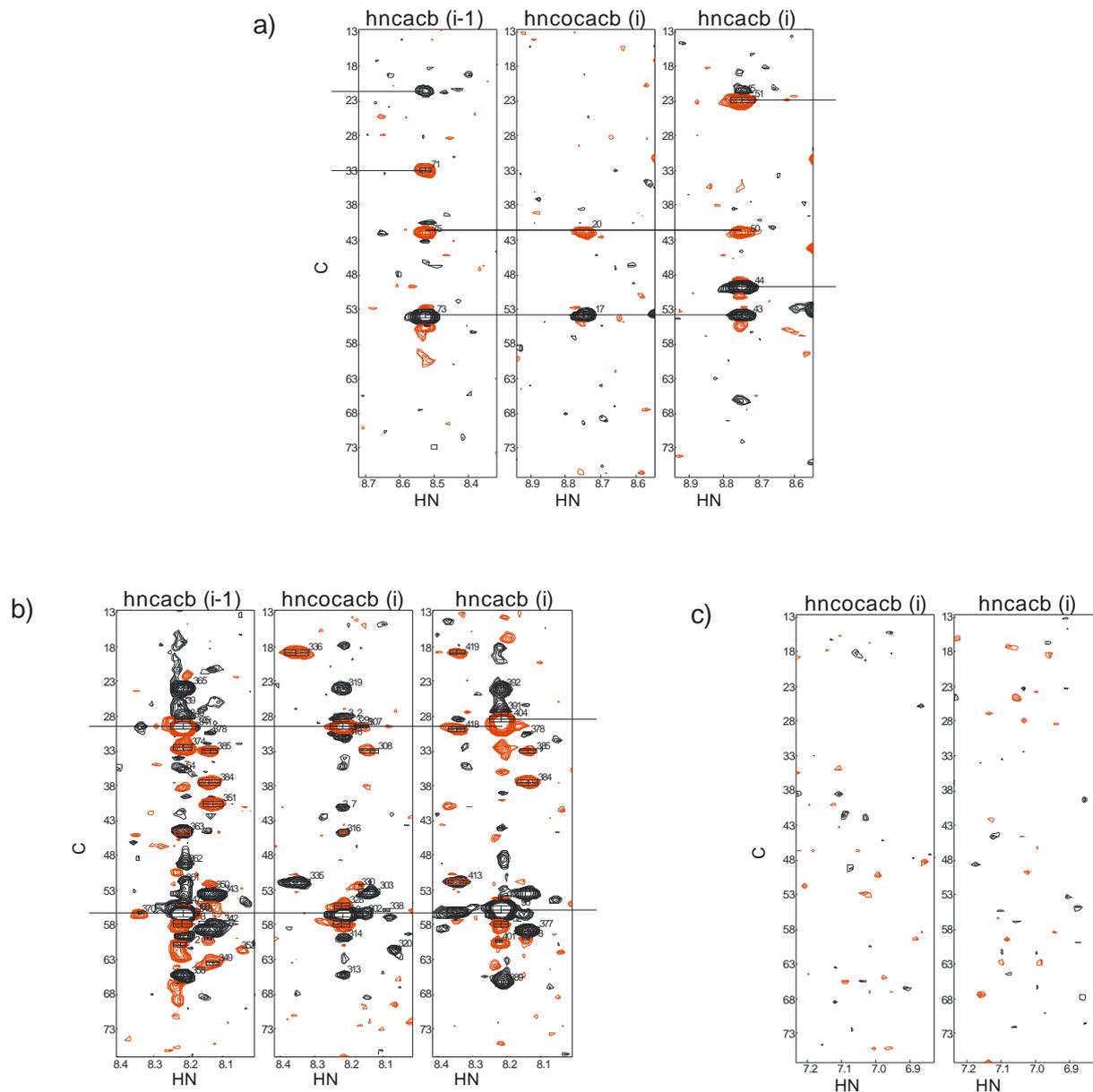


Abb. 4.10 Darstellung der HNCACB (i-1)-, HN(CO)CACB (i)- und HNCACB (i)-Spektren mittels SMARTNOTEBOOK

Die dargestellten Spektren sind bei gleichen Intensitätsniveaus gezeigt, um die Probleme bei der sequenziellen Zuordnung durch die stark unterschiedlichen Signalintensitäten bzw. der völligen Signalauslöschung in den mehrdimensionalen NMR-Spektren zu verdeutlichen.

- (E34)-L35-A36: Typisches Beispiel für ein Signal/Rausch-Verhältnis, welches eine Zuordnung erlaubt.
- (E294)-E295-Q296: Durch das *Peakpicking* wurden zu viele artifizielle Listeneinträge erzeugt, die ein automatisches Zuordnen mit SMARTNOTEBOOK in vielen Fällen verhindern.
- Position 98: Obwohl im HSQC-Spektrum für diesen Rest ein deutliches Signal detektierbar ist, sind die entsprechenden $C\alpha$ - und $C\beta$ -Resonanzen in den zugehörigen 3D-Spektren bis unter das Detektionslimit verbreitert. In diesen Fällen (etwa 20 % der Signale) kann weder mit Hilfe von Programmen, noch manuell eine Zuordnung erfolgen.

Das Hauptproblem für die Zuordnung in einem derart großen Protein waren fehlende, eindeutige Informationen über den Aminosäuretyp, bedingt durch die oft auftretenden Folgen an Aminosäuren mit ähnlichen chemischen Verschiebungen. Mit den verschiedenen Ansätzen hatte eine größere Anzahl von Fragmenten aus zwei bis vier zusammenhängenden Aminosäuren bestimmt werden können, deren Zuordnung ohne zusätzliche Informationen aber nicht möglich war. Um weitere Ansätze zu erhalten, wurde mit der selektiven ^{15}N -Markierung begonnen (Kap. 4.4.3). Mit den HSQC-Spektren für die unterschiedlich markierten W226-Proben lagen so eindeutig bestimmte Aminosäuren vor, vor allem aber konnten viele Vorschläge des SMARTNOTEBOOK-Moduls so weit ausgeschlossen werden, bis nur noch eine Lösung übrig blieb. Durch die so erfolgte Zuordnung der bereits bekannten Fragmente war jetzt eine gezielte Verlängerung möglich. Hierbei wurden insbesondere die noch nicht zugeordneten Aminosäuren getestet, die mittels selektiver Markierungen charakterisiert worden waren. In manchen Fällen war dies aber nicht möglich, da trotz starker Rückgratresonanz im HSQC-Spektrum die zugehörigen HNCACB- und HN(CO)CACB-Spektren keine Signale enthielten. Exemplarisch ist dies für die nicht zugeordnete HSQC-Position 98 in Abbildung 4.10 c wiedergegeben. Zusätzlich erlaubte die Aminosäure-Bestimmung aus der selektiven Markierung eine Verifizierung der bis dahin erfolgten Zuordnung.

Weil Antikörper aus einem strukturell hoch konservierten Gerüst bestehen, wurde unter Zuhilfenahme von dreidimensionalen Homologiemodellen (PD. Dr. Stephan Schwarzingler, unveröffentlichte Ergebnisse) des scF_v W226 die entsprechenden chemischen Verschiebungen mit dem Programm SHIFTY errechnet (Wishart *et al.*, 1997). Im Rahmen dieser Arbeit wurden vor allem die ^1HN -Resonanzen aus rekonstruierten ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektren in Verbindung mit den 3D-Experimenten und den Daten aus den Präparationen mit aminosäureselektiver Isotopenmarkierung für eine weitere Analyse herangezogen. Die Kombination mit letzteren Techniken ist besonders wichtig, da sowohl die den Berechnungen zugrunde liegenden Homologiemodelle, als auch die Berechnung der chemischen Verschiebungen selbst mit Fehlern behaftet sein können. Zur Reduktion der Fehleranfälligkeit wurden daher insgesamt drei Homologiemodelle zur Analyse verwendet. Es zeigte sich auch, dass die ^{15}N -Verschiebungen nicht mit ausreichender Genauigkeit vorhergesagt werden konnten, um für die Analyse verwendet zu werden. Dennoch konnten mit diesem Ansatz für zehn weitere Sequenzpositionen die Zuordnungen festgelegt werden.

Abb. 4.11) ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektrum des scF_v W226 (auf Seite 46)

Angegeben sind die Positionsbezeichnungen, sowie der Aminosäuretyp für die zugeordneten Signale (blau), bzw. der Aminosäuretyp oder die fortlaufende Nummerierung für die nicht-zugeordneten Positionen (rot). Der umrandete Bereich markiert die Seitenkettensignale, deren Zuordnung nicht vorgenommen wurde.

In Abbildung 4.11 ist das ^1H , ^{15}N -Korrelationsspektrum von scF_v W226 mit der zugehörigen Zuordnung wiedergegeben. Insgesamt konnten mit den bisher sowie den nachfolgend beschriebenen Verfahren 144 von 311 Rückgratresonanzen sequenziell eindeutig zugeordnet werden.

4.4.4.2 Sekundärstrukturmodell

Ein Sekundärstrukturmodell für den scF_v W226 wurde ausgehend von einer Veröffentlichung von Honegger & Plückthun (2001) aufgestellt. Die Autoren hatten zur Formulierung einer einheitlichen Positionsbeschreibung für V_H- und V_L-Antikörperdomänen bereits etablierte Nomenklaturen und ein *alignment* von 27 Sequenzen verglichen und daraus ein universelles Sekundärstrukturmodell für variable Antikörperdomänen entwickelt. Anhand der Sequenz-Homologie des scF_v W226 zum V_H- bzw. V_K-*alignment* wurde ein Sekundärstrukturmodell für die beiden W226-Domänen aufgestellt (Abb. 4.12).

Anhand der Darstellung der zugeordneten Bereiche im Kontext des Sekundärstrukturmodells lässt sich eine ungleiche Verteilung dieser Abschnitte sehr gut erkennen. Während die dem Epitop abgewandten Bereiche nahezu vollständig zugeordnet werden konnten, liegen für das Paratop, also die *complementarity determining regions* (CDRs), keine eindeutigen Zuordnungen vor. Die dennoch zur Verfügung stehenden experimentellen Daten konnten für die Erstellung und Verifizierung von Homologiemodellen von scF_v W226 verwendet werden (Kap. 4.4.5).

Das Fehlen von Zuordnungen ist im Wesentlichen im Fehlen von Signalen begründet. Für das 311 Aminosäuren umfassende Protein lagen nur 228 auswertbare Rückgratresonanzen im HSQC-Spektrum vor (Abb. 4.11). Einige weitere Signale waren zwar ansatzweise zu erkennen, der Hauptteil der Differenz von 83 Aminosäuren fehlte aber vollständig. Dieser Umstand lässt auf eine, für die NMR-Spektroskopie ungünstige, interne Dynamik im Mikrobis Millisekundenbereich schließen, welche besonders die flexiblen Schleifen der CDRs betrifft.

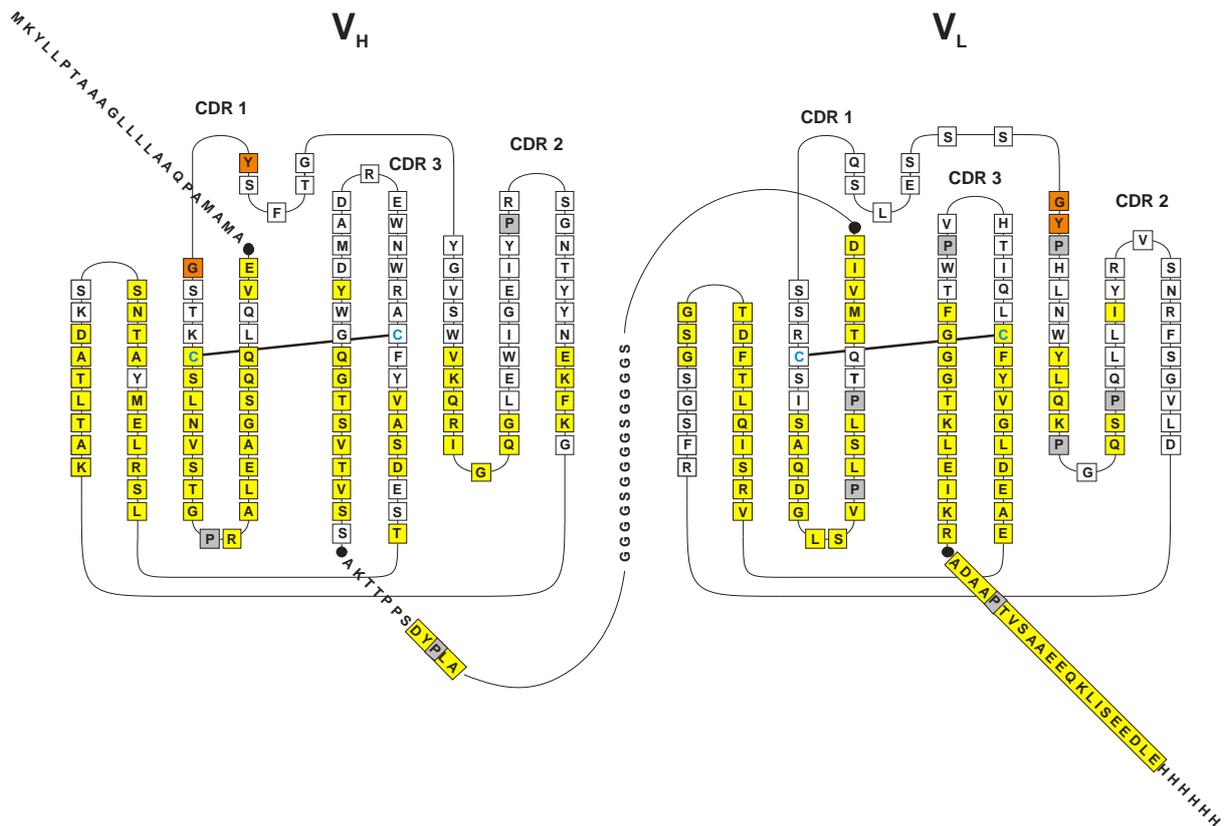


Abb. 4.12) Sekundärstrukturmodell des scF_v W226

Die Abbildung zeigt das anhand der Sequenzhomologie aufgestellte Sekundärstrukturmodell des Antikörpers, bestehend aus den variablen Domänen der schweren (V_H) und der leichten Kette (V_L). Zu erkennen sind die *complementarity determining regions* (CDRs), die von einem Gerüst aus β -Faltblättern und den zwei eingezeichneten Disulfidbrücken stabilisiert werden. Des Weiteren sind die aminoterminaler pelB-Signalsequenz, der $(GGGS)_3$ -Linker, der die beiden Domänen verknüpft, sowie der carboxyterminale Reinigungs-Tag zu sehen.

Positionen, deren Rückgratresonanzen eindeutig zugeordnet werden konnten, sind in gelb wiedergegeben. In orange sind die GY-Motive AS 50-51 und AS 204-205 markiert, die beide auf ein Serin folgen. Die Aminosäuren von zwei GY-Motiven mit vorausgehendem Serin konnten zwar gefunden werden (HSQC-Positionen 4-64 & 14-107), eine eindeutige sequenzielle Zuordnung zu den beiden beschriebenen Positionen war allerdings nicht möglich. Solche Zuordnungen mit zwei oder mehreren Möglichkeiten wurden als uneindeutige Zuordnung für *Docking*-Simulationen (Kap. 4.4.5) verwendet.

4.4.4.3 Titration mit PrP-Helix 1-Peptid

Die Interaktionen zwischen dem Paratop des Antikörperfragments W226 und seinem Epitop sollten mittels hochauflösender NMR-Spektroskopie strukturell charakterisiert werden. Hierzu wurde in einer HSQC-Titration der dreifach markierten W226-Probe schrittweise PrP-Helix 1-Peptid (huPrP 143-157 wt) zugefügt.

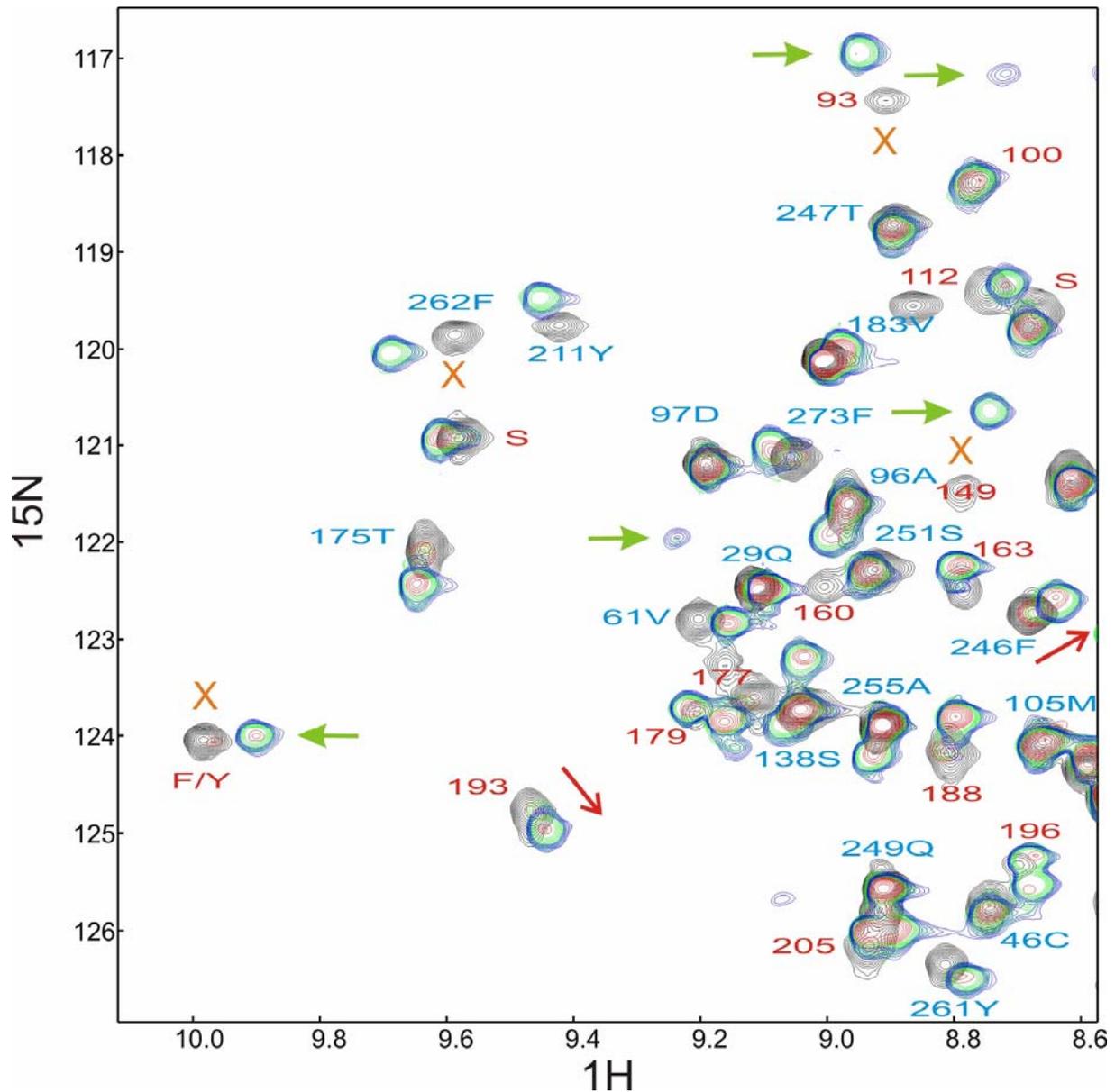


Abb. 4.13) Ausschnitt der ^1H , ^{15}N -HSQC-Titration von scF_v mit wt PrP-Helix 1-Peptid

Die schrittweise Zugabe des Epitops, der PrP-Helix 1, bis zu einem äquimolaren Verhältnis, führte zu einer Vielzahl von Änderungen im Korrelationsspektrum des scF_v W226. Beobachtet werden konnte die deutliche Veränderung von Signalpositionen (rote Pfeile), die Verbreiterung von Signalen bis unter das Detektionslimit (orange Kreuze) und das Auftreten neuer Resonanzen (grüne Pfeile). Spektren in schwarz entsprechen freiem scF_v W226, in rot mit 0.4 Äquivalenten PrP-Helix 1-Peptid, in grün mit 0.7 Äquivalenten und in blau einem äquimolaren Verhältnis von Protein und Ligand. Zugeordnete Positionen sind in blau, nicht-zugeordnete in rot, analog zu Abbildung 4.11, wiedergegeben.

Wie der Abbildung 4.13 zu entnehmen ist, führt die Zugabe zu einer Vielzahl von Positionsänderungen im HSQC-Spektrum. Die Klassifizierung dieser Verschiebungen wurde graphisch mit dem Programm Corel Draw X3 für alle Positionen durchgeführt (Kap. 10.10).

Im Folgenden wird für ausgewählte Reste aus den variablen Regionen exemplarisch das Vorgehen bei der Signalzuordnung für nicht eindeutige Zuordnungen, für die aber nur wenige mögliche Lösungen existieren, gezeigt.

Der mit den Aminosäuren Alanin, Glycin und Tyrosin selektiv markierte Antikörper zeigt im HSQC-Spektrum eine Vielzahl von Effekten nach der Zugabe von PrP-Helix 1-Peptid (Abb. 4.15 a). Mit einer roten Umrandung wurden sowohl ein Glycin (Position 14 des Spektrums) und ein Tyrosin (Position 107), welche eines der beiden (S)-GY - Motive in Abb. 4.12 (orange) bilden, als auch drei weitere Positionen markiert, die alle einen starken Effekt nach der Epitop-Zugabe zeigen. Bei Letzteren handelt es sich um starke Resonanzsignale, die erst in Gegenwart der PrP-Helix 1 ausgebildet wurden.

Im selektiv Threonin-markierten HSQC-Spektrum (Abb. 4.15 b) markieren die HSQC-Signale 210 und 36 Positionen, deren Lage sich mittelstark bis sehr stark ändert. Betrachtet man die zugehörigen Positionen in den HNCACB- und HN(CO)CACB-Spektren, so sind die C α - und C β -Signale, trotz der guten Resonanzsignale im gezeigten HSQC-Spektrum nicht detektierbar, obwohl die mehrdimensionalen Spektren mit einer 400 μ M Probe bei 800 MHz mit CryoProbeTM-Probenkopf und 5 Tagen Messzeit aufgenommen wurden.

Auf Grund der eindeutigen Zuordnung der weiteren Threonin-Signale lässt sich hieraus aber eine mögliche Zuordnung ableiten. Unter den noch nicht zugeordneten Signalen befinden sich auch zwei Threonine, die in der CDR 1 der schweren Kette (CDR-H1) bzw. der CDR-L3 liegen. Bei Zugabe von PrP-Helix 1 verändert sich die Lage von Signal 210, während Signal 36 ganz neu erscheint. Unter Berücksichtigung der übrigen hier durchgeführten Experimente kann daraus geschlossen werden, dass es sich beim letztgenannten Signal um Thr 54 aus CDR-H1 handelt, weil bereits andere Reste in dieser variablen Region mit vergleichbaren Effekten gefunden wurden. Umgekehrt kann für Signal 210 gefolgert werden, dass es sich um Thr 267 der CDR-L3 handelt, welches nur vergleichsweise geringe Signaländerungen aufweist. Dies ist im Einklang mit dem Resultat aus der selektiv markierten Valin-Leucin-Probe, die im Wesentlichen keine starken, epitopinduzierte Effekte zeigt (Daten nicht gezeigt). Daher kann gefolgert werden, dass das ebenfalls in CDR-L3 liegende Val 269 auch nicht an das Epitop bindet.

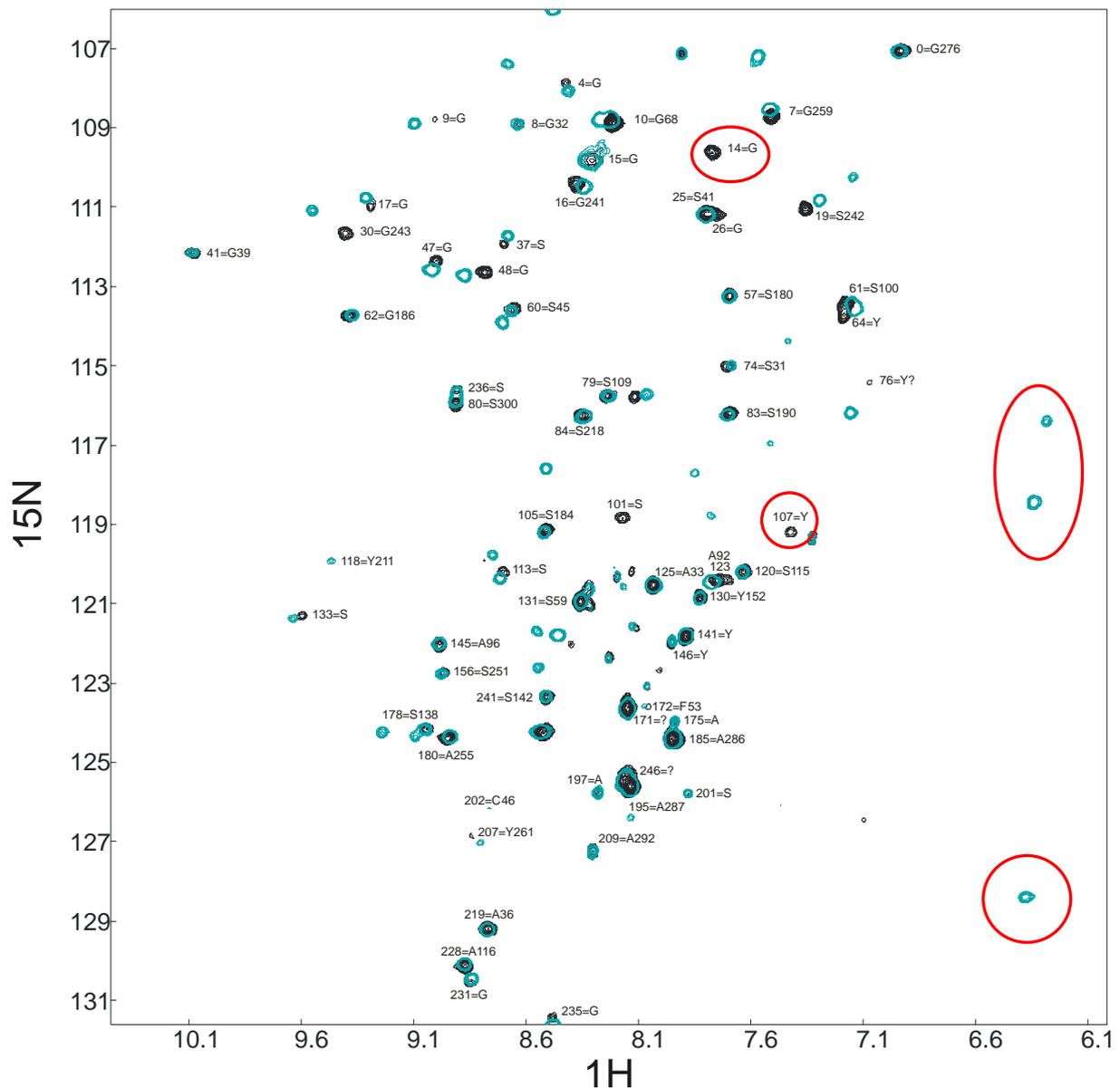


Abb. 4.15 a) ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektrum des selektiv markierten scF_v W226: Alanin, Glycin & Tyrosin

Die wiedergegebenen Spektren wurden für den mit den Aminosäuren Alanin, Glycin und Tyrosin selektiv ^{15}N -markierten scF_v W226 in Abwesenheit (schwarz) und Gegenwart (blau) einer äquimolaren Konzentration des Epitops, der PrP-Helix 1, aufgenommen.

Das mit der selektiv Arginin-markierten Probe aufgenommene Spektrum (Abb. 4.15 c) verdeutlicht die häufig für die CDRs beobachteten Intensitätsunterschiede. Während für die vier zugeordneten Signale kein Effekt in Folge der PrP-Helix 1-Zugabe beobachtet werden kann, zeigt das nicht zugeordnete Signal 230 eine mittlere Verschiebung. Gleichzeitig sind die $\text{C}\alpha$ - und $\text{C}\beta$ -Signale für diese Position so schwach, dass eine sequenzielle Zuordnung nicht möglich war.

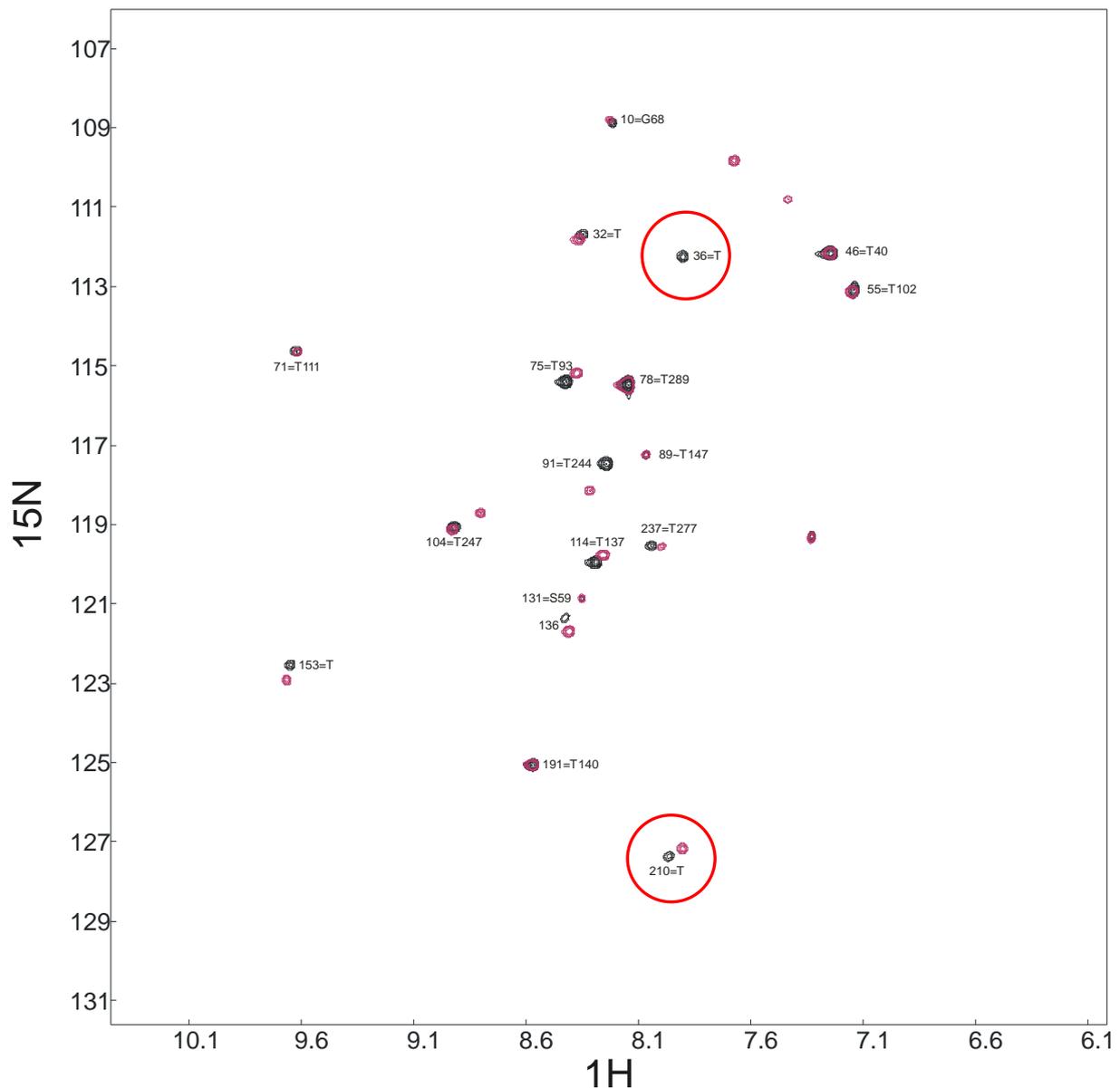


Abb. 4.15 b) ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektrum des selektiv markierten scFv W226: Threonin

In schwarz ist das Basisspektrum, in magenta nach äquimolarer Zugabe von huPrP-Helix 1-Peptid, wiedergegeben.

Andererseits werden nach der Peptid-Zugabe drei neue Signale ausgebildet. Dies ist von besonderem Interesse, da es innerhalb der W226-Sequenz genau drei Arginine in zentralen CDR-Positionen (CDR-H2, CDR-H3 & CDR-L2) gibt und diese Verteilung einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung mehrerer bis aller CDRs an der Epitopbindung und die Ausbildung einer großen Interaktionsfläche darstellt. Des Weiteren spiegelt das Spektrum die generell höhere Anzahl an Signalen in Gegenwart des Epitops wieder, was auf eine Veränderung der Dynamik der CDRs hinweist.

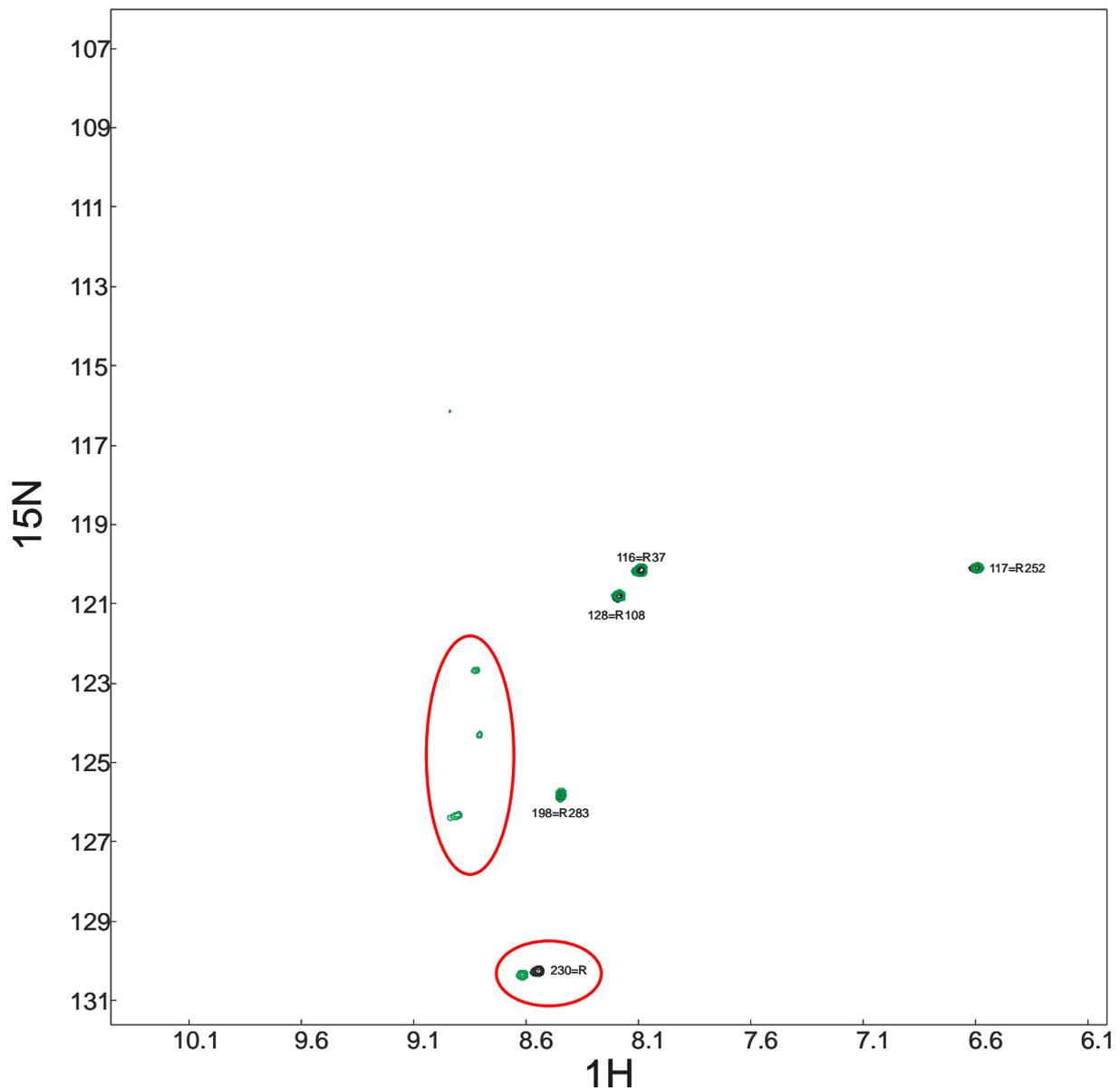


Abb. 4.15 c) ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektrum des selektiv markierten scFv, W226: Arginin

In schwarz ist das Basisspektrum, in grün nach äquimolarer Zugabe von huPrP-Helix 1-Peptid, wiedergegeben.

4.4.4.4 Aufstellung eines Verschiebungsindex zur Bestimmung der Sekundärstrukturelemente

Durch die Ausbildung von Sekundärstrukturelementen zeigen die Werte für die $\text{C}\alpha$ -, $\text{C}\beta$ - und CO -Verschiebungen eine sekundärstrukturabhängige systematische Abweichung gegenüber den Verschiebungswerten für ungeordnete (*random coil*) Bereiche. Diese Änderung der chemischen Verschiebung ermöglicht eine Lokalisierung der Sekundärstrukturbereiche innerhalb der Sequenz des Antikörpers. Der Zuordnung für die deuterierte Probe wurden

daher die Werte für die $C\alpha$ - und CO-Verschiebungen entnommen, um den Isotopeneffekt korrigiert (Hansen, 2000) und, der Veröffentlichung von Wishart *et al.* (1991) folgend, normiert.

Durch die Auftragung der so erhaltenen diskreten Werte gegen die Sequenz wurde ein sogenannter *chemical shift index* (CSI) aufgestellt. In diesem Index markieren Bereiche von drei oder mehr aufeinander folgenden, negativen Werten ein β -Faltblatt, während ein entsprechend langer Bereich positiver Werte als α -Helix interpretiert wird. Zwei aufeinander folgende Nullwerte oder ein Vorzeichenwechsel markieren das Ende eines Sekundärstrukturelements. Um die Aussagekraft zu erhöhen, wurden die Indexe für die $C\alpha$ und CO chemischen Verschiebungen addiert (Abb. 4.16).

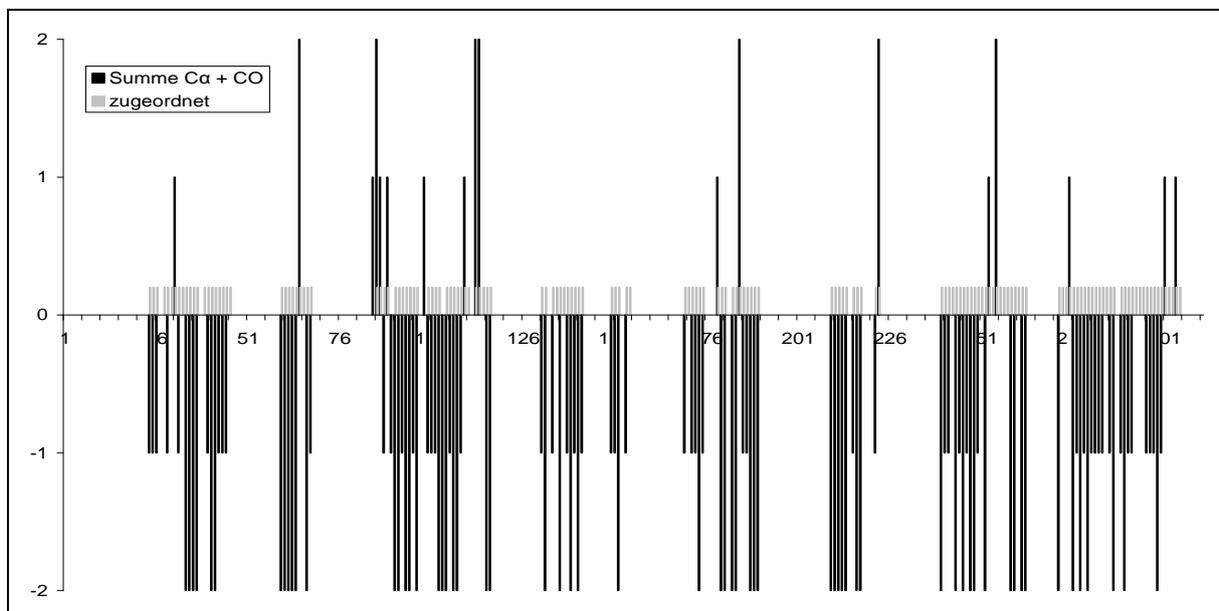


Abb. 4.16) Bestimmung der Lage der Sekundärstrukturelemente anhand eines Verschiebungsindexes

Die Abbildung zeigt die Auftragung der summierten Indexe für $C\alpha$ - und Carbonyl-Kohlenstoffpositionen gegen die Sequenzposition für die zugeordneten Bereiche (grau). Die überwiegend negativen Werte spiegeln den hohen Falblatt-Gehalt des Antikörpers wieder, während die positiven Werte die Enden der Falblätter markieren.

Anhand der Übertragung des aufgestellten Verschiebungsindexes auf das Sekundärstrukturmodell (Kap. 4.4.4.2) war es möglich, dieses zu verifizieren. Wie der Abbildung 4.17 entnommen werden kann, spiegelt das Modell in sehr guter Weise die Lage der β -Falblätter und vor allem der *Turn*-Übergänge wieder. Des Weiteren lieferte der Verschiebungsindex wichtige Daten zur Aufstellung des Strukturmodells (Kap. 4.4.5).

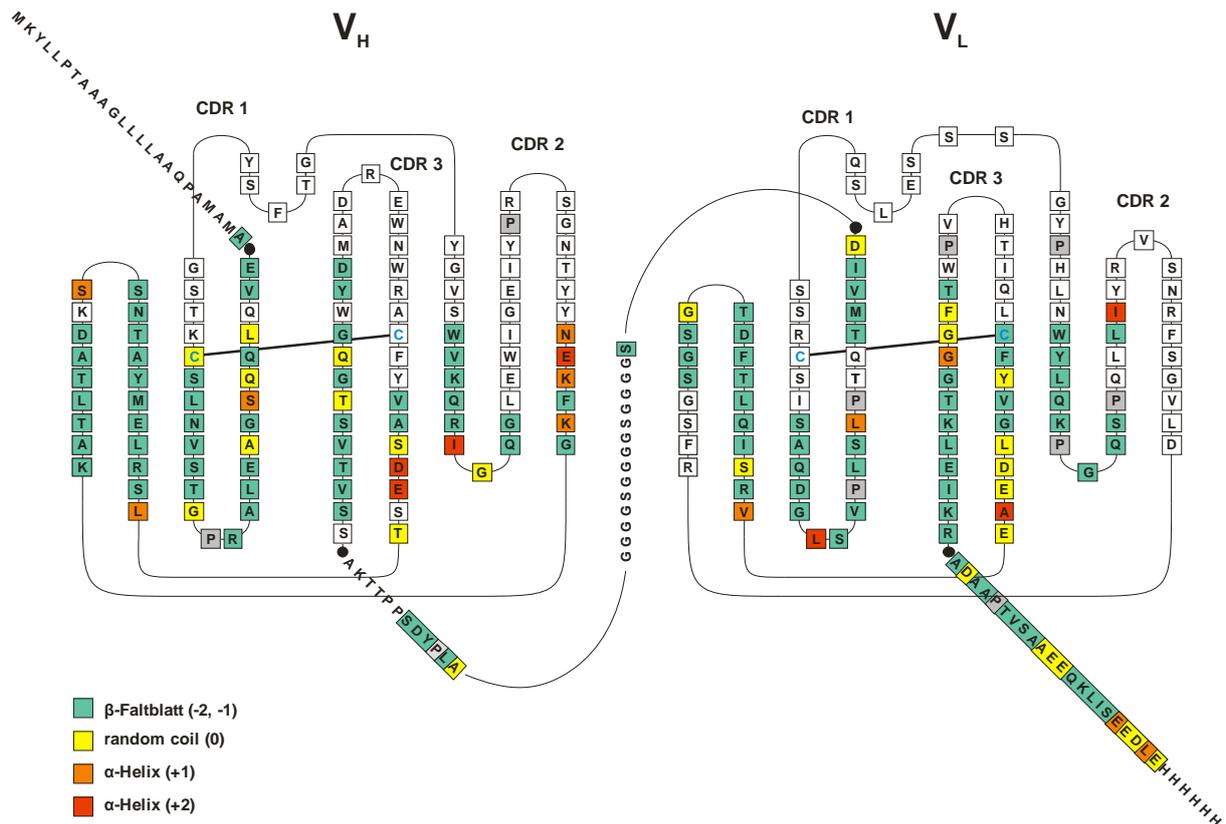


Abb. 4.17) Darstellung der Daten des Verschiebungsindex mittels des Sekundärstrukturmodells

Die Abbildung verdeutlicht die gute Beschreibung der *Turn*-Positionen im aufgestellten Sekundärstrukturmodell. Grün markierte Positionen deuten auf eine Faltblatt-Konformation hin, während gelbe, orange und rote Markierungen auf *random coil* und α -helikale Bereiche, oder aber einen *Turn* hinweisen.

4.4.4.5 Eine lösliche paramagnetische Spinsonde hilft bei der Identifizierung der Proteinoberfläche

Um oberflächenexprimierte Aminosäuren bestimmen zu können, wurde eine paramagnetische Spinsonde verwendet. Die lösliche Substanz Gadolinium-diethylentriamide-pentaessigsäure-bismethylamid (Gd(DTPA-BMA)) (Pintacuda & Otting, 2002) ist Bestandteil eines kommerziellen Kontrastmittels für die Magnetresonanztomographie und wird unter dem Handelsnamen OMNISCAN™ vertrieben (GE Healthcare, Braunschweig, D). Über eine Signalverbreiterung in einfachen ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektren können oberflächenexponierte Aminosäuren und deren Abschirmung durch den Liganden bestimmt werden. Mit einer vollständig ^{15}N -markierten W226-Probe wurden daher ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektren für die Probe ohne Zusätze und in Gegenwart der Spinsonde (5 mM) aufgenommen.

Hierzu wurden aus der, mit dem Programm NMRview5 erstellten, Signalliste sich

überlappende Signale entfernt, um eine gegenseitige Beeinflussung bei der Auswertung auszuschließen, was zu einer Reduzierung der Liste auf 118 Positionen führte, von denen 82 bereits zugeordnet waren. Für diese Liste wurden mit dem Programm die *Peak-Volumina*, jeweils vor und nach Zugabe der Spinsonde, ermittelt und anschließend normiert. Die Darstellung der Messwerte mittels eines Strukturmodells für den scF_v W226 (Kap. 4.4.5) ist Abb. 4.18 zu entnehmen. Eine schlüssige Interpretation der ebenfalls für den Komplex aus scF_v W226 und PrP-Helix 1 ermittelten Intensitäten ist allerdings erst im Kontext einer für den Komplex vorliegenden Zuordnung möglich.

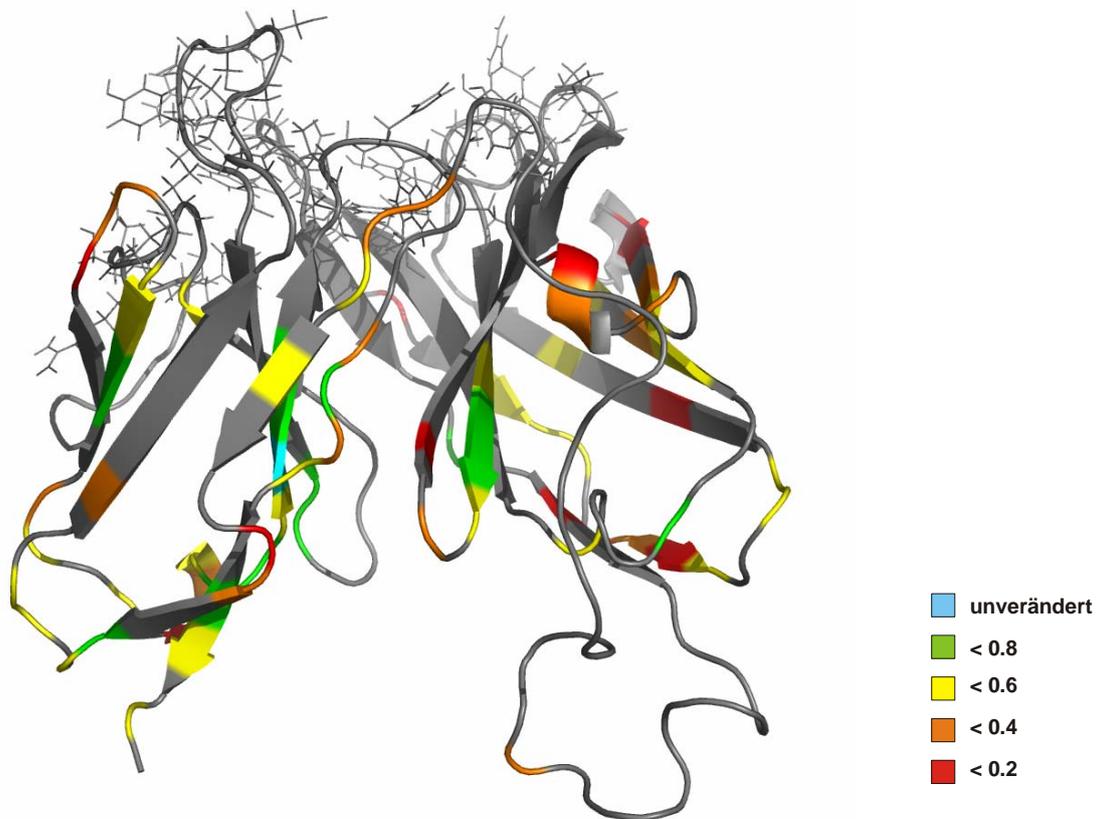


Abb. 4.18) Eine paramagnetische Spinsonde ermöglicht die Charakterisierung der W226-Oberfläche

Anhand des Strukturmodells für den scF_v W226 (Kap. 4.4.5) sind die Effekte der löslichen paramagnetischen Spinsonde Gd(DTPA-BMA) auf sequenziell zugeordnete Positionen dargestellt. Das nach der Zugabe intensivste Signal (Tyr 261) diente der Normierung. Die am stärksten verminderten Signale sind in rot wiedergegeben und zeigen eine starke Oberflächenexposition an.

4.4.5 Strukturmodell des scF_v W226

Die im Rahmen dieser Arbeit mittels diverser spektroskopischer Techniken für den scF_v W226 und seinen Bindungspartner PrP^C gewonnenen Daten erlauben die Erstellung eines vorläufigen Modells für den Komplex aus scF_v W226 mit PrP^C und eine erste Analyse der Bindungsoberfläche. Der mit dem Programm HADDOCK (Domnuez *et al.*, 2003; de Vries *et al.*, 2007) generierte Komplex besteht aus dem Homologiemodell von scF_v W226 (PD Dr. Stephan Schwarzingger, unveröffentlichte Ergebnisse) auf Basis des PDB-Eintrags des scF_v-Fragmentes 1ktr (Kaufmann *et al.*, 2002) und der NMR-Struktur von humanem PrP^C bei pH 7 (Calzolari & Zahn, 2003). Für das *Docking* wurden auf Seiten des Prion Proteins die oben beschriebenen Reste des Epitops (Kap. 4.4.1) als eindeutige Bindungspartner definiert, sowie alle weiteren Aminosäuren aus Helix 1 (mit Ausnahme des nicht oberflächenexponierten Y150) und die räumlich nahe liegenden Reste der aminoterminalen Windungen von Helix 3 als mögliche Interaktionspartner definiert. Aus den oben genannten NMR-Untersuchungen an W226 geht hervor, dass alle CDRs zur Bindung beitragen, oder dass sich zumindest die NMR-Parameter (z. B. chemische Verschiebung, Dynamik) für diese Bereiche bei Zugabe des Epitops verändern. Weil aber keine Aminosäuren als definitive Bindungspartner festgelegt werden konnten, wurden die oberflächenexponierten Reste der CDRs und räumlich benachbarte, oberflächenexponierte Reste als mögliche Interaktionspartner für PrP^C definiert. Die Simulation ergab dabei im Wesentlichen zwei verschiedene Orientierungen von PrP^C zu W226, von denen eine auf Grund der sehr kleinen Interaktionsoberfläche und einer entstehenden großen Kavität an der Bindestelle zwischen beiden Molekülen ausgeschlossen wurde. Im zweiten Fall liegt PrP^C mit seiner Helix 1 parallel in der Furche, welche die CDRs des Antikörperfragmentes bilden (PD Dr. Stephan Schwarzingger, unveröffentlichte Ergebnisse).

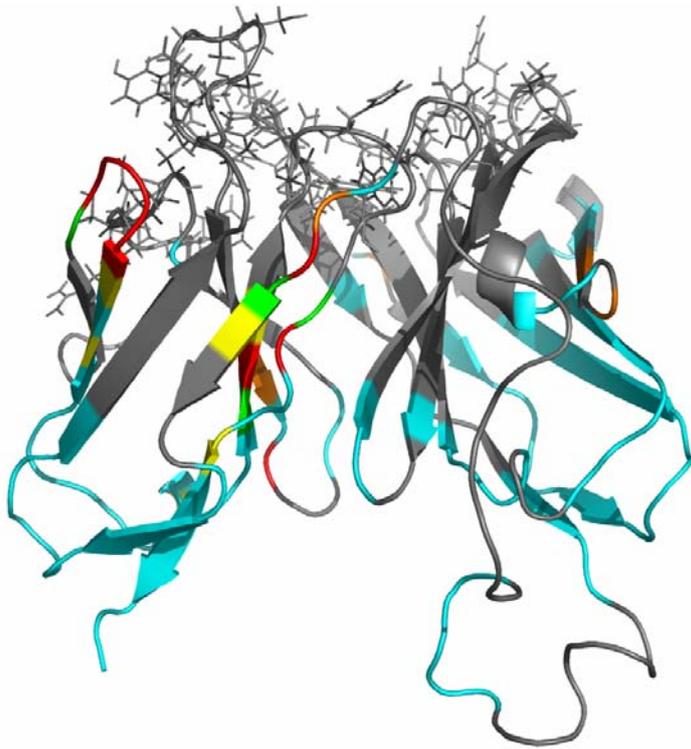


Abb. 4.19) Strukturmodell des scFv W226

Die Wiedergabe der Effekte der Titration mit PrP-Helix 1, analog zu Abb. 4.14 (bei gleichem Farbschema), verdeutlichen die Verteilung der beobachteten Änderungen der Signalpositionen. Die V_H befindet sich in der Abbildung rechts.

Das Modell des Komplexes zeigt, dass die Helix 1 des Prion Proteins tatsächlich mit allen CDRs des Antikörpers Kontakte ausbildet, was in guter Übereinstimmung mit den NMR-Titrationsdaten steht. Die Ladungsverteilung des Homologiemodells (PD Dr. Stephan Schwarzingler, unveröffentlichte Ergebnisse) lässt eine starke *Cluster*-Bildung aromatischer Reste erkennen, die von geladenen Aminosäuren flankiert werden. Eine Betrachtung der Anordnung der aromatischen, geladenen und polaren Reste in PrP-Helix 1 legt bereits nahe, dass der Aminoterminus von PrP-Helix 1 in Richtung des aromatenreichen *Clusters* im Antikörper orientiert ist. Im Modell ist nun Y145 (PrP-Helix 1) in unmittelbarer räumlicher Nähe zu Y76 der CDR 2 der schweren Kette (CDR-H2), mit dem es eine stabilisierende Aromaten-Aromaten-Wechselwirkung ausbilden kann.

Weitere essenzielle Wechselwirkungen sind die von Arg 148 (PrP-Helix 1) mit Asp 128 (CDR-H3), welche im Modell eine nicht oberflächenexponierte Salzbrücke ausbilden und die Interaktion von E152 (PrP-Helix 1) mit His 268 aus CDR-L3. Neben diesen Wechselwirkungen existieren noch einige weitere Interaktionen zwischen PrP-Helix 1 und W226, die hauptsächlich über polare, aber ungeladene Aminosäuren vermittelt werden. Somit befindet sich das Modell in hervorragender Übereinstimmung mit den im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen der Fluoreszenz-Studie (Kap. 4.4.1).

Ein weiteres Resultat der *Docking*-Berechnung ist, dass auch Bereiche des Prion Proteins, die in vorangegangenen Experimenten nicht als Epitop oder als Teile hiervon identifiziert worden waren, Kontakte mit dem Antikörper ausbilden (Abb. 4.20). Insbesondere gilt dies für die aminoterminalen Bereiche der PrP-Helix 3, die über Aspartat 202 und die beiden Threonine 199 und 201 mit Aminosäuren der CDR-H2 des Antikörperfragmentes interagiert.

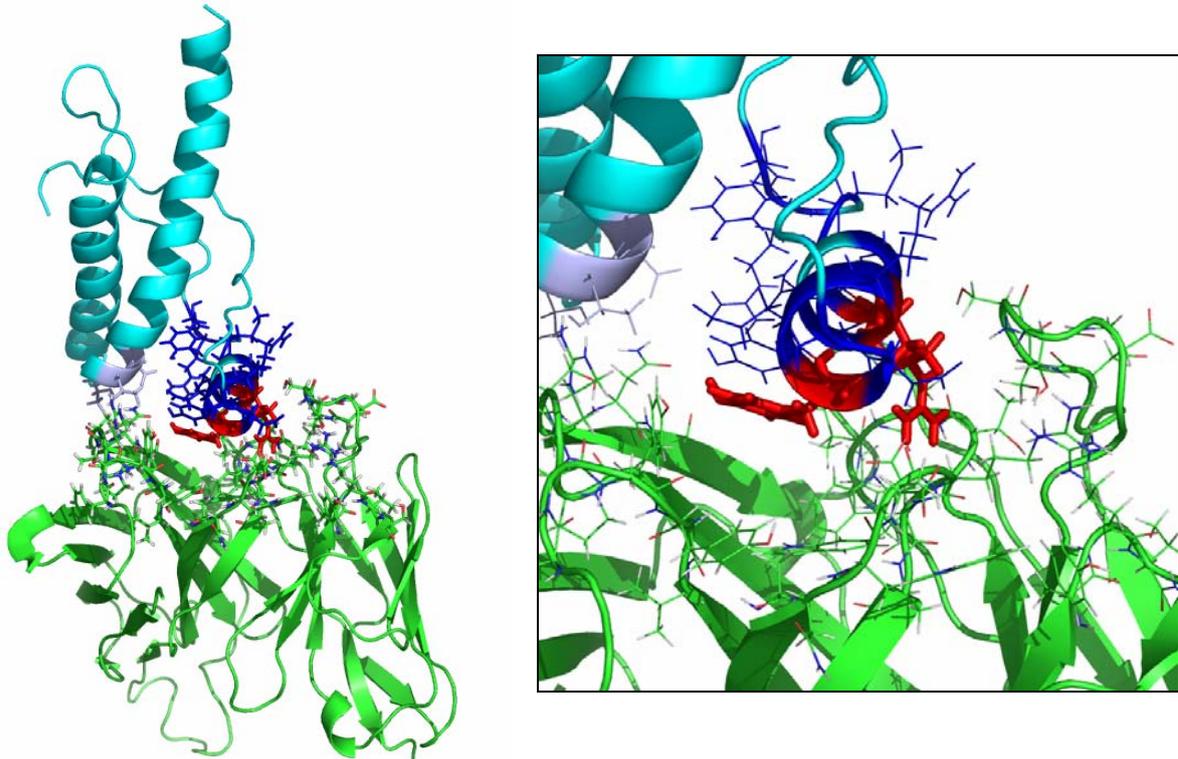


Abb. 4.20) Komplex des scF_v W226 mit seinem Epitop der PrP-Helix 1

Das mit dem Programm HADDOCK generierte Modell zeigt die in der Bindungsfurche verborgene Lage der PrP-Helix 1. Am linken Bildrand der Ausschnittsvergrößerung ist die Wechselwirkung der CDR 2 der schweren Kette mit dem aminoterminalen Bereich der Helix 3 des PrP^C-Moleküls (grau) zu erkennen. In grün ist der scF_v W226, in hellblau huPrP und in dunkelblau PrP-Helix 1 wiedergegeben. Die Reste des Epitops sind rot markiert, die V_H befindet sich links in den Abbildungen.

5. Diskussion

Ziel der Arbeit war es, antiprionwirksame Substanzen und ihre Komplexe mit der zellulären Form des Prion Proteins zu charakterisieren. Hierzu wurden sehr unterschiedliche Substanz- bzw. Wirkstoffklassen mit strukturbioologischen Methoden, vor allem der magnetischen Kernresonanz-Spektroskopie, untersucht. Hierbei ergab sich, dass kleine organische Moleküle und kurze Peptide, die zuvor als antiprionial wirksam beschrieben wurden, nicht, oder nur mit für die Wirksamkeit nicht relevanten Bindungskonstanten, an PrP^C binden. Eine Ausnahme bildet hier die putativ antiprionwirksame Verbindung 293G02.

5.1 Der Wirkstoff 293G02 bindet an PrP^{Sc} und an PrP^C

Wie eingangs bereits erwähnt, handelt es sich bei 293G02 um eine antiprionwirksame Substanz, die sich allerdings in wässrigen Puffern schlecht lösen lässt. 293G02 stammt aus der sogenannten DIVERSet-Bibliothek (ChemBridge Corp., San Diego, CA, USA), einer Sammlung von pharmazeutisch relevanten Bausteinen, die in DMSO gelöst vorliegen. Aus dieser Bibliothek wurde ein Auszug von 10.000 Substanzen in der Gruppe von Prof. Dr. Hans A. Kretzschmar untersucht (Bertsch *et al.*, 2005). Für die SIFT-Experimente wurden die Komponenten zehnfach mit 20 mM Kalium-Phosphat, pH 6.0, 0.1 % (v/v) Nonidet P-40 verdünnt, so dass die zur Messung verwendeten Proben 10 % (v/v) DMSO enthielten.

Das Lösen der als Feststoff erhaltenen Substanz in einem Co-Lösungsmittel, speziell in DMSO, sollte im Rahmen dieser Arbeit aber vermieden werden. Eine vorausgegangene Untersuchung des Einflusses von DMSO auf ¹⁵N-His₆-huPrP(90-230) (Mangels, 2004) hatte bei einer schrittweisen Titration auf 10 % (v/v) DMSO zu deutlichen Änderungen in den aufgenommenen ¹H, ¹⁵N-Heterokorrelationsspektren geführt. So waren zum einen eine generelle Verschiebung des gesamten Spektrums, zum anderen aber auch individuelle Verschiebungen einzelner Signale zu beobachten gewesen, die auf eine bevorzugte Bindung an bestimmten Positionen im Prion Protein hindeuten. Diese Effekte setzten bereits bei einer Konzentration von 3 % (v/v) DMSO ein. Zu den Problemen, die sich für die Auswertung aus den Signalverschiebungen ergeben hätten, kommt der Umstand, dass für DMSO im Zellkulturversuch eine anti-Prion-Wirksamkeit und im Tierversuch eine verlängerte Inkubationszeit beschrieben wurde (Tatzelt *et al.*, 1996; Shaked *et al.*, 2003). Durch die gewählte Methode der Zugabe von Feststoff sind stöchiometrische Aussagen nicht möglich,

Nebeneffekte durch organische Co-Lösungsmittel, wie sie für DMSO eingetreten wären, konnten so aber vollständig ausgeschlossen werden.

Betrachtet man das ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektrum des Volllängen Prion Proteins (Abb. 4.1), so befinden sich im zentralen Bereich, von ca. 8 - 9 ppm in der Protonendimension, die sehr intensiven Signale des unstrukturierten Aminoterminus, während in den Bereichen unter 8 ppm bzw. über 9 ppm vor allem die Resonanz-Signale der strukturierten, carboxyterminalen Domäne (PrP (125-228)) liegen. Diese Signale sind deutlich voneinander separiert und können im Gegensatz zu den stark überlagerten Signalen des Aminoterminus gut für die Interpretation von Bindungsstudien herangezogen werden.

Als Ergebnis der Zugabe von 293G02 wurde die Auslöschung aller Signale, die der globulären Domäne zugeordnet werden können, detektiert. Im Gegensatz dazu blieben Lage und Intensität der Resonanzen des unstrukturierten Aminoterminus unverändert. Obwohl 293G02 nur als schlecht löslicher Feststoff der Proteinlösung zugegeben wurde, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass gelöstes 293G02 mit PrP^C interagiert. Diese Wechselwirkung findet offenbar mit der globulären Domäne, also im Bereich der Aminosäuren 125 - 228, statt. Da aber nahezu alle Resonanzen dieser Region betroffen und bis unter das Detektionslimit verbreitert sind, kann keine exakte Eingrenzung der Binderegion erfolgen. Es gibt im Wesentlichen zwei mögliche Gründe für die beobachtete Signalauslöschung im strukturierten Bereich von PrP^C, die beide eine Bindung von 293G02 an PrP^C einschließen.

Zum einen kann eine Bindung mit niedrig mikromolarer Dissoziationskonstante, wie sie für die Interaktion von 293G02 mit PrP^{Sc} angenommen wird (Bertsch *et al.*, 2005), zu internen Bewegungen des Moleküls auf der mittleren NMR-Zeitskala, also im Mikro- bis Millisekunden-Bereich, führen. Bindungen, die Bewegungen auf dieser Zeitskala auslösen, führen ihrerseits zur Signalverbreiterung. In so einem Fall würde man aber erwarten, dass vor allem der direkte Bindungsbereich des Liganden und eventuell räumlich benachbarte Reste diesen Effekt zeigen. Wie dem Spektrum (Abb. 4.1) zu entnehmen ist, erstreckt sich die Signalauslöschung jedoch über einen sehr großen Bereich, der durch die Bindung eines einzelnen 293G02-Moleküls nicht schlüssig erklärt werden kann. Demzufolge erscheint eine spezifische Bindung von 293G02 an PrP^C wenig wahrscheinlich.

Zum anderen kann der Signalverlust durch eine verstärkte, transversale Relaxation hervorgerufen werden, die ihrerseits durch eine Vergrößerung der Molekülmasse ausgelöst werden kann. Letztere könnte durch Aggregation mehrerer PrP^C-Moleküle erfolgen. In einem solchen Fall induziert 293G02 die Oligomerisierung des Prion Proteins über die globulären Domänen, bei der sich die Rotationsgeschwindigkeiten der den Nukleus bildenden globulären

Domänen deutlich verlangsamen. Die unstrukturierten und an der Aggregation offenbar nicht beteiligten Aminotermini bleiben hingegen flexibel und weisen eine dementsprechend geringe Rotationskorrelationszeit auf, die die Detektion der korrespondierenden Resonanzen erlaubt. Es ist aber auch möglich, dass sich in der Lösung kolloidale, dispergierte Partikel von 293G02 befanden, die sich durch die erfolgte Zentrifugation nicht abtrennen ließen. In diesem Fall kann es zur Bindung der globulären Domäne von einem oder mehreren PrP^C-Molekülen an die vergleichsweise großen Feststoffpartikel kommen, was ebenfalls zur Signalauslöschung im globulären Bereich und zu detektierbaren Signalen für den flexiblen Aminoterminus von PrP^C führt.

Auf Basis der vorliegenden Resultate ist es allerdings nicht möglich, zwischen den beschriebenen Modellannahmen zu unterscheiden. Hierfür sind weitere Untersuchungen, beispielsweise mittels Lichtstreuung, zur Charakterisierung von Aggregatgrößen oder Zentrifugation mit größeren Beschleunigungen zur Abtrennung kolloidaler, unlöslicher Ligandenpartikel erforderlich. Da 293G02 als potenter Wirkstoffkandidat, der an PrP^{Sc} bindet, beschrieben wurde, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente aber auch auf eine Bindung an die zelluläre Konformation des Prion Proteins hinweisen, ist eine weitere Untersuchung des Bindungsverhaltens von 293G02 angezeigt. So kann einerseits geklärt werden, ob PrP^C oder PrP^{Sc} - für welches keine Strukturinformation existiert und welches wahrscheinlich in mehreren Konformationen vorliegt, die sich in unterschiedlichen Prionenstämmen manifestieren - das bessere Ziel für die Wirkstoffentwicklung ist. Andererseits lassen sich aus weiterführenden Studien auch wichtige Schlüsse auf den wirksamen Mechanismus ziehen, ob beispielsweise die Bindung an PrP^{Sc} die Elongation aktiv terminiert oder ob die Bindung an PrP^C eine Anlagerung an PrP^{Sc} verhindert, welches wiederum durch zelluläre Mechanismen abgebaut werden kann.

5.2 Die meisten getesteten kleinen Wirkstoffmoleküle zeigen keine oder nur eine sehr schwache Interaktion mit PrP^C

5.2.1 Quinpramin

Auch bei der sehr potenten antiprionwirksamen Substanz Quinpramin, die als Chimäre aus Quinacrin und Desipramin synthetisiert wurde (Klingenstein *et al.*, 2006), galt es aufzuklären, ob eine direkte Bindung an PrP^C für die anti-Prion-Wirkung verantwortlich ist. Für den

Baustein Quinacrin konnte gezeigt werden, dass dieser zwar spezifisch an Motive aus zwei aufeinander folgenden aromatischen Aminosäuren bindet, dass aber auch nicht-wirksames 9-Aminoacridin mit gleicher Affinität bindet (Mangels, 2004). In Kooperation mit den Gruppen von PD Dr. Carsten Korth (Düsseldorf) und Prof. Dr. Peter Gmeiner (Erlangen) wurden daher Studien zur Aufklärung des Wirkmechanismus der aus dieser Zusammenarbeit hervorgegangenen Substanz Quinpramin durchgeführt.

Durch die deutlich schlechtere Löslichkeit der bivalenten anti-Prion-Substanzen gegenüber Quinacrin waren Untersuchungen mittels NMR-Spektroskopie allerdings eingeschränkt. Während mit Quinacrin ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektren für einen 10- bis 30-fachen Überschuss an Wirkstoff aufgenommen werden konnten, war dies für Quinpramin nur bis zu einem fünffachen Überschuss möglich. Es ließen sich so Effekte in der gleichen Region wie nach der Quinacrin-Zugabe beobachten, welche vergleichbar gering waren und auf eine ähnlich schwache, direkte Wechselwirkung mit den identischen Motiven hindeuteten. Im Rahmen von Fluoreszenz-detektierten Interaktionsstudien konnte keine direkte Bindung von PrP mit Quinpramin festgestellt werden. Der fünffach bessere EC_{50} -Wert, verglichen mit der Wirkung von Quinacrin, lässt sich somit nicht aus den Experimenten ableiten.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studien zur Bindung von bivalenten Wirkstoffkandidaten mit jeweils zwei trizyklischen, aromatischen Systemen, die bereits von May *et al.* (2003) als mehrfach potenter als Quinacrin beschrieben wurden, zeigen keine hochaffine Wechselwirkung mit dem zellulären Prion Protein. Dies gilt für die von May *et al.* beschriebenen, sehr schlecht löslichen Bisacridine, wie auch für das noch stärker wirksame und besser lösliche Quinpramin. Die beobachtete, schwache direkte Interaktion mit dem Prion Protein kann also - wie auch für Quinacrin selbst schon - als Mechanismus für die antiprionale Wirkung weitgehend ausgeschlossen werden. Damit ist auch unwahrscheinlich, dass eine Anreicherung der Wirkstoffmoleküle in den Lysosomen, wie von Vogtherr *et al.* (2003) postuliert, für die Wirkung erforderlich ist.

Die im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse stehen dagegen im Einklang mit neueren Erkenntnissen (Klingenstein *et al.*, 2006), die die Wirkung von Quinpramin auf die Interaktion mit sogenannten *lipid rafts*, also detergentresistenten Membran-Domänen (Simons & Ikonen, 1997), zurückführen. Diese Ergebnisse legen nahe, weitere bi- oder gar mehrvalente Derivate von Quinpramin mit Verbindungen herzustellen, welche die Beschaffenheit von Membranen, insbesondere der *lipid rafts*, beeinflussen und deuten darauf hin, dass eine direkte Bindung an PrP^C nicht berücksichtigt werden muss.

5.2.2 Studien an kurzen Peptiden

In der vorliegenden Arbeit wurden auch unterschiedliche Peptide auf ihre Bindung an PrP^C untersucht, nämlich einerseits kurze Peptide aus Phagendisplay-Bibliotheken, die mittels ELISA als PrP^C-bindend identifiziert worden waren, und andererseits ein Peptid, welches in einem Designansatz aus den Binderegionen des PrP^C-bindenden Antikörpers VRQ14 abgeleitet wurde. Es konnte allerdings, entgegen den Erwartungen, in keinem der Fälle eine Interaktion mit der zellulären Form des Prion Proteins beobachtet werden. Vor allem bei dem aus VRQ14 abgeleiteten Peptid entsprach dies nicht den Annahmen. Das Peptid beinhaltet die beiden antigenbindenden Schleifen 1 und 2 der leichten Kette, die in der Kristallstruktur des Komplexes aus ovinem PrP^C und VRQ14 als wichtigste Interaktionselemente identifiziert worden waren. Diese beiden Schleifen sind im Antikörper durch eine Haarnadel aus einem antiparallelen β -Faltblatt verbunden, welches von einem Gerüst aus weiteren β -Faltblatt-Strängen stabilisiert wird (Abb. 4.2). Wie in Richardson & Richardson (2002) beschrieben, neigen isolierte Faltblätter stark zur Aggregation, weshalb das die Schleifen 1 und 2 verbindende Faltblatt entfernt und die Schleifen nur durch eine *Turn*-Sequenz verbunden wurden. Durch das Herausschneiden dieses wichtigen, stabilisierenden Sekundärstrukturelementes im verwendeten Peptid vergrößert sich aber offenbar die interne Dynamik und verringert im gleichen Maß das Vorliegen der bindungskompetenten Konformation. Obwohl die NMR-Spektroskopie besonders geeignet ist, selbst sehr schwache Wechselwirkungen bis in den millimolaren Bereich zu detektieren, konnte keine Veränderung in den NMR-Spektren und somit keine Interaktion festgestellt werden.

Eine Abnahme der Bindungskonstanten, bedingt durch das Entfernen von Bindemotiven aus ihrem tertiären Strukturumfeld, wurde bereits in der Literatur beschrieben. Die Interaktion des Prion Proteins mit der Laminin- γ -1-Kette ist hier ein gutes Beispiel (Graner *et al.*, 2000). In Wettbewerbsversuchen wurde gefunden, dass Laminin- γ -1, das mit einer Dissoziationskonstanten von 20 nM an PrP^C bindet, erst durch Konzentrationen des dem Laminin- γ -1-Bindemotiv entsprechenden Peptids verdrängt werden kann, die vier bis fünf Größenordnungen über der Dissoziationskonstante für das Vollängenprotein liegen.

Für die Peptide aus den Phagendisplay-Bibliotheken kann grundsätzlich auch die hohe Dynamik als Grund für das Fehlen einer Bindung in Frage kommen. Zusätzlich sind die ausgewählten Peptide relativ kurz, was zu einer kleinen Interaktionsfläche mit dem Prion Protein führen würde. In diesem Zusammenhang ist von Interesse, dass die Oberfläche der globulären Domäne von PrP^C keine großen Bindungstaschen oder Furchen aufweist, die für

eine Bindung von Liganden genutzt werden können (Abb. 5.1). Bedingt durch diese relativ ebene Oberfläche kann es erforderlich sein, Phagendisplay-Bibliotheken mit längeren Peptiden zu untersuchen. Auf Grund der Oberflächenbeschaffenheit von PrP^C fällt auch ein Wirkstoffdesignansatz weg, der bei vielen anderen Proteinen oder Enzymen, die natürliche Liganden binden und entsprechende Binderegionen aufweisen, verfolgt wird, nämlich die Derivatisierung der korrespondierenden Liganden. Letztendlich können auch die Oberflächenstruktur des Prion Proteins und das Fehlen ausgeprägter Bindungstaschen Gründe dafür sein, dass bisher nur sehr wenige, kleine organische Moleküle in zahlreichen Hochdurchsatz-Studien als PrP-bindend identifiziert wurden.

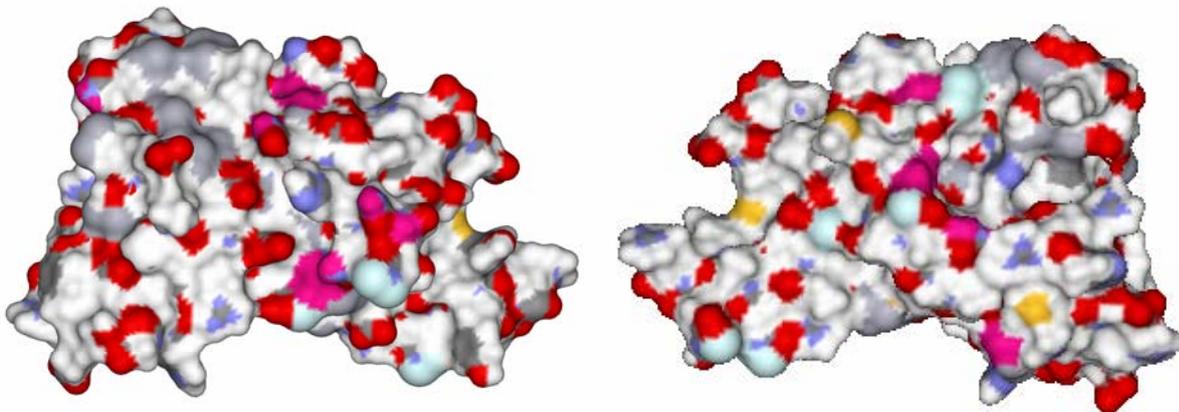


Abb. 5.1) Oberflächendarstellung von huPrP^C

Gezeigt sind Vorder- und Rückseite (links bzw. rechts) anhand der durchschnittlichen NMR-Struktur von huPrP(121-230) bei pH 7.0. Die Abbildung basiert auf der NMR-Struktur von Calzolari & Zahn (2003), PDB-Eintrag 1HJM und wurde mit dem Programm WebLab Viewer 5 Lite (Accelrys, San Diego, CA, USA) erstellt.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studien zeigen, dass Peptide und kleine organische Moleküle nur bedingt bis sehr schlecht für die Leitsubstanzfindung für anti-Prion-Wirkstoffe verwendet werden können.

5.3 In einem NMR-Schnelltest ist 9-Aminoacridin als Sonde für Makromolekülinteraktionen vielseitig einsetzbar

Die NMR-Spektroskopie ist eine hervorragend geeignete Methode zur Untersuchung von Interaktionen biologischer Makromoleküle. Ein Nachteil ist hingegen, dass hierfür eine Anreicherung mit sehr teuren Isotopen, sowie hohe Konzentrationen der beteiligten Makromoleküle erforderlich sind. In der Regel müssen die experimentellen Bedingungen für NMR-Studien aufwendig optimiert werden. Deshalb sind Schnelltests wünschenswert, die diese Optimierung, unter gleichzeitiger Minimierung des Materialeinsatzes, ermöglichen.

Die gefundenen, schwachen Bindungen mit millimolaren Dissoziationskonstanten von trizyklischen Aromaten an oberflächenexponierte Doppelaromaten-Motive wurden im Rahmen dieser Arbeit für einen solchen Schnelltest verwendet. Dieser basiert auf der Methode von Ludwiczek und Kollegen (2004), welche die schwache Wechselwirkung von Phenylphosphat mit der SH2-Domäne von PLC γ 1 zur Detektion von Makromolekülinteraktionen ausnutzt. Im Detail bindet Phenylphosphat mit einer Dissoziationskonstante von 1 mM an PLC γ 1-SH2. Für den Nachweis der Interaktion zweier interessierender Biomakromoleküle muss nun PLC γ 1-SH2 an eines der beiden Moleküle kloniert werden. Anschließend wird mittels selektiver Anregung und selektiver Inversion die longitudinale Relaxationszeit des Protons in der meta-Position von Phenylphosphat in Gegenwart des Fusionsproteins aus einem Interaktionspartner und PLC γ 1-SH2 gemessen. Dabei wird auf Grund der schwachen Bindung und dem daraus folgenden schnellen Austausch auf der NMR-Zeitskala ein Mittelwert aus freiem und gebundenem Phenylphosphat beobachtet. Dieser Wert wird dabei von der kleineren R_1 -Relaxationsrate des freien, in großem Überschuss vorhandenen, Phenylphosphats dominiert. Bindet nun der andere Bindungspartner an das Fusionsprotein, erhöht sich die Molare Masse des Komplexes, wodurch sich wiederum die Relaxationseigenschaften verändern. Obwohl weiterhin ein Durchschnittswert von freiem und komplexgebundenem Phenylphosphat gemessen wird, lassen sich die nun auch auf das komplexierte Phenylphosphat übertragenen, veränderten Relaxationseigenschaften des neu entstandenen Makromolekülkomplexes sehr genau bestimmen. Dieser Test, der von der Bindungskonstanten des organischen Reporter-moleküls und seiner Ligandenbindungsdomäne (hier Phenylphosphat und PLC γ 1-SH2), der Dissoziationskonstanten der interagierenden, biologischen Makromoleküle, dem Molekulargewicht des Makromolekülkomplexes und nicht zuletzt den eingesetzten Konzentrationen an Ligand und Proteinen abhängt, erlaubt dennoch eine quantitative

Abschätzung der Bindungsstärke im Makromolekülkomplex. Trotz der prinzipiellen Einfachheit dieses NMR-Schnelltests hat das Verfahren den Nachteil, dass für jede neu zu charakterisierende Wechselwirkung ein neues Fusionsprotein, bestehend aus einem der Interaktionspartner mit der Ligandenbindungsdomäne, kloniert werden muss und gegebenenfalls Expression und Reinigung neu optimiert werden müssen.

Auch in der vorliegenden Arbeit sollten biologische Makromolekülkomplexe untersucht werden, bei denen sich auf Grund von Größe und anderen experimentellen Parametern, wie beispielsweise unterschiedlicher Löslichkeit von Interaktionspartnern im freien und gebundenen Zustand, die Frage nach der Durchführbarkeit von NMR-Studien stellt. Zur Abschätzung dieser Fragestellung ist ein Schnelltest wünschenswert. Hierzu wurde die oben beschriebene Methode von Ludwiczek variiert, indem die schwache Wechselwirkung von 9-Aminoacridin mit dem Prion Protein verwendet wurde, um Makromolekülinteraktionen zwischen dem Volllängen Prion Protein (23 kDa) und anderen Proteinen unter NMR-Bedingungen testen bzw. optimieren zu können. Der wesentliche Vorteil dieser Entwicklung ist, dass nun die Ligandenbindungsdomäne mit einem der Interaktionspartner identisch ist und langwierige Klonierungsarbeiten somit entfallen. Es sei aber darauf hingewiesen, dass der Test in diesem Fall nur funktioniert, wenn Ligand (hier 9-Aminoacridin) und der andere beteiligte Makromolekülbindungspartner verschiedene Bindungsstellen im Protein haben.

Für 9-Aminoacridin konnte gezeigt werden, dass es an oberflächenzugängliche Motive aus zwei aufeinander folgenden aromatischen Aminosäuren bindet (Mangels, 2004). Im Fall des Prion Proteins erfolgt die Bindung an das Doppelyrosinmotiv Y224-Y225, welches vollständig lösungsmittlexponiert am Carboxyterminus der Prion Proteins in Helix 3 liegt. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Bedingungen existieren, in denen das Fusionsprotein aus Glutathion-S-Transferase und vier Oktarepeat-Einheiten des Prion Proteins (4OR-GST) unter NMR-Bedingungen mit dem Oktarepeat-Bereich vom Volllängen Prion Protein interagiert (Leliveld *et al.*, 2006). Somit liegen Ligandenbindungsstelle und Binderegion für den Interaktionspartner weit voneinander entfernt und eine gegenseitige Beeinflussung ist nicht zu erwarten.

Es ist allerdings zu beachten, dass 9-Aminoacridin auf Grund der geringen Spezifität auch leicht an andere Proteine binden kann. Dies konnte tatsächlich für den oben genannten potenziellen Interaktionspartner, 4OR-GST, gezeigt werden, da dieser ebenfalls oberflächenzugängliche Doppelaromatenmotive besitzt. Wie Abbildung 4.4 zu entnehmen ist, führt die Zugabe von 4OR-GST auch in Abwesenheit von shPrP zu einer Zunahme der beobachteten Relaxationsrate für 9-Aminoacridin. In so einem Fall kann der Schnelltest

dennoch zur Anwendung gebracht werden. Es müssen aber die Relaxationsraten von freiem 9-Aminoacridin und 9-Aminoacridin in Gegenwart jeweils eines der beiden Bindungspartner des Makromolekülkomplexes bestimmt und bei der Auswertung der Messung von 9-Aminoacridin in Gegenwart des Makromolekülkomplexes berücksichtigt werden.

Dieses Ergebnis zeigt jedoch einen weiteren Vorteil der Verwendung von 9-Aminoacridin auf. Da es wegen seiner relativ unspezifischen Bindung an Doppelaromatenmotive bereits *per se* schwach an viele Proteine bindet, kann es sehr vielseitig eingesetzt werden. Die im Rahmen dieser Arbeit gezeigte Bindung an GST kann ebenfalls ausgenutzt werden, weil GST einer der klassischen Fusionspartner für viele Proteine ist, der eine einfache Reinigung ermöglicht, oft aber auch löslichkeitssteigernd oder stabilisierend wirkt und dementsprechend oft in biochemischen oder molekularbiologischen Studien Verwendung findet.

Die in dieser Arbeit vorgestellte Variante des NMR-Schnelltests unterscheidet sich aber noch in weiteren Aspekten von der ursprünglichen Methode. Zum einen wurden die Proteine hier in D₂O gelöst, um einen Austausch der Amidprotonen der Proteine gegen Deuterium zu erzielen. Hierdurch wird die Zahl der NMR-Signale für den Bereich, in welchem die Protonen von 9-Aminoacridin liegen, reduziert und das Hintergrundrauschen des Tests somit weiter gesenkt. Des Weiteren kann die Signallage der 9-Aminoacridin-Resonanzen in Abhängigkeit von dessen Konzentration leicht variiert werden, beispielsweise um mögliche Überlappungen mit den Signalen aromatischer Seitenketten aus den Proteinen zu reduzieren. Hintergrund hierfür ist, dass 9-Aminoacridin im Bereich der eingesetzten Konzentrationen einem Monomer-Dimer-Gleichgewicht unterliegt. Dieses zusätzliche Gleichgewicht macht eine qualitative Auswertung des Schnelltests in Bezug auf das Bindeverhalten der biologischen Makromoleküle sehr schwer. Im vorliegenden Fall konnte für den Integrationsbereich von 7.81 - 8.00 ppm durch die Verwendung von D₂O die Überlagerung mit Amidprotonen-Signalen auf ein Minimum reduziert (Abb. 5.2) und die Konzentration an 9-Aminoacridin so gewählt werden, dass die Resonanz von ¹HA (Mangels, 2004) nur eine minimale Überlappung mit aromatischen Resten des Proteins zeigt. Hierdurch konnten Genauigkeit und Empfindlichkeit des Tests verbessert werden.

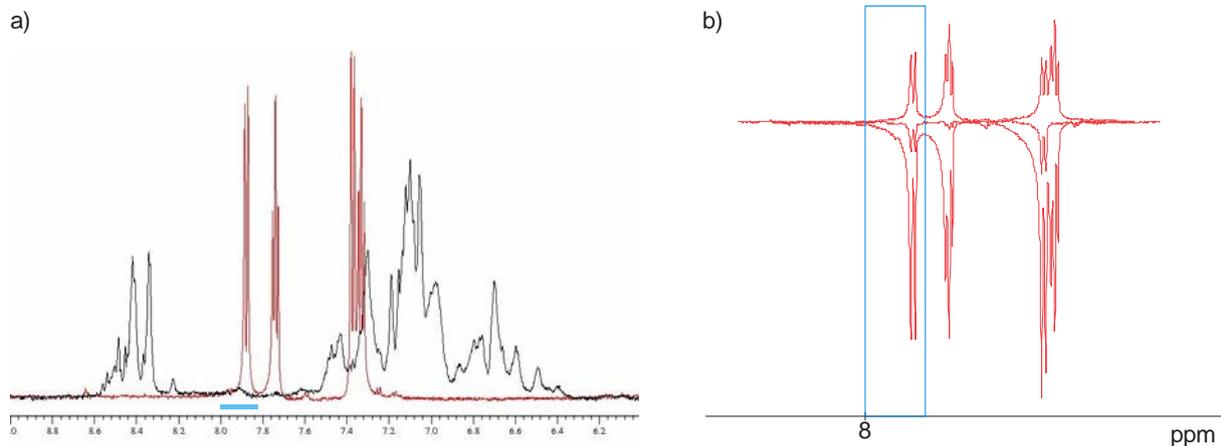


Abb. 5.2) Der für den Schnelltest gewählte Integrationsbereich

- a) Der Überlagerung der Spektren für 9-Aminoacridin und in D_2O gelöstem shPrP(23-231) ist die geringe Überlappung der Signale im Amidprotonen-Bereich zu entnehmen.
- b) Der Integrationsbereich von 7.81 - 8.00 ppm wurde so gewählt, dass er für alle Zeitpunkte des Relaxationsverlaufes optimal passte, wie hier an drei Zeitpunkten exemplarisch gezeigt wird.
- Der Integrationsbereich von 7.81 - 8.00 ppm ist in beiden Abbildungen blau markiert.

Ein weiterer Unterschied liegt in der Anregung der NMR-Signale. Im Gegensatz zur selektiven Anregung zur Inversion von nur einem Spin, die eine exakte Beschreibung des Relaxationsphänomens des betroffenen Spins erlaubt, wurde hier eine nicht selektive Anregung vorgenommen. Hierzu war es erforderlich, residuales Wasser-Signal mittels Vorsättigung zu unterdrücken. Die nicht selektive Anregung hat andererseits erlaubt, über mehrere Spins des 9-Aminoacridins zu integrieren. Obwohl im Grunde nicht mehr von einem monoexponentiellen Signalabfall ausgegangen werden kann, zeigen die betroffenen Spins sehr ähnliche Relaxationsraten, so dass letztendlich durch Anpassung der gemessenen Daten an einen einzelnen Exponentialabfall apparente Relaxationskurven erhalten werden konnten, die in guter Übereinstimmung mit der Annahme einer monoexponentiellen Relaxationsrate stehen. Diese NMR-technisch gesehen nicht exakte Behandlung der Relaxation hat aber den Vorteil, dass durch Zusammenfassen mehrerer Signale ein hervorragendes Signal/Rausch-Verhältnis erzielt werden konnte, welches die Detektion selbst kleiner Unterschiede in den Relaxationsraten ermöglicht. Alternativ können die Signale für einzelne Multipllett-komponenten auch getrennt integriert und ausgewertet werden, was aber zu keinen signifikanten Unterschieden im Ergebnis führte.

Der Schnelltest wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit, wie oben bereits erwähnt, zum Feststellen der Untersuchbarkeit der Wechselwirkung von 4OR-GST mit Vollängen Prion

Protein eingesetzt. Wie in den Ergebnissen beschrieben, konnte aber keine signifikante Veränderung der Relaxationsraten bei Ausbildung des makromolekularen Komplexes detektiert werden. Im Detail zeigte die Messung von 9-aa in Gegenwart von PrP^C und 4OR-GST einen weiteren Anstieg der Relaxationsrate. Trotz der sehr kleinen Messfehler, die unter anderem durch die Anwendung optimierter *Sampling*-Strategien erreicht wurden (Eisenmann *et al.*, 2004), ist der gemessene Unterschied im Vergleich zu den Relaxationsraten von 9-Aminoacridin in Gegenwart je einer Komplexkomponente nicht ausreichend groß, um auf eine Interaktion schließen zu können, die eine weiterführende Untersuchung mittels NMR-Spektroskopie rechtfertigt.

Der hier entwickelte Schnelltest konnte jedoch erfolgreich eingesetzt werden, um mit nicht isotopenmarkierten Proteinproben die Wechselwirkung von PrP^C und der extrazellulären Domäne des Lamininrezeptor-Vorläuferproteins (LRP) für NMR-Studien zu optimieren. In den nachfolgenden heteronuklearen NMR-Experimenten mit ¹⁵N-markiertem PrP konnte die Binderegion des LRPs am Prion Protein kartiert werden (Ziegler, 2007).

5.4 Kristallisation von 4OR-GST

Während im humanen Prion Protein die Oktarepeat-Region aus vier aufeinander folgenden, hochkonservierten Wiederholungen der kupferbindenden Sequenz PHGGGWGQ aufgebaut ist, steht eine Verlängerung um weitere Wiederholungen in Verbindung mit der erblichen Form der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (Goldfarb *et al.*, 1991). Des Weiteren konnte für Sequenzen bestehend aus vier Oktarepeats gezeigt werden, dass diese in Anwesenheit von Kupferionen an PrP^C binden (Leliveld *et al.*, 2006). Obgleich ihrer Bedeutung für Prionerkrankungen und die mögliche Funktion des Prion Proteins in der Kupferhomöostase (Brown, 2001), sind nur wenige Strukturinformationen über die flexible Oktarepeat-Region verfügbar. Zahn (2003) konnte mittels NMR-spektroskopischer Untersuchungen zeigen, dass ein Peptid aus drei Oktarepeat-Einheiten eine Struktur in Lösung ausbildet, die einen pH-abhängigen Aggregationskeim darstellt. NMR-Studien können aber nicht in Anwesenheit von Cu(II) erfolgen, welches paramagnetisch ist und über paramagnetische Relaxation zur Auslöschung der interessierenden Signale führen würde. Aussagen über die Konfiguration im kupferbeladenen Zustand konnten beispielsweise aus EXAFS-, EPR- und ENDOR-Studien an einfachen Oktarepeat-Peptiden und mit Daten aus PrP^C (23-231) korreliert werden (del Pino *et al.*, 2007). Eine hochauflösende Struktur, wie sie für das Verständnis pathogener

Mechanismen und für das Medikamentendesign erforderlich ist, ist aber für die gesamte Oktarepeat-Sequenz bisher nicht verfügbar. Im Rahmen dieser Arbeit war es möglich, erste Kristalle eines Fusionsproteins aus SjGST und vier Oktarepeat-Einheiten herzustellen. Die Kristallisationsbedingungen wurden für das kupferfreie Fusionsprotein optimiert. Für diese in Abwesenheit von Kupfer angezogenen Kristalle liegen gut interpretierbare Elektronendichten hingegen nur für die SjGST-Domäne vor.

Bei der Analyse der Diffraktionsdaten war hierbei grundsätzlich von Vorteil, dass die Kristallisationsbedingungen für den Fusionspartner GST aus *Schistosoma japonicum* bekannt waren und das Kristallisationsverhalten des gesamten Fusionsproteins dominierten. Die veröffentlichten Kristallstrukturen von SjGST (PDB-Einträge 1GTA & 1GNE) erleichtern hierbei die Lösung des kristallographischen Phasenproblems durch Anwendung der Patterson-Suchmethode mit homologem Suchmodell. Alternativ können hierzu die gebundenen Kupferionen herangezogen werden. Es wurden in dieser Arbeit Bedingungen gefunden, mit denen kupferfreie 4OR-GST-Kristalle mit Kupferionen beladen werden konnten.

Eine der wesentlichen experimentellen Schwierigkeiten bei der Herstellung der kupferbeladenen Kristalle ist das Umsetzen der Kristalle aus der ursprünglichen Kristallisationslösung in Pufferbedingungen, in denen Kupferionen in Lösung gehalten werden. Hierbei wird auf größere Kristalle Stress ausgeübt, der zum Auftreten von Rissen führt. Es zeigte sich, dass im Zuge der Äquilibrierung die Rissbildung wieder geringfügig zurückging. Allerdings konnten Risse, die sich negativ auf die Qualität der Diffraktionsbilder auswirken, nicht wieder ganz rückgängig gemacht werden.

Diese Beobachtungen legen zweierlei mögliche Vorgehensweisen für eine weitere Verfeinerung der Inkubation mit Kupferionen nahe. Einerseits bietet es sich an, den Stress für die Kristalle durch ein schrittweises Umsetzen in sukzessive vom Kristallisationspuffer in den Inkubationspuffer variierende Lösungen zu reduzieren. Ein weiterer möglicher Grund für die Bildung von Spannungen und daraus resultierenden Rissen kann auch der Einbau der Metallionen an sich sein. In den untersuchten Kristallen wurden zusätzlich drei an die Oberfläche von GST gebundene Kupferionen gefunden, was sich durch die sehr hohe Kupferkonzentration im Beladungspuffer erklären lässt. Es ist aber zu erwarten, dass die Oktarepeats, die Kupfer mit mikromolaren Dissoziationskonstanten binden, noch vor der GST-Oberfläche beladen werden. Eine Reduktion der Kupferkonzentrationen, eventuell verbunden mit einer verlängerten Inkubationszeit, kann helfen, den Stress für die Kristalle weiter zu reduzieren und den Einbau überflüssiger Metallionen zu vermeiden. Am aussichtsreichsten erscheint eine Kombination beider Variationen, nämlich zuerst ein

schrittweises Umsetzen der Kristalle in den entsprechenden kupferfreien Beladungspuffer, gefolgt von der Beladung mit Kupfer in niedriger Konzentration. Da bereits in den hier untersuchten, stressbeschädigten Kristallen Bereiche mit Elektronendichten detektiert werden konnten, ist zu erwarten, dass schonend beladene Kristalle eine weitgehend vollständige Elektronendichtekarte für die Sequenz aus vier Oktarepeat-Wiederholungen ergeben werden.

5.5 Der PrP^C-bindende Antikörper W226

5.5.1 Helix 1 des Prion Proteins bildet ein strukturiertes Epitop

Untersuchungen in der Gruppe von PD Dr. Carsten Korth hatten gezeigt, dass der scF_v W226 an Peptide bindet, die die Sequenz von Helix 1 des Prion Proteins enthalten (Korth, unveröffentlichte Ergebnisse). Da Helix 1 als isoliertes Peptid noch eine hohe Helizität besitzt, liegt es nahe, dass nicht die gesamte der Helix 1 entsprechende Sequenz an der Bindung beteiligt ist, sondern nur ausgewählte Aminosäuren. Diese ausgeprägte Helizität, die bereits in früheren Untersuchungen für isolierte PrP-Helix 1-Peptide nachgewiesen worden war (Ziegler *et al.*, 2003), bildet zugleich die Voraussetzung für eine detaillierte Untersuchung der Epitop-Struktur mit Helix 1-Peptiden mittels Fluoreszenzspektroskopie. Hierzu wurden systematisch Mutanten generiert, bei denen jede Sequenzposition mit Oberflächenkontakt im Prion Protein durch ein Alanin ersetzt wurde. Alanin hat gleichzeitig den Vorteil, einerseits eine relativ neutrale Aminosäure in Bezug auf Interaktionen zu sein und andererseits selbst eine hohe Helix-Propensität zu besitzen.

Um jene Aminosäuren zu bestimmen, die für die feste Bindung von PrP-Helix 1 and scF_v W226 verantwortlich sind, wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie die Dissoziationskonstante des Komplexes von scF_v W226 mit den einzelnen Alanin-Mutanten von PrP-Helix 1 bestimmt. Dabei muss der Einfluss der Helix-Stabilität mit berücksichtigt werden, um systematische Fehler zu vermeiden. Mit dem AGADIR-Algorithmus (Muñoz & Serrano, 1994; 1995a; 1995b) wurden für die Mutanten die Helix-Propensitäten im Vergleich zum Wildtyp ermittelt (Tab. 4.2 b). Diese vergleichsweise geringen Variationen korrelieren aber nicht mit den in den Fluoreszenztitrationen ermittelten Dissoziationskonstanten, so dass ein direkter Einfluss der Helix-Propensität auf die Wechselwirkung zwischen Helix 1-Peptid und Antikörper ausgeschlossen werden kann. Betrachtet man die Mutanten im Einzelnen, so

zeigen R148, R151, E152, M154 und R156 eine deutlich verminderte Tendenz zur Ausbildung einer helikalen Struktur. Für M154 und R156 wurden trotzdem K_D -Werte im Wildtyp-Bereich ermittelt. R148, R151 und E152 binden dagegen schlechter als der Wildtyp, wobei R148 und E152 zwei der drei für eine Bindung essenziellen Positionen sind und R151 ein Vorgänger einer solchen Position ist.

Unterstellt man einen kausalen Zusammenhang zwischen Helix-Propensität und gemessenem K_D -Wert, sollte die Mutante mit der dritten essenziellen Position, Y145, ebenfalls einen verminderten Helix-Gehalt aufweisen. Dies ist aber nicht der Fall, der mit Hilfe von AGADIR ermittelte Wert ist sogar höher als der für das Wildtyp-Peptid. In diesem Zusammenhang sei auch erwähnt, dass Ziegler *et al.* (2003) in ausgewählten Alanin-Mutanten experimentell zeigen konnten, dass trotz einer von AGADIR vorhergesagten Verminderung der Helix-Propensität keine signifikante Veränderung des tatsächlichen Helix-Gehaltes auftrat.

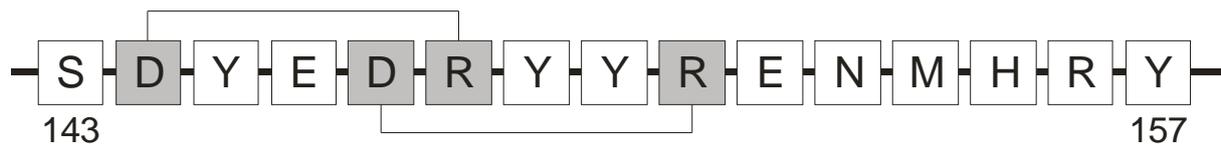
Für das Peptid mit der Wildtyp-Sequenz und jene Mutationen, die keinen Beitrag zur Bindung leisten, wurde eine Dissoziationskonstante von 400 nM ermittelt. Diese ist 100-fach schwächer als die Dissoziationskonstante von scF_v und Vollängen Prion Protein (PD Dr. Carsten Korth, unveröffentlichte Ergebnisse). Der Grund hierfür liegt wiederum in der erhöhten Dynamik in dem isolierten Peptidmotiv im Vergleich zum stabil gefalteten Protein. Allerdings kann auch die Beteiligung räumlich dem Epitop nahestehender Reste im Protein mit ein Grund für eine verminderte Bindungsstärke sein.

Unter anderem trägt ebenfalls die Verwendung der humanen Prion-Sequenz, anstelle der Maus-Prion-Sequenz, hierzu bei. Während letztere ein Tryptophan an Position 145 besitzt, liegt für die humane Sequenz hier ein Tyrosin vor. Die Verwendung der Tryptophan-Fluoreszenz als Messsignal hatte diesen Sequenz-Austausch notwendig gemacht. Der Austausch W145Y vermindert die Stabilität isolierter Prion Peptide. Im Zuge von computergestützten Optimierungsverfahren wurde Tryptophan an dieser Stelle bevorzugt gefunden (Ziegler & Schwarzinger, 2006). Daher wurde auch diskutiert, ob die offenbar erhöhte Resistenz der Maus neben anderen Faktoren auf diesen Sequenz-Unterschied zurückzuführen ist. Da Y145 eine der drei essenziellen Positionen des Epitops darstellt, kann eine Verminderung der Dissoziationskonstante durch diesen Aminosäure-Austausch nicht ausgeschlossen werden.

Die Fluoreszenzmessungen ergaben, dass Y145, R148 und E152 den Hauptanteil an der Bindung haben und die benachbarten Positionen E146, Y149 und R151 ebenfalls, wenn auch in geringerem Ausmaß, zur hochaffinen Bindung von PrP^C an scF_v W226 beitragen. Betrachtet man diese für die Bindung verantwortlichen Positionen im Kontext der Struktur

des Prion Proteins, so liegen alle an der Oberfläche und bilden ein zusammenhängendes, strukturelles Epitop (Abb. 4.7). Auffällig ist die Polarität und hohe Ladungsdichte des Bindemotivs.

Abb. 5.3) Wiedergabe der Sequenz von huPrP-Helix 1 unter Hervorhebung der internen Salzbrücken



verändert nach Norstrom und Mastrianni (2006)

Norstrom und Mastrianni (2006) konnten durch Mutationsstudien von geladenen Resten in Helix 1 des Prion Proteins zeigen, dass insbesondere Arginin 151 für die Prionpropagation erforderlich ist. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studien zeigen, dass dieser Rest ein Teil des Epitops ist und daher vermutlich durch die Wechselwirkung mit dem therapeutisch aktiven W226 von pathologisch relevanten Interaktionen, wie beispielsweise mit pathogenen Prionkonformeren oder für die Transkonformation erforderlichen Helfer-Proteinen, abgeschirmt wird. Somit kann erstmals ein Modell für die therapeutische Aktivität von W226 postuliert werden. In diesem Zusammenhang ist von Interesse, dass W226 gegen die Scrapie-Konformation des Prion Proteins gerichtet war, aber an ein Strukturelement der zellulären Prion Protein-Konformation bindet. Dies legt nahe, dass Helix 1 sowohl in PrP^C, wie auch in PrP^{Sc}, in gleicher Konformation vorliegt. Dies ist im Widerspruch mit bisher veröffentlichten Strukturmodellen, in denen PrP^{Sc} eine β -Helix-Konformation einnimmt und in denen Helix 1 von PrP^C entfaltet ist (Wille *et al.*, 2002; Govaerts *et al.*, 2004). Der Befund ist hingegen in guter Übereinstimmung mit einem von DeMarco und Daggett (2004) veröffentlichten Strukturmodell, in welchem die C-terminale Domäne von PrP^C weitgehend seine Struktur beibehält und die pathogene Interaktion unter anderem über einen Teil im Bereich 90 - 125 der Sequenz vermittelt wird. Dass Helix 1 auch in PrP^{Sc} als α -Helix vorliegt, belegen ebenfalls die von Watzlawik *et al.* (2006) durchgeführten Versuche, die ergaben, dass Helix 1 die Prion-Aggregation beschleunigt, dabei selbst aber strukturell nicht konvertiert wird.

5.5.2 *Single domain*-Antikörper zur Reduzierung der Konstruktgröße

Weil Antikörper auf dem Markt für Protein-Pharmazeutika von stetig wachsender Bedeutung sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit die strukturelle Charakterisierung des anti-Prion-Antikörpers W226 unternommen. Proteine als Therapeutika haben generell den Nachteil, dass sie im Organismus eine Immunantwort auslösen können, nicht ausreichend stabil sind oder im Körper zu schnell abgebaut werden, um ihre Wirkung zu entfalten. Nicht zuletzt kann die Bioverfügbarkeit ein Problem darstellen, wie beispielsweise im Fall von neurodegenerativen Erkrankungen, wo das Protein die Blut-Hirnschranke passieren muss, um in das zentrale Nervensystem zu gelangen. Bei Antikörpern ist für die therapeutische Wirkung in der Regel nur der Bereich mit den komplementbestimmenden Regionen erforderlich. Daher gibt es Proteindesignansätze, um Fragmente von Antikörpern herzustellen, die kleiner, stabiler und leichter transportierbar und zugleich noch humanverträglicher sind, als die oft in Tierzellen gewonnenen Ausgangsmoleküle. Antikörper vom IgG-Typ sind dabei Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 150 kDa. In der vorliegenden Arbeit wurde ein nur mehr 33 kDa großes scF_v-Fragment strukturell untersucht. Obwohl *single chain*-Antikörper schon klein im Vergleich zum vollständigen IgG-Antikörper sind, stellen sie für die NMR-Spektroskopie immer noch eine Herausforderung dar. Für einige scF_v ist aber bekannt, dass auch isolierte V_H/V_L-Domänen an das Epitop binden können (Heppner *et al.*, 2001). Diese Domänen sind ca. 110 Aminosäuren groß und im Prinzip gut für NMR-Untersuchungen geeignet.

Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit *single domain*-Antikörper entworfen und deren Expression und Reinigung getestet. Um hierbei verschiedene Strategien verfolgen zu können, wurden zwei unterschiedliche Vektoren verwendet. Die pET-22b - Konstrukte entsprechen dem ursprünglichen scF_v W226 - Vektor, reduziert um den (GGGGS)₃-*Linker* und eine der beiden Domänen. Ergänzt wurden die neuen Vektoren um eine PreScission-Schnittstelle zwischen pelB-Signalsequenz und der enthaltenen Domäne. Weil bei der Expression von scF_v W226 beobachtet wurde, dass die Signalsequenz nicht abgespalten wurde, oder es gar zu Mischungen von Proteinen mit und ohne Signalsequenz kam, die sich in weiterer Folge nicht mehr trennen ließen, wurde mit der Proteaseerkennungsstelle die Möglichkeit geschaffen, Signalsequenzen, wenn erforderlich, nachträglich zu entfernen.

In den pET-15b - Konstrukten folgt die isolierte Domäne einem His₆-*Tag* und einer Thrombin-Schnittstelle. Letztere sollte die Abspaltung des Reinigungs-*Tags* ermöglichen. Auf die pelB-Signalsequenz wurde gezielt verzichtet, da mit diesen Varianten die Expression als *inclusion bodies* mit anschließender Reinigung unter denaturierenden Bedingungen getestet

werden sollte. Der Vorteil dieser Variante liegt in den großen Mengen an Protein, die hierbei gewonnen werden können, was für die kostenintensive Markierung mit NMR-aktiven Isotopen von Bedeutung ist. Nachteilig ist hingegen, dass eine Rückfaltung mit einer oxidativen Rekonstruktion der Disulfidbrücke erforderlich ist.

Expressionstests der pET-15b - Konstrukte wurden in *E. coli* BL21 StarTM (DE3) - und BL21 RosettaTM (DE3) - Zellen durchgeführt. Wachstum und Expression waren hierbei in den letztgenannten Zellen deutlich besser. Eine reproduzierbare Reinigung konnte dagegen nicht etabliert werden. Während Zellaufschluss und ein erster Reinigungsschritt über eine Nickelaffinitätssäule, verbunden mit einer oxidativen Rückfaltung, generell problemlos verliefen, besaß das Eluat eine sehr hohe Neigung zur Aggregation, die weiterführende Arbeitsschritte verhinderte. Eine Dialyse gegen Wasser oder wässrige Puffer, die für die Gefriertrocknung oder weitere Reinigungsschritte erforderlich gewesen wäre, führte in allen Versuchen zum vollständigen Ausfällen des Proteins. Versuche zur Rückfaltung der denaturierten *single domain*-Konstrukte verliefen ebenfalls erfolglos und bestätigten eine frühere Veröffentlichung (Constantine *et al.*, 1992).

Alternativ wurde auch eine Expression in einem *trx(-)* - Stamm unternommen, um das Protein nativ zu reinigen. Für diesen Zweck wurden *E. coli* BL21 Rosetta-gamiTM (DE3) - Zellen getestet. Zwar war eine gute Induktion zu erzielen, das Wachstum der Zellen schwankte aber sehr stark, weshalb dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde.

Die Expression des *heavy chain* - pET-22b - Konstrukts in *E. coli* BL21 RosettaTM (DE3) funktionierte gut und ließ sich bis zur 10 l - Fermenterkultivierung ausbauen. Der Anteil an *inclusion bodies* blieb dabei durchgehend gering. Eine Aggregation während der Reinigung trat aber auch hier auf und konnte nicht vermieden werden. Die *light chain*-Variante dieses Konstrukts wurde daher nicht getestet.

Obwohl es generell gelang, Einzelkettenantikörper - wie sie etwa bei Kamelen und Haien auftreten und die wegen ihres einfacheren Aufbaus von großem pharmazeutischen Interesse sind - zu klonieren und zu reinigen, konnte das Ziel, diese Proteine in NMR-tauglichen Konzentrationen herzustellen, nicht realisiert werden.

5.5.3 Fortgeschrittene Methoden der Isotopenmarkierung und Reinigung über eine Immunoaffinitätssäule sind die Voraussetzung für die NMR-Spektroskopie an scF_v W226

Ein kritischer Schritt ist bereits die Expression des scF_v-Fragmentes, bei der es zu Mischungen von Zielprotein mit und ohne pelB-Signalsequenz kommt. Unter idealen Voraussetzungen soll diese, nach dem zum Zweck der oxidativen Faltung erfolgten Transport ins Periplasma, abgespalten werden. Dies ist deswegen problematisch, weil die beiden Proteinvarianten im Verlauf der weiteren Reinigung nicht mehr getrennt werden können. Es wurde gefunden, dass durch Absenken der Temperatur während der Expression und durch Zugabe von Rifampicin die pelB-Signalsequenz zwar nicht abgespalten wurde, dafür aber der Anteil an homogenem Expressionsprodukt maximiert werden konnte. Dies ist besonders in Hinblick auf die wegen der Proteingröße erforderliche Dreifachmarkierung mit ²H, ¹³C und ¹⁵N im Maßstab von vier Litern Medium pro NMR-Probe von erheblicher Bedeutung. Von zentraler Bedeutung für die Reinigung war des Weiteren die Verwendung einer Immunoaffinitätssäule mit immobilisiertem PrP^C. Die hohe Spezifität der Interaktion ermöglichte es, die vorherige Nickelaffinitätssäulen-Reinigung mit niedriger Stringenz durchzuführen und so die Verluste an Antikörper zu senken. Gleichzeitig erfolgte eine Selektion auf die Konformation, da nur korrekt gefaltete Antikörper an das immobilisierte PrP binden konnten. Die Reinigung führte daher zu hochreinem, konformationell homogenem Protein, wie es für die Strukturuntersuchungen mittels NMR-Spektroskopie benötigt wird.

Für die Aufnahme dreidimensionaler NMR-Spektren, wie sie für eine Zuordnung derart großer Proteine unbedingt erforderlich sind, muss das Protein in ¹³C- und ¹⁵N-markierter Form vorliegen. Darüber hinaus wird eine Deuterierung notwendig, da das hohe Molekulargewicht zu verminderter Rotation und somit zu schnellerer Relaxation führt. Diese bedingt eine Verkürzung des freien Induktionsabfalls, was sich in Form von breiteren Signalen mit geringerer Intensität äußert. Von der verstärkten T₂-Relaxation sind besonders wasserstoffatomtragende Kohlenstoffatome betroffen. Durch Deuterierung an diesen Positionen werden die hauptverantwortlichen dipolaren Relaxationsmechanismen reduziert. Um die Alpha-Positionen mit Deuterium zu besetzen, erfolgte die Anzucht in D₂O (99.90 % D) in minimalem Medium mit ¹³C-Glucose und ¹⁵N-Ammoniumsulfat. Die Bakterien wurden dabei durch Erhöhung der D₂O-Konzentration in mehreren Schritten langsam adaptiert. Um bei einem Kulturvolumen von vier Litern und einem Bedarf von 4g/l Glucose den Verbrauch an ¹³C-Glucose zu minimieren, wurde während der Wachstumsphase schrittweise der Anteil an ¹³C-Glucose von 50 auf 100 % vor der Induktion erhöht. Bei Verwendung von nicht

deuterierter Glucose kann so ein Deuterierungsgrad von ca. 70 - 80 % erreicht werden. Durch die anschließende Reinigung in wässrigen Puffern tauschen die Amidprotonen wieder gegen Wasserstoff aus. Der Deuterium/Wasserstoff-Austausch vollzieht sich in dieser Zeit vollständig, wie der Vergleich mit einer nicht-deuterten Probe zeigt.

Die erreichbare Konzentration in der NMR-Probe ist ein wichtiges Erfolgskriterium bei NMR-basierten Strukturuntersuchungen, insbesondere, wenn es sich um große Proteine handelt. Dreifach isotoptenmarkierter scF_v W226 ließ sich bis zu 600 µM konzentrieren, wobei sich die Konzentration durch Präzipitatbildung innerhalb weniger Tage auf ca. 350 µM verringerte. Bei dieser Konzentration blieb die Probe aber über Wochen stabil und erlaubte die Aufnahme mehrdimensionaler Spektren. Weil W226 bis ca. 45 °C stabil ist, wurde die Temperatur während der Aufnahme der NMR-Spektren auf 35 °C eingestellt, wodurch sich die Rotationskorrelationszeit verringert und die Signalintensitäten gegenüber Messungen bei Umgebungstemperatur deutlich verbessern.

Wie in dem Abschnitt 4.4.4.1 bereits beschrieben, konnten heteronukleare NMR-Experimente aufgenommen werden, welche die Zuordnung für fast die Hälfte der Resonanzen erlaubten. Einer der Hauptgründe hierfür liegt in den stark unterschiedlichen Signalintensitäten, die bereits in 2D-HSQC-Spektren zu beobachten ist. In besonders unempfindlichen, für die Zuordnung aber essenziellen, Experimenten, wie dem HNCACB-Experiment, konnten für diese bereits im 2D-Spektrum schwachen Signale keine Resonanzen mehr beobachtet werden. Dies betrifft vor allem den Bereich, der für die Epitop-Bindung verantwortlich ist und somit im Zentrum des Interesses dieser Arbeit steht. Als Ursache für diese Signalauslöschung kann Linienverbreiterung auf Grund von Bewegungen im Mikro- bis Millisekunden-Bereich angenommen werden, wie sie für die Region der relativ langen Schleifen im Paratop plausibel erscheint. Hierfür spricht auch, dass bei Zugabe von PrP-Helix 1-Peptid zu scF_v W226 eine Reihe neuer Signale sichtbar wird bzw. verbunden mit einer Veränderung der Signallage an Intensität zunehmen. Zusätzlich zeigt eine Reihe von Signalen deutliche Änderungen der Signalpositionen, von denen eine Anzahl auch sequenziell zugeordnet werden konnte (siehe unten).

Vor allem um die Zuordnung im Bereich des Paratops, also die bei der Titration mit Helix 1 besonders stark verschobenen Signale (Kap. 4.4.4.3), zu verbessern, wurden aminosäuretypselektiv ¹⁵N-markierte Proben von W226 hergestellt. Darüber hinaus ergänzten diese Experimente die 3D-Experimente, vor allem in jenen Fällen, in denen die Cβ-Atome, die für die Identifizierung des Aminosäuretyps besonders wichtig sind, nicht mehr detektiert werden konnten.

Die Auswahl der Aminosäuren und ihre Kombination ergaben sich aus mehreren Gesichtspunkten. Zum einen wurden vorwiegend Aminosäuren eingesetzt, die in den CDRs zu finden sind. Hierbei wurde die Auswahl aber eingeschränkt, weil nur Aminosäuren, die am Ende der Aminosäure-Biosynthese stehen, im verwendeten Protokoll eingesetzt werden können. Um die Zahl der Kultivierungen gering zu halten, wurden zum anderen Aminosäuretypen in einer Probe kombiniert, die im HSQC-Spektrum wenig gegenseitige Überlappung zeigen und die idealerweise zusätzlich noch durch ihre C α - und C β -Signale eindeutig identifizierbar sind.

In der A-G-Y - Kultur ist die Markierung von 125 der 311 Signale des scF $_v$ W226 möglich. Dies entspricht der Anzahl an Signalen für ein Protein, dessen Struktur mit Standard-NMR-Methoden bestimmt werden kann. Die Gesamtzahl der Signale ergibt sich nicht nur aus den Aminosäuren Alanin, Glycin und Tyrosin, welche in ^{15}N -markierter Form eingesetzt wurden, sondern in diesem speziellen Fall auch aus Serin, Cystein und Phenylalanin, die dem Aminosäure-Stoffwechsel von Glycin bzw. Tyrosin entstammen. Hierbei wird aus dem markierten Glycin zunächst Serin und hieraus wiederum Cystein aufgebaut. Während für Serin die Signale noch eine vergleichbare Stärke aufweisen, sind von den vier Cysteinen nur zwei schwach zu erkennen.

Das ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektrum dieser Probe weist die beabsichtigt geringere Signaldichte auf und erlaubt, die Signale für Alanin, Glycin und Serin zweifelsfrei zu bestimmen. Diese drei Aminosäuren zeichnen sich nicht nur durch ihre Häufigkeit in der W226-Sequenz aus, sondern sind durch charakteristische C α - und C β -Verschiebungen in den HNCACB- und HN(CO)CACB-Spektren klar zu unterscheiden. Für die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin, die stoffwechselbedingt gemeinsam auftreten, sind diese Unterschiede allerdings zu gering, um eine eindeutige Bestimmung zu ermöglichen. Die entsprechenden Positionen können daher zwar auf diese beiden Möglichkeiten, aber nicht weiter eingegrenzt werden. In analoger Weise wurden die Aminosäuren Leucin und Valin kombiniert, die Aminosäuren Arginin und Threonin aber als separate Proben hergestellt. Durch die jeweilige Aufnahme eines ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektrums von W226 mit und ohne PrP-Helix 1-Peptid konnte in Verbindung mit den bereits vorhandenen 3D-Spektren eine Vielzahl nicht eindeutiger Zuordnungen geklärt bzw. zahlreiche neue Zuordnungen getroffen werden.

Im Bereich der CDRs konnten zwar keine eindeutigen Zuordnungen gemacht werden, es konnten jedoch Aminosäuretypen identifiziert werden, die bei Zugabe von Helix 1 einer starken Signaländerung unterliegen. Durch Klassifizierung nach Größe der Änderung und Übertragung auf die Sequenz konnte gezeigt werden, dass im Wesentlichen alle CDRs zur Bindung des Epitops beitragen.

5.5.4 Die Kombination mehrdimensionaler NMR-Spektren mit einfachen 2D-Spektren selektiv markierter Proben ermöglicht die Gewinnung von Strukturinformationen in sehr komplexen Systemen

Wie im vorangegangenen Abschnitt diskutiert, spielen Parameter wie Löslichkeit und effiziente Anreicherung der Isotope ^2H , ^{13}C und ^{15}N eine entscheidende Rolle für die Durchführbarkeit von NMR-Studien an großen, anspruchsvollen Proteinen und deren Komplexen. Es wurde aber auch gezeigt, dass mit sehr empfindlichen und einfachen zweidimensionalen Korrelationsspektren von aminosäuretypspezifisch markierten Proben viele zusätzliche Informationen gewonnen werden konnten. Im vorliegenden Fall wurden die selektiv ^{15}N -markierten Aminosäuren mit unmarkierten Aminosäuren zu einem reichen Medium kombiniert, auf dem die Bakterien angezogen wurden. Hieraus ergab sich die Einschränkung auf bestimmte Aminosäuren, die Endglieder der Aminosäurebiosynthese darstellen. Unter Verwendung von *in vitro*-Methoden zur Proteinexpression kann aber praktisch jede Aminosäure in jeder beliebigen Kombination im Protein angereichert werden. Zudem können außer ^{15}N -markierten auch ^{13}C -angereicherte Aminosäuren verwendet werden, wodurch sich NMR-seitig weitere Möglichkeiten eröffnen.

Wie bereits gezeigt, ermöglicht diese Art der Analyse auch Aussagen, selbst wenn keine eindeutige Zuordnung vorliegt. In jedem Fall gelingt aber eine Einschränkung der möglichen Lösungen. Im Grundsatz werden ähnliche Verfahren heute bei der Strukturberechnung verwendet, wo nicht eindeutig zugeordnete NOE-Signale mit mehreren möglichen Zuordnungspartnern als Strukturbeschränkungen zugelassen werden (Nilges *et al.*, 1997).

In diesem Zusammenhang ist auch die Anwendung paramagnetischer Sonden zu nennen, die erstmals von Pintacuda und Otting (2002) beschrieben wurde. In der vorliegenden Studie wurde das Gadolinium-Chelat OMNISCANTM (GE Healthcare, Braunschweig, D), welches als MRI-Kontrastmittel Verwendung findet, eingesetzt. OMNISCANTM ist gut löslich und bindet nicht an Proteine. Das paramagnetische Gadoliniumzentrum führt aber in Entfernungen

bis zu etwa 40 Å zu Signalverbreiterungen, ohne dabei die bei anderen Lanthaniden auftretenden Pseudokontaktverschiebungen zu verursachen. Als Resultat können die Signalintensitäten eines Proteins vor und nach Komplexbildung zueinander in Relation gesetzt werden. Insbesondere oberflächenexponierte Reste, die im Verlauf der Komplexbildung in der Bindungsoberfläche vergraben werden, zeigen hier starke Unterschiede.

In der Summe führt die Kombination der hier angeführten Methoden zu einer Erhöhung der eindeutigen Zuordnungen und ermöglicht die Identifizierung von nicht eindeutigen Zuordnungen, für die jedoch gleichzeitig die Anzahl möglicher, sinnvoller Sequenzpositionen stark eingeschränkt werden konnte. Wie hier gezeigt, können auch solche Zuordnungen für wichtige Aussagen über Interaktionsflächen herangezogen werden, die in weiterer Folge für Modellierungen verwendet werden können.

In diesem Zusammenhang sei auch auf den Einsatz von Rückrechnungsmethoden hingewiesen, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Konkret wurden die chemischen Verschiebungen von Homologiemodellen von scF_v W226 berechnet und über den Vergleich mit den experimentellen Spektren versucht, die Zuordnung zu verbessern. Hier wurde nur mit ¹⁵N-HSQC-Spektren gearbeitet, wodurch im Wesentlichen nur die ¹HN-Verschiebung zur Verfügung stand, weil der ¹⁵N-Kern mit den bestehenden Methoden nur unzureichend beschrieben werden kann (Wishart *et al.*, 1997; Xu & Case, 2001). Eine Erweiterung dieses Ansatzes um Cα und CO, welche bereits sehr gut berechnet werden können, die Einbindung von mehreren Homologiemodellen und ein automatisierter Vergleich mit ¹⁵N- und ¹³C-2D-Spektren erscheint ein sinnvoller weiterer Schritt zur Charakterisierung großer und schwieriger Proteinsysteme mittels NMR-spektroskopischer Methoden.

5.5.5 Das Homologiemodell von scF_v W226 erlaubt in Verbindung mit den NMR-Daten eine Charakterisierung des Paratops

Weil Antikörper sich im Wesentlichen nur in den variablen Schleifen unterscheiden, das strukturbildende Gerüst aber hoch konserviert ist, bietet sich die Homologiemodellierung als Methode für die Erzeugung eines Strukturmodells von scF_v W226 an. Da die interessierenden Bereiche, die CDRs, allerdings schwer zu modellierende Strukturelemente darstellen, ist es nahe liegend, mehrere verschiedene Homologiemodelle herzustellen, die eine entsprechende Streuung in den Konformationen der variablen Schleifen aufweisen und diese gegen die verfügbaren NMR-Daten zu evaluieren.

Für W226 wurde hierzu die Protein-Datenbank (PDB) nach scF_v-Kristallstrukturen durchsucht und die Sequenzen der entsprechenden Strukturen mittels dem im Internet verfügbaren Programm T-COFFEE (<http://www.ebi.ac.uk/t-coffee/>) paarweise mit der Sequenz von W226 abgeglichen. Es wurden zwei Strukturen, 2gjj (Zhu *et al.*, 2006) und 1ktr (Kap. 4.4.5), als Vorlagen für die Homologiemodellierung ausgewählt, wobei das Hauptaugenmerk auf Ähnlichkeiten im Bereich der variablen Schleifen gelegt wurde. Mittels des ebenfalls im Internet verfügbaren Programms SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) wurden die Homologiemodelle erstellt und in der Folge mit dem Programmpaket AMBER 9 (<http://amber.scripps.edu>) in einer Wasserbox relaxiert und minimiert (PD Dr. Stephan Schwarzinger, unveröffentlichte Ergebnisse).

Ein Vergleich der beiden Strukturen ergab, wie erwartet, eine sehr gute Übereinstimmung im Bereich des strukturbildenden Faltblattteils. Diese Bereiche sind in guter Übereinstimmung mit den Sekundärverschiebungen, die aus den NMR-Experimenten abgeleitet werden konnten. Im Bereich der variablen Schleifen zeigen sich mäßige bis deutliche Unterschiede in den Konformationen. Besonders stark betroffen ist die CDR 3 der schweren Kette, die in W226 länger als in den verwendeten Modellen ist. Für weitere Modellierungen und Analysen wurde das Modell auf Basis der Struktur des His₆-bindenden scF_v-Fragments 1ktr gewählt, welches eine flexiblere Schleifenkonformation mit größerer Interaktionsoberfläche in CDR-H3 hat.

Anhand des Homologiemodells lässt sich die Aussagekraft der Proben mit selektiv markierten Aminosäuren noch einmal deutlich hervorheben. Beispielsweise enthalten sowohl die CDR 1 in V_H, als auch die in V_L, ein GY-Motiv, während die anderen CDRs dieses Motiv nicht besitzen (Abb. 4.12, orange). Im entsprechenden Spektrum der AGY-selektiv markierten Probe finden sich tatsächlich Glycine und Tyrosine, die eine sehr starke Verschiebung bei Zugabe von Helix 1 zeigen und somit diesen beiden CDRs zugeordnet werden können. Betrachtet man die Verteilung der Arginin-Reste in den variablen Segmenten, findet man jeweils in CDR 2 und 3 von V_H und in CDR 2 von V_L ein Arginin in zentraler Position. Bei Zugabe von PrP-Helix 1-Peptid zu der entsprechenden Arginin-Probe von scF_v W226 erscheinen drei neue, intensive NMR-Signale (Abb. 4.15 c), die unter Berücksichtigung anderer, bereits zugeordneter Signale mit großer Wahrscheinlichkeit den drei Argininen in den oben genannten CDRs zugeordnet werden können. Somit scheinen bisher fünf von sechs CDRs an der Epitop-Bindung beteiligt zu sein. Für CDR 3 aus V_L konnten auch aus den selektiv ¹⁵N-markierten Proben keine eindeutigen Hinweise auf eine Beteiligung an der Bindung von PrP-Helix 1 gefunden werden.

In diesem Fall konnten aber Helix 1-induzierte Signalveränderungen in einem zugeordneten Bereich des Faltblattgerüsts Hinweise auf einen Beitrag zur Epitopbindung von CDR-L3 geben. Die Homologiemodelle lassen erkennen, dass CDR-L3 in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem Faltblattstrang aus V_L mit dem Sequenzmotiv $S_{238}GSGSGT$ liegt. Bei Zugabe von PrP-Helix 1-Peptid zum Antikörperfragment zeigt dieser Bereich die stärksten Veränderungen in der chemischen Verschiebung aller eindeutig zugeordneten Positionen. Diese Verschiebungsänderungen sind nur erklärbar, wenn sie im Bereich von CDR-L3 vorkommen, was wiederum auf eine Beteiligung an der Bindung des Epitops schließen lässt.

Eine Analyse der Änderungen der Signallagen im Bereich der eindeutig zugeordneten Signale bei Zugabe von PrP-Helix 1-Peptid zeigt, dass auch eine Reihe von Resten, beispielsweise an der Kontaktfläche von den beiden Domänen V_H und V_L betroffen sind. Diese Änderungen deuten auf eine Änderung der elektronischen Mikroumgebung auch in relativ großer Entfernung zur eigentlichen Bindungsoberfläche hin, was sich durch eine größere Konformationsänderung, zum Beispiel eine leichte Umorientierung der beiden variablen Domänen bei Bindung des Epitops erklären lässt.

5.5.6 Eine *Docking*-Simulation ergibt eine Kontaktfläche mit aromatischen und verborgenen, geladenen Resten

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse können für eine *Docking*-Simulation verwendet werden. Für diesen Zweck eignet sich das Programm HADDOCK besonders gut, weil es die Verwendung nicht eindeutiger experimenteller Einschränkungen zulässt. Auf Seite des Prion Proteins wurden dementsprechend die drei Reste Y145, R148 und E152 als eindeutige Bindungspartner, alle benachbarten Reste aus Helix 1, sowie aus Helix 3 als mögliche Bindungspartner in die Rechnung eingegeben. Wie das Homologie-Modell von W226 zeigt (Abb. 5.4), finden sich im Zentrum des Paratops eine Vielzahl von aromatischen Aminosäuren, die von geladenen und polaren Resten flankiert werden.

Wie der Titration mit dem PrP-Helix 1-Peptid zu entnehmen ist, kommt es in praktisch allen variablen Schleifen zu Änderungen der Dynamik und zu Signalverschiebungen. Des Weiteren zeigt auch die Verteilung der epitopinduzierten Signaländerung von zugeordneten Resten, dass es in den an die CDRs angrenzenden Bereichen um den scF_v herum zu Änderungen der chemischen Verschiebungen kommt. Demnach bilden offenbar alle CDRs das Paratop und es wurden alle oberflächenzugänglichen Reste in der durch die CDRs gebildeten Furche als mögliche Interaktionspartner mit dem Prion Protein in die Berechnung eingetragen.

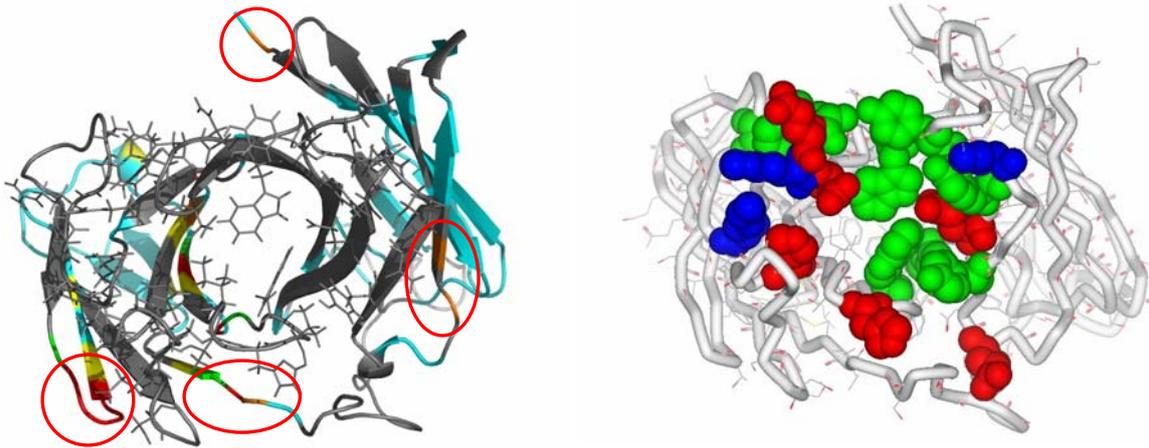


Abb. 5.4) Strukturmodelle des scF_v W226 (Draufsicht)

Während das linke Bild die Verteilung der starken, epitopinduzierten Effekte um den gesamten Bereich der CDRs herum verdeutlicht (rote Markierungen), ist rechts die Verteilung von aromatischen Resten (grün), sowie flankierender, polarer Positionen dargestellt. Die V_H befindet sich in beiden Abbildungen rechts.

In den vom Programm HADDOCK berechneten Komplex-Strukturen (Abb. 4.20) liegt die im Alanin-Scan als Epitop bestimmte Helix 1 des Prion Proteins in genau dieser Vertiefung. Das Modell zeigt, dass die Bindungsfurche gut Helix 1 aufnehmen kann und dass die Aminosäuren, die als strukturelles Epitop von Helix 1 identifiziert wurden, am tiefsten im Komplex verborgen sind.

Allerdings ist Helix 1 zu kurz, um die Furche in seiner vollen Länge zu füllen. Es ist daher keine direkte Wechselwirkung der Helix 1 mit allen CDRs zu erwarten. Da sich die beobachteten Effekte der Titration mit dem PrP-Helix 1-Peptid aber über einen deutlich größeren Raum erstreckten, war eine Interaktion mit weiteren Bereichen von PrP^C zu erwarten. Eine solche Beteiligung eines flankierenden Bereichs, der ebenfalls zur Bindung beiträgt, konnte den HADDOCK-Modellen entnommen werden (Abb. 4.20). Helix 1 liegt in der zellulären Konformation des Prion Proteins zwar sehr isoliert und bildet nur sehr wenige tertiäre Kontakte zum restlichen Protein aus, einige Reste des Proteins sind im Komplex aber so zum Paratop des Antikörpers orientiert, dass ein Beitrag zur Bindung möglich erscheint.

Ein potenzieller Bereich hierfür ist der Abschnitt um den *Turn* zwischen PrP-Helix 2 und 3, sowie die erste Windung der Helix 3. Dieser enthält viele polare Reste (Thr 199, Thr 201 & Asp 202) und liegt im HADDOCK-Modell in direkter Orientierung zur CDR 2 der schweren Kette.

Das aus der Simulation erhaltene Strukturmodell für die Kontaktfläche ist in sehr guter Übereinstimmung mit den experimentellen Daten. Es finden sich aber auch ähnliche Beispiele von Antikörper-Strukturen, die die Plausibilität des vorgestellten Strukturvorschlags erhöhen. Beispielsweise zeigt ein Komplex aus der Helix des Transkriptionsfaktors GCN4 mit dem korrespondierenden Antikörper die gleiche parallele Bindung der Helix in die aus den CDRs geformte Furche. Darüber hinaus finden sich auch in diesem Komplex eine größere Zahl an geladenen und polaren Resten in den CDRs. Obwohl die GCN4-Helix einen amphipatischen Charakter hat, findet man auch geladene Reste an der Interaktionsfläche, die nach der Komplexbildung in der Kontaktfläche verborgene Salzbrücken ausbilden. Weil es sich hierbei um die Kristallstruktur eines Komplexes mit einer Helix handelt, ist diese Struktur eine vielversprechende, neue Vorlage für weiterführende Homologiemodellierungen.

Eine weitere experimentell bestimmte Struktur mit einer Helix als Epitop ist der Komplex aus Lysozym und dem entsprechenden Antikörper. Abermals sind geladene und polare Reste an der Bindung beteiligt (Abb. 5.5). Weil es sich hier jedoch nicht um ein isoliertes Helixpeptid handelt, ist klar zu erkennen, dass auch andere Bereiche des Proteins Kontakte mit dem Antikörper ausbilden. Dies unterstützt das Resultat, dass auch im Fall des Prion Proteins andere Bereiche, wie im vorliegenden Modell Reste aus Helix 3, mit an den Antikörper binden. Die Struktur lässt ein weiteres Detail erkennen, nämlich die Beteiligung von Wassermolekülen an der Bindung. Insbesondere, wenn geladene und sehr polare Reste interagieren, können Wassermoleküle, beispielsweise als Akzeptoren oder Donoren von Wasserstoffbrücken fungieren und sogar einen stabilisierenden Beitrag zur Komplexbildung leisten. Diese Möglichkeit sollte auch bei weiteren *Docking*-Berechnungen mit berücksichtigt werden. HADDOCK bietet hierfür die Möglichkeit, die *Docking*-Simulation mit solvatisierten Bindungspartnern durchzuführen.

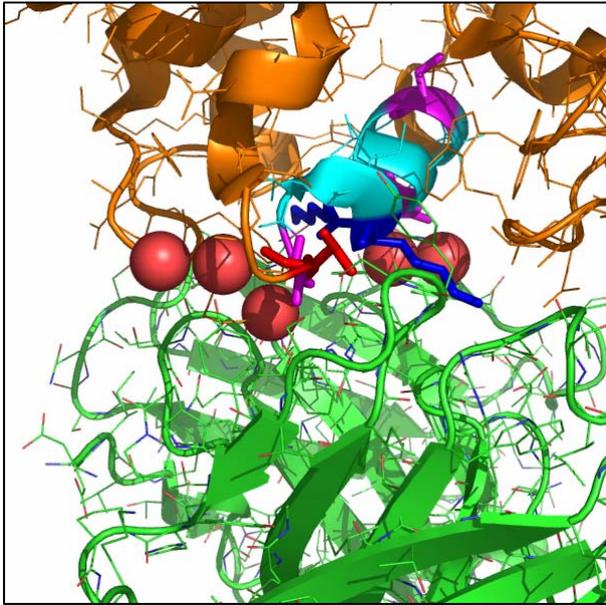


Abb. 5.5) scF_v im Komplex mit Helix aus Lysozym

Wie für scF_v W226 sind einige geladene Reste an der Interaktion beteiligt, wie auch viele polare Reste. Zusätzlich wurden Wassermoleküle im Interface gefunden.

violett = polar, blau = Arg, Lys, rot = Asp, Glu

Das hier auf der Grundlage von NMR- und fluoreszenzspektroskopischen Daten erstellte Modell für die Interaktion von W226 und dem Prion Protein hat große Ähnlichkeit mit anderen, experimentell bestimmten Antikörpern, die Helices binden. Die große Kontaktfläche mit den zahlreichen aromatischen, geladenen und polaren Resten ermöglicht so die hochaffine Bindung von PrP^C, wie sie für andere, im Rahmen dieser Arbeit untersuchte kleine Substanzen nicht beobachtet werden konnte. Wie aus der Literatur bekannt ist (Holliger & Hudson, 2005), eignen sich Antikörper und deren Fragmente im weitaus besseren Maße zur Komplexierung von globulären Molekülen mit unstrukturierter Oberfläche, wie es für PrP^C der Fall ist (Abb. 5.1), als für die Bindung an Enzyme mit aktiven Zentren oder andere Moleküle mit verborgenen Bindemotiven. Eine weiterführende Optimierung der Eigenschaften von W226, sowie die Bestimmung einer hoch aufgelösten Komplexstruktur als Vorlage für die gezielte Entwicklung organischer Wirkstoffmoleküle ist daher erstrebenswert.

5.5.7 Ausblick W226

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Kombination aus verschiedenen NMR-Methoden angewandt, die auch für komplexe Systeme eine bedingte Auswertung erlauben. Im Verlauf der Arbeiten zeigte sich, dass der Komplex aus scF_v W226 und PrP-Helix 1 auf Grund einer geänderten internen Dynamik im Bereich der CDRs besser für Aussagen über die Struktur der Binderegion geeignet ist. Basierend auf den hier vorgestellten Erkenntnissen und

Methoden ist es nun möglich, mit vergleichsweise geringem Aufwand eine zumindest teilweise Zuordnung für die CDRs im Komplex zu erhalten. Die auf diese Weise gewonnenen Daten erlauben eine weitere Verfeinerung der Homologiemodelle. Da Kristallisationsversuche mit scF_v W226 bisher keinen Erfolg zeigten, bleibt in diesem Fall die NMR-Spektroskopie weiterhin die am besten geeignete Methode zur Gewinnung von Strukturinformationen.

Die erhaltenen Erkenntnisse können auch zur Modellierung anderer Antikörper verwendet werden, die ebenfalls an Helix 1 aus dem Prion Protein binden. Hierzu gehören etwa 6H4 (Korth *et al.*, 1997) und D18 (Peretz *et al.*, 2001). Obwohl diese Antikörper das gleiche Epitop erkennen, unterscheiden sie sich teilweise erheblich in ihren variablen Segmenten. Vergleiche von Sequenz und Struktur in Verbindung mit den oben beschriebenen, experimentellen spektroskopischen Daten ermöglichen so die gezielte Variation der Sequenz ausgewählter CDRs mit dem Ziel, die Affinität und Selektivität des therapeutisch aktiven Antikörperfragments scF_v W226 weiter zu steigern.

6. Zusammenfassung

Prionerkrankungen gehören zur Klasse der neurodegenerativen Erkrankungen, in deren Verlauf sich das Prion Protein (PrP) von einer zellulären in eine pathogene Konformation umwandelt. Sie verlaufen letal und eine Therapie ist trotz intensiver Forschung bisher nicht verfügbar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Interaktionsflächen von zellulärem Prion Protein mit möglichen Wirkstoffen strukturell zu beschreiben. Die hierzu untersuchten Peptide und kleinen organischen Verbindungen, welche als antiprionwirksam beschrieben worden sind, interagierten aber nicht oder nur in einem Maß, welches eine detaillierte Strukturuntersuchung nicht ermöglicht hätte. Hingegen konnte gezeigt werden, dass der organische Wirkstoff 293G02, der an die Scrapie-Form des Prion Proteins bindet, auch mit der zellulären Form interagiert.

Für die physiologisch relevante und auch krankheitsassoziierte kupferbindende Oktarepeat-Region (4OR), war bekannt, dass diese kupferabhängig an PrP binden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein NMR-Schnelltest modifiziert, um die Versuchsbedingungen für NMR-Interaktionsstudien von PrP und 4OR zu optimieren. Trotz Verwendung eines gut löslichen Fusionspartners konnten NMR-Studien wegen mangelnder Löslichkeit im relevanten pH-Bereich nicht erfolgen. Es gelang aber, Bedingungen zu finden, unter denen Kristalle mit gebundenem Kupfer für die Röntgenstrukturanalyse präpariert werden konnten.

Schwerpunkt dieser Arbeit war die strukturelle Charakterisierung des therapeutisch aktiven Einzelstrangantikörpers W226. Dieser bindet an Helix 1 der zellulären Form des Prion Proteins mit nanomolarer Dissoziationskonstante und kann persistent scrapieinfizierte Zellkulturen heilen. Anhand von verschiedenen biophysikalischen Methoden, insbesondere Fluoreszenz- und NMR-Spektroskopie, wurden das Epitop und die entsprechende Bindungsstelle am Antikörper untersucht. Für das Epitop konnten die Positionen Y145, R148 und E152 mittels eines fluoreszenzbasierten Alanin-Scans als essenziell bestimmt werden. Diese bilden unter Einbezug benachbarter Positionen ein strukturelles Epitop, welches durch seine Dichte von geladenen und polaren Gruppen besticht. Die Daten implizieren eine, auf der Abschirmung von für die Umfaltung relevanten Positionen beruhende, antiprionale Wirkung.

Trotz der für die NMR-Spektroskopie anspruchsvollen Größe von 33 kDa konnten für den scF_v W226 alle relevanten mehrdimensionalen Spektren aufgenommen und so eine strukturelle Charakterisierung vorgenommen werden. Möglich wurde dies durch die Kombination verschiedener Markierungsmethoden, die eine Dreifachmarkierung und die

mehrfache aminosäurespezifische selektive Markierung einschloss. Ergänzend wurden Messungen zur Bestimmung oberflächenexponierter Positionen mittels einer löslichen, paramagnetischen Spinsonde durchgeführt. Alle Messungen wurden jeweils in Ab- und Anwesenheit des Epitops durchgeführt. Der scF_v W226 besitzt im Bereich der variablen Regionen einige für Antikörper relativ große Schleifen, die im freien Zustand zu internen Bewegungen auf der mittleren NMR-Zeitskala führen, welche in weiterer Folge eine eindeutige Zuordnung im epitopbindenden Bereich mit den heteronuklearen 3D-NMR-Spektren verhinderten. Dennoch konnten 144 von 311 Resten eindeutig zugeordnet werden. Diese liegen in zusammenhängenden, strukturbildenden Bereichen des Antikörperfragments rund um das Paratop und erlaubten die Verifizierung von Homologiemodellen für scF_v W226. Mittels deutlich empfindlicheren zweidimensionaler ¹⁵N-Korrelationsspektren des freien und epitopgebundenen Zustands in Kombination mit ausgewählten aminosäuretypselektiv ¹⁵N-markierten Proben, die mit Hinblick auf die Verteilung bestimmter Aminosäuretypen in den variablen Bereichen des Antikörperfragments erfolgte, konnte mittels mehrdeutiger Zuordnungen gezeigt werden, dass im Wesentlichen alle sechs variablen Schleifen zur Bindung des Epitops beitragen, wobei die variable Schleife 3 der leichten Kette nur einen untergeordneten Beitrag leistet. In Verbindung mit den gegen die NMR-Daten verifizierten Homologiemodellen und dem zuvor bestimmten strukturellen Epitop konnten diese Informationen in *Docking*-Simulationen verwendet und ein erstes Modell für den Komplex aus scF_v W226 und PrP^C erstellt werden. Helix 1 von PrP bindet dabei parallel in die Furche, die aus den variablen Schleifen gebildet wird. Somit wird eine große Kontaktfläche geschaffen, die Wechselwirkungen zwischen aromatischen und polaren Resten, sowie Salzbrücken zwischen Antikörper und Antigen aufweist. Derartige Bindungsmuster wurden auch in anderen, bereits strukturell charakterisierten Antikörpern gefunden, die helikale Segmente anderer Proteine binden. Das Modell unterstützt den hier vorgeschlagenen Mechanismus für die antiprionale Wirksamkeit, nämlich der Abschirmung von für die pathogene Konformationsumwandlung wichtigen Resten in PrP. Gleichzeitig bildet es die Grundlage für *Protein-Engineering* am Antikörper zur weiteren Verbesserung der Bindungskonstante von W226. Es ermöglicht auch Studien zum Design kleiner organischer Wirkstoffmoleküle, welche an Helix 1 aus PrP^C binden und dabei die Kontaktoberfläche der epitopbindenden Regionen aus scF_v W226 imitieren.

7. Summary

Prion diseases are a class of neurodegenerative diseases, which are caused by a lethal conformational change of the cellular form into the infectious isoform. There is no cure available at present.

This work aims to characterize the interaction surface of cellular prion protein (PrP^C) in complex with lead structures for anti prion compounds. Interaction studies with small molecule ligands and peptides yielded only weak binders or resulted in no binding at all.

For the physiological relevant and also disease related copper binding octarepeat region conditions could be obtained, allowing to gain crystals in a copper bound state for x-ray diffraction measurements.

This work was focused on the detailed characterization of the therapeutic active single chain antibody W226, which binds with nanomolar affinity to helix 1 of the prion protein and is able to cure persistent scrapie infected cell lines. The antibody and its epitope could be analysed by biophysical methods. By a fluorescence based alanine-scan, Y145, R148 and E152 were identified as essential amino acids for antibody binding. These residues form, along with adjacent positions, a structural highly charged, polar interface. The results imply an anti prion mechanism based upon shielding of positions essential for prion propagation.

Despite the large molecular weight of the antibody (33 kDa), all NMR-spectra relevant for the backbone assignment could be recorded. Thus, structural characterization of W226 was possible. This was obtained by a combination of triple isotopic labelling, selective ¹⁵N-labelling of amino acids and a spin label study, carried out in presence and absence of an epitope-representing peptide.

Due to internal dynamics on the micro to millisecond time scale for the complementarity determining regions (cdrs), no assignment could be achieved for this region. Nevertheless, 144 out of 311 residues could be assigned. The assigned positions are located in the cdr-stabilising scaffold of the antibody and allow to confirm the established homology-model for scF_v W226.

Using more sensitive 2D-HSQC-spectroscopy, combined with a selective labelling strategy adjusted to the fractional aa-distribution in the cdrs, it could be shown that all cdrs are involved in epitope binding, whereas cdr 3 of the light chain plays a minor role.

All data obtained allow a first model for the complex of PrP^C and scF_v W226. In this model PrP-helix 1 is deeply buried in the binding groove formed by the cdrs of the antibody. The complex is stabilized by interactions of aromatic and polar amino acids as well as by intermolecular salt bridges.

A similar binding pattern was also demonstrated for other helix-binding antibodies.

Our model also supports the hypothesized anti prion mechanism based upon shielding of positions essential for transformation of PrP^C to PrP^{Sc}.

Simultaneously the model represents an important prerequisite for engineering of high affinity antibodies. It also allows design of tailored anti prion compounds mimicking the contact surface of scF_v W226.

8. Abkürzungsverzeichnis

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
Å	Ångström (10^{-10} m)
Abb.	Abbildung
Ac	Acetyl-Schutzgruppe
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
CD	Circulardichroismus
CDR	<i>complementarity determining region</i>
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
Cm	Chloramphenicol
CSI	<i>chemical shift index</i>
CWD	<i>chronic wasting disease</i>
ddH ₂ O	vollständig deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSS	2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	effektive Konzentration eines Wirkstoffs für seine 50 %-ige Wirkung
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	N,N,N',N'-Ethyldiamintetraacetat-Dinatriumsalz
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ENDOR	<i>electron-nuclear double resonance</i>
EPR	<i>electron paramagnetic resonance</i>
F _{ab}	antigenbindendes Antikörperfragment
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
GdmCl	Guanidiniumhydrochlorid
Gl.	Gleichung
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
Grb2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
GSH	reduziertes Glutathion
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom
GSSG	oxidiertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	N-2-Hydroxypiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HSQC	<i>heteronuclear single-quantum correlated spectroscopy</i>
huPrP	humanes Prion Protein
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kap.	Kapitel
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LRP	Lamininrezeptor-Vorläuferprotein
Lsg.	Lösung
M9	M9-Minimalmedium

MW	Molekulargewicht
N-CAMs	<i>neural cell adhesion molecules</i>
NHS	<i>N-Hydroxysuccinimid</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> (magnetische Kernresonanz)
NOESY	<i>nuclear Overhauser enhancement spectroscopy</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
OR	Oktarepeat
PAC	<i>prion active compound</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Saline)
PC	Polycarbonat
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PDB	Protein-Datenbank
PEG	Polyethylenglykol
pI	isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
<i>Prnp</i>	PrP-Gen
PrP	Prion Protein
PrP 27-30	infektiöser Kern des PrP ^{Sc} , MW: 27 - 30 kDa
PrP*	Prion Protein, Übergangszustand
PrP ^C	Prion Protein, zelluläre Form
PrP ^{Sc}	Prion Protein, infektiöse Scrapie-Form
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
scF _v	<i>single-chain variable fragments</i>
ScN2a	scrapieinfizierte Neuroblastomzellen
SDS	Natriumdodecylsulfat
SG-TROSY	<i>sensitivity- and gradient-enhanced TROSY experiment</i>
SH2	Src-Homologie 2
SH3	Src-Homologie 3
shPrP	Prion Protein des Goldhamsters
SIFT	<i>scanning for intensely fluorescent targets</i>
SjGST	Glutathion-S-Transferase aus <i>Schistosoma japonicum</i>
STI1	<i>stress-inducible protein 1</i>
SV	Säulenvolumen
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> (Tris-gepufferte Saline)
TBSTE	Tris/NaCl/Tween-20/EDTA-Puffer
Tet	Tetracyclin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TROSY	<i>tranverse relaxation-optimized NMR spectroscopy</i>
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie
vCJD	neue Variante der CJD
V _H	variable Domäne der schweren Kette eines Immunglobulins
V _L	variable Domäne der leichten Kette eines Immunglobulins
v/v	Volumen / Volumen
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht / Volumen

9. Literaturverzeichnis

- Andujar-Sanchez, M., Smith, A. W., Clemente-Jimenez, J. M., Rodriguez-Vico, F., Las Heras-Vazquez, F. J., Jara-Perez, V., and Camara-Artigas, A. (2005): Crystallographic and thermodynamic analysis of the binding of S-octylglutathione to the Tyr 7 to Phe mutant of glutathione S-transferase from *Schistosoma japonicum*. *Biochemistry* **44**, 1174-1183.
- Bertsch, U., Winklhofer, K. F., Hirschberger, T., Bieschke, J., Weber, P., Hartl, F. U., Tavan, P., Tatzelt, J., Kretzschmar, H. A., and Giese, A. (2005): Systematic identification of anti-prion drugs by high-throughput screening based on scanning for intensely fluorescent targets. *J. Virol.* **79**, 7785-7791.
- Billeter, M., Riek, R., Wider, G., Hornemann, S., Glockshuber, R., and Wüthrich, K. (1997): Prion Protein NMR structure and species barrier for prion diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 7281-7285.
- Brown, D. R. (2001): Copper and prion disease. *Brain Res. Bull.* **55**, 165-173.
- Calzolari, L., Lysek, D. A., Güntert, P., von Schroetter, C., Riek, R., Zahn, R., and Wüthrich, K. (2000): NMR structures of three single-residue variants of the human prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 8340-8345.
- Calzolari, L. and Zahn, R. (2003): Influence of pH on NMR structure and stability of the human prion protein globular domain. *J. Biol. Chem.* **278**, 35592-35596.
- Calzolari, L., Lysek, D. A., Pérez, D. R., Güntert, P., and Wüthrich, K. (2005): Prion protein NMR structures of chickens, turtles, and frogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 651-655.
- Caughey, B., Raymond, L. D., Raymond, G. J., Maxson, L., Silveira, J., and Baron, G. S. (2003): Inhibition of protease-resistant prion protein accumulation *in vitro* by curcumin. *J. Virol.* **77**, 5499-5502.
- Cereghetti, G. M., Schweiger, A., Glockshuber, R., and Van Doorslaer, S. (2001): Electron Paramagnetic Resonance Evidence for Binding of Cu²⁺ to the C-terminal Domain of the Murine Prion Protein. *Biophys. J.* **81**, 516-525.
- Constantine, K. L., Goldfarb, V., Wittekind, M., Anthony, J., Ng, S.-C., and Mueller, L. (1992): Sequential ¹H and ¹⁵N NMR Assignments and Secondary Structure of a Recombinant Anti-Digoxin Antibody V_L Domain. *Biochemistry* **31**, 5033-5043.
- del Pino, P., Weiss, A., Bertsch, U., Renner, C., Mentler, M., Grantner, K., Fiorino, F., Meyer-Klaucke, W., Moroder, L., Kretzschmar, H. A., and Parak, F. G. (2007): The configuration of the Cu²⁺ binding region in full-length human prion protein. *Eur Biophys J.* **36**, 239-252.
- DeMarco, M. L. and Daggett V. (2004): From conversion to aggregation: protofibril formation of the prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 2293-2298.

- de Vries, S. J., van Dijk, A. D. J., Krzeminski, M., van Dijk, M., Thureau, A., Hsu, V., Wassenaar, T., and Bonvin, A.M.J.J. (2007): HADDOCK versus HADDOCK: New features and performance of HADDOCK2.0 on the CAPRI targets. *Proteins: Struc. Funct. & Bioinformatic* **69**, 726-733.
- Doh-Ura, K., Iwaki, T., and Caughey, B. (2000): Lysosomotropic Agents and Cysteine Protease Inhibitors Inhibit Scrapie-Associated Prion Protein Accumulation. *J. Virol.* **74**, 4894-4897.
- Doh-Ura, K., Ishikawa, K., Murakami-Kubo, I., Sasaki, K., Mohri, S., Race, R., and Iwaki, T. (2004): Treatment of Transmissible Spongiform Encephalopathy by Intraventricular Drug Infusion in Animal Models. *J. Virol.* **78**, 4999-5006.
- Dominguez, C., Boelens, R., and Bonvin, A. M. J. J. (2003): HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical and/or biophysical information. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 1731-1737.
- Donne, D. G., Viles, J. H., Groth, D., Mehlhorn, I., James, T. L., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., Wright, P. E., and Dyson, H. J. (1997): Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): The N-terminus is highly flexible. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 13452-13457.
- Donofrio, G., Heppner, F. L., Polymenidou, M., Musahl, C., and Aguzzi, A. (2005): Paracrine inhibition of prion propagation by anti-PrP single-chain Fv miniantibodies. *J. Virol.* **79**, 8330-8338.
- Eghiaian, F., Grosclaude, J., Lesceu, S., Debey, P., Doublet, B., Treguer, E., Rezaei, H., and Knossow, M. (2004): Insight into the PrP^C --> PrP^{Sc} conversion from the structures of antibody-bound ovine prion scrapie-susceptibility variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 10254-10259.
- Eisenmann, A., Neudecker, P., Rösch, P., and Schwarzinger, S. (2004): Treatment of Peak Intensity Uncertainties in NMR Relaxation Data Analysis can Lead to Severe Artifacts. *Monatshefte für Chemie* **135**, 1089-1099.
- Goldfarb, L. G., Brown, P., McCombie, W. R., Goldgaber, D., Swergold, G. D., Wills, P. R., Cervenakova, L., Baron, H., Gibbs, C. J. Jr., and Gajdusek, D. C. (1991): Transmissible familial Creutzfeldt-Jakob disease associated with five, seven, and eight extra octapeptide coding repeats in the *PRNP* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 10926-10930.
- Goodrich, J. A. and Kugel, J. F. (2006): *Binding and Kinetics for Molecular Biologists*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Cold Spring Harbor.
- Gossert, A. D., Bonjour, S., Lysek, D. A., Fiorito, F., and Wüthrich, K. (2005): Prion protein NMR structures of elk and of mouse/elk hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 646-650.
- Govaerts, C., Wille, H., Prusiner, S. B., and Cohen, F. E. (2004): Evidence for assembly of prions with left-handed β -helices into trimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 8342-8347.

- Graner, E., Mercadante, A. F., Zanata, S. M., Forlenza, O. V., Cabral, A. L. B., Veiga, S. S., Juliano, M. A., Roesler, R., Walz, R., Minetti, A., Izquierdo, I., Martins, V. R., and Brentani, R. R. (2000): Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Mol. Brain Res.* **76**, 85-92.
- Grzesiek, S., Döbeli, H., Gentz, R., Garotta, G., Labhardt, A. M., and Bax, A. (1992): ¹H, ¹³C, and ¹⁵N NMR backbone assignments and secondary structure of human interferon-gamma. *Biochemistry* **31**, 8180-8190.
- Haire, L. F., Whyte, S. M., Vasisht, N., Gill, A. C., Verma, C., Dodson, E. J., Dodson, G. G., and Bayley, P. M. (2004): The Crystal Structure of the Globular Domain of Sheep Prion Protein. *J. Mol. Biol.* **336**, 1175-1183.
- Hajj, G. N., Lopes, M. H., Mercadante, A. F., Veiga, S. S., da Silveira, R. B., Santos, T. G., Ribeiro, K. C., Juliano, M. A., Jacchieri, S. G., Zanata, S. M., and Martins, V. R. (2007): Cellular prion protein interaction with vitronectin supports axonal growth and is compensated by integrins. *J. Cell. Sci.* **120**, 1915-1926.
- Hansen, P. E. (2000): Isotope effects on chemical shifts of proteins and peptides. *Magn. Reson. Chem.* **38**, 1-10.
- Heppner, F. L., Musahl, C., Arrighi, I., Klein, M. A., Rüllicke, T., Oesch, B., Zinkernagel, R. M., Kalinke, U., and Aguzzi, A. (2001): Prevention of scrapie pathogenesis by transgenic expression of anti-prion protein antibodies. *Science* **294**, 178-182.
- Holliger, P. and Hudson, P. J. (2005): Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotechnology* **23**, 1126-1135.
- Honegger, A. and Plückthun, A. (2001): Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool. *J. Mol. Biol.* **309**, 657-670.
- Jackson, G. S., Murray, I., Hosszu, L. L., Gibbs, N., Waltho, J. P., Clarke, A. R., and Collinge, J. (2001): Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 8531-8535.
- Johnson, B. A. and Blevins, R. A. (1994): NMRView: A computer program for the visualization and analysis of NMR data. *J. Biomol. NMR* **4**, 603-614.
- Kaneko, K., Zulianello, L., Scott, M., Cooper, C. M., Wallace, A. C., James, T. L., Cohen, F. E., and Prusiner S. B. (1997): Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 10069-10074.
- Kaufmann, M., Lindner, P., Honegger, A., Blank, K., Tschopp, M., Capitani, G., Plückthun, A., and Grütter, M. G. (2002): Crystal structure of the anti-His tag antibody 3D5 single-chain fragment complexed to its antigen. *J. Mol. Biol.* **318**, 135-147.
- Klingenstein, R., Löber, S., Kujala, P., Godsave, S., Leliveld, S. R., Gmeiner, P., Peters, P. J., and Korth, C. (2006): Tricyclic antidepressants, quinacrine and a novel, synthetic chimera thereof clear prions by destabilizing detergent-resistant membrane compartments. *J. Neurochem.* **98**, 748-759. Erratum in: *J. Neurochem.* **98**, 1696.

- Korth, C., Stierli, B., Streit, P., Moser, M., Schaller, O., Fischer, R., Schulz-Schaeffer, W., Kretzschmar, H., Raeber, A., Braun, U., Ehrensperger, F., Hornemann, S., Glockshuber, R., Riek, R., Billeter, M., Wüthrich, K., and Oesch, B. (1997): Prion (PrP^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature*. **390**, 74-77.
- Korth, C., May, B. C., Cohen, F. E., and Prusiner, S. B. (2001): Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 9836-9841.
- Kuwata, K., Li, H., Yamada, H., Legname, G., Prusiner, S. B., Akasaka, K., James, T. L. (2002): Locally Disordered Conformer of the Hamster Prion Protein: A Crucial Intermediate to PrP^{Sc}? *Biochemistry* **41**, 12277-12283.
- Legname, G., Baskakov, I. V., Nguyen, H.-O. B., Riesner, D., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., Prusiner, S. J. (2004): Synthetic Mammalian Prions. *Science* **305**, 673-676.
- Leliveld, S. R., Dame, R. T., Wuite, G. J., Stitz, L., and Korth, C. (2006): The expanded octarepeat domain selectively binds prions and disrupts homomeric prion protein interactions. *J. Biol. Chem.* **281**, 3268-3275.
- Leucht, C., Simoneau, S., Rey, C., Vana, K., Rieger, R., Lasmézas, C. I., and Weiss, S. (2003): The 37 kDa/67 kDa laminin receptor is required for PrP(Sc) propagation in scrapie-infected neuronal cells. *EMBO Rep.* **4**, 290-295.
- Levites, Y., Smithson, L. A., Price, R. W., Dakin, R. S., Yuan, B., Sierks, M. R., Kim, J., McGowan, E., Reed, D. K., Rosenberry, T. L., Das, P., and Golde, T. E. (2006): Insights into the mechanisms of action of anti-Aβ antibodies in Alzheimer's disease mouse models. *FASEB J.* **20**, 2576-2578.
- Lim, K., Ho, J. X., Keeling, K., Gilliland, G. L., Ji, X., Ruker, F., and Carter, D. C. (1994): Three-dimensional structure of *Schistosoma japonicum* glutathione S-transferase fused with a six-amino acid conserved neutralizing epitope of gp41 from HIV. *Protein Sci.* **3**, 2233-2244.
- López Garcia, F., Zahn, R., Riek, R., and Wüthrich, K. (2000): NMR structure of the bovine prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 8334-8339.
- Love, R. (2001): Old drugs to treat new variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* **358**, 563.
- Ludwiczek, M. L., Baminger, B., and Konrat, R. (2004): NMR probing of protein-protein interactions using reporter ligands and affinity tags. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 1636-1637.
- Lühns, T., Riek, R., Güntert, P., and Wüthrich, K. (2003): NMR structure of the human doppel protein. *J. Mol. Biol.* **326**, 1549-1557.
- Lühns, T., Zahn, R., and Wüthrich, K. (2006): Amyloid formation by recombinant full-length prion proteins in phospholipid bicelle solutions. *J. Mol. Biol.* **357**, 833-841.
- Luginbühl, B., Kanyo, Z., Jones, R. M., Fletterick, R. J., Prusiner, S. B., Cohen, F. E., Williamson, R. A., Burton, D. R., and Plückthun, A. (2006): Directed evolution of an anti-prion protein scFv fragment to an affinity of 1 pM and its structural interpretation. *J. Mol. Biol.* **363**, 75-97.

- Lysek, D. A. and Wüthrich, K. (2004): Prion Protein Interaction with the C-Terminal SH3 Domain of Grb2 Studied Using NMR and Optical Spectroscopy. *Biochemistry* **43**, 10393-10399.
- Lysek, D. A., Schorn, C., Nivon, L. G., Esteve-Moya, V., Christen, B., Calzolari, L., von Schroetter, C., Fiorito, F., Herrmann, T., Güntert, P., and Wüthrich, K. (2005): Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 640-645.
- Makrides, S. C. (1996): Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **60**, 512-538.
- Manavalan, P. and Johnson, W. C. Jr. (1987): Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Anal. Biochem.* **167**, 76-85.
- Mangels, C. (2004): NMR-spektroskopische Bindungsstudien an humanem Prion-Protein. *Diplomarbeit, Universität Bayreuth*.
- Marley, J., Lu, M., and Bracken, C. (2001): A method for efficient isotopic labeling of recombinant proteins. *J. Biomol. NMR* **20**, 71-75.
- Martins, V. R., Mercadante, A. F., Cabral, A. L. B., Freitas, A. R. O., and Castro, R. M. R. P. S. (2001): Insights into the physiological function of cellular prion protein. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **34**, 585-595.
- Martins, V. R., Linden, R., Prado, M. A. M., Walz, R., Sakamoto, A. C., Izquierdo, I., and Brentani, R. R. (2002): Cellular prion protein: on the road for functions. *FEBS Lett.* **512**, 25-28.
- May, B. C. H., Fafarman, A. T., Hong, S. B., Rogers, M., Deady, L. W., Prusiner, S. B., and Cohen, F. E. (2003): Potent inhibition of scrapie prion replication in cultured cells by bis-acridines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 3416-3421.
- McTigue, M. A., Bernstein, S. L., Williams, D. R., and Tainer, J. A. (1995): Purification and crystallization of a schistosomal glutathione S-transferase. *Proteins* **22**, 55-57.
- Meyer, O. and Schlegel, H. G. (1983): Biology of aerobic carbon monoxide-oxidizing bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **37**, 277-310.
- Meyer-Lühmann, M., Coomaraswamy, J., Bolmont, T., Kaeser, S., Schaefer, C., Kilger, E., Neuenschwander, A., Abramowski, D., Frey, P., Jaton, A. L., Vigouret, J. M., Paganetti, P., Walsh, D. M., Mathews, P. M., Ghiso, J., Staufenbiel, M., Walker, L. C., and Jucker, M. (2006): Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science* **313**, 1781-1784.
- Muhandiram, D. R. and Kay, L. E. (1994): Gradient-Enhanced Triple-Resonance Three-Dimensional NMR Experiments with Improved Sensitivity. *Journal of Magnetic Resonance* **103**, 203-216.
- Muñoz, V. and Serrano, L. (1994): Elucidating the folding problem of helical peptides using empirical parameters. *Nat. Struct. Biol.* **1**, 399-409.

- Muñoz, V. and Serrano, L. (1995a): Elucidating the folding problem of helical peptides using empirical parameters. II. Helix macrodipole effects and rational modification of the helical content of natural peptides. *J. Mol. Biol.* **245**, 275-296.
- Muñoz, V. and Serrano, L. (1995b): Elucidating the folding problem of helical peptides using empirical parameters. III. Temperature and pH dependence. *J. Mol. Biol.* **245**, 297-308.
- Nguyen, J. T., Inouye, H., Baldwin, M. A., Fletterick, R. J., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., and Kirschner, D. A. (1995): X-ray diffraction of scrapie prion rods and PrP peptides. *J. Mol. Biol.* **252**, 412-422.
- Nilges, M., Macias, M. J., O'Donoghue, S. I., and Oschkinat, H. (1997): Automated NOESY interpretation with ambiguous distance restraints: the refined NMR solution structure of the pleckstrin homology domain from beta-spectrin. *J. Mol. Biol.* **269**, 408-422.
- Norstrom, E. M. and Mastrianni, J. A. (2006): The charge structure of helix 1 in the prion protein regulates conversion to pathogenic PrP^{Sc}. *J. Virol.* **80**, 8521-8529.
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. (1995): How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* **4**, 2411-2423.
- Peretz, D., Williamson, R. A., Matsunaga, Y., Serban, H., Pinilla, C., Bastidas, R. B., Rozenshteyn, R., James, T. L., Houghten, R. A., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., and Burton, D. R. (1997): A Conformational Transition at the N Terminus of the Prion Protein Features in Formation of the Scrapie Isoform. *J. Mol. Biol.* **273**, 614-622.
- Peretz, D., Williamson, R. A., Kaneko, K., Vergara, J., Leclerc, E., Schmitt-Ulms, G., Mehlhorn, I. R., Legname, G., Wormald, M. R., Rudd, P. M., Dwek, R. A., Burton, D. R., and Prusiner, S. B. (2001): Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature* **412**, 739-743.
- Pervushin, K., Riek, R., Wider, G., and Wüthrich, K. (1997): Attenuated T2 relaxation by mutual cancellation of dipole-dipole coupling and chemical shift anisotropy indicates an avenue to NMR structures of very large biological macromolecules in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 12366-12371.
- Pintacuda, G. and Otting, G. (2002): Identification of protein surfaces by NMR measurements with a paramagnetic Gd(III) chelate. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 372-373.
- Prusiner, S. B. (1996): Molecular biology and pathogenesis of prion diseases. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 482-487.
- Prusiner, S. B. (1998): Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 13363-13383.
- Qin, K., Coomaraswamy, J., Mastrangelo, P., Yang, Y., Lugowski, S., Petromilli, C., Prusiner, S. B., Fraser, P. E., Goldberg, J. M., Chakrabartty, A., and Westaway, D. (2003): The PrP-like protein Doppel binds copper. *J. Biol. Chem.* **278**, 8888-8896.
- Richardson, J. S. and Richardson, D. C. (2002): Natural β -sheet proteins use negative design to avoid edge-to-edge aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 2754-2759.

- Rieger, R., Edenhofer, F., Lasmezas, C. I., and Weiss S. (1997): The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *Nat. Med.* **3**, 1383-1388.
- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Glockshuber, R., and Wüthrich, K. (1997): NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein. *FEBS Lett.* **413**, 282-288.
- Salman, M. D. (2003): Chronic Wasting Disease in Deer and Elk: Scientific Facts and Findings. *J. Vet. Med. Sci.* **65**, 761-768.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989): Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Cold Spring Harbor.
- Santuccion, A., Sytnyk, V., Leshchyn'ska, I., and Schachner, M. (2005): Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth. *J. Cell. Biol.* **169**, 341-354.
- Schmid, F. X. (1989): Protein Structure: A Practical Approach. JRL Press, Oxford.
- Schmitt-Ulms, G., Legname, G., Baldwin, M. A., Ball, H. L., Bradon, N., Bosque, P. J., Crossin, K. L., Edelman, G. M., DeArmond, S. J., Cohen, F. E., and Prusiner, S. B. (2001): Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. *J. Mol. Biol.* **314**, 1209-1225.
- Schwarzinger, S., Kroon, G. J., Foss, T. R., Chung, J., Wright, P. E., and Dyson, H. J. (2001): Sequence-dependent correction of random coil NMR chemical shifts. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 2970-2978.
- Schweimer, K. (2000). Mehrdimensionale heteronukleare NMR Spektroskopie zur Bestimmung der Strukturen des Birkenpollenallergens Bet v 1, des Guillardia theta Rubredoxins und des [2Fe-2S] Ferredoxins aus Halobacterium salinarum. *Dissertation, Universität Bayreuth.*
- Shaked, G. M., Engelstein, R., Avraham, I., Kahana, E., and Gabizon, R. (2003): Dimethyl sulfoxide delays PrP accumulation and disease symptoms in prion-infected hamsters. *Brain Res.* **983**, 137-143.
- Sigurdson, C. J. and Aguzzi, A. (2007): Chronic wasting disease. *Biochim. Biophys. Acta.* **1772**, 610-618.
- Silveira, J. R., Raymond, G. J., Hughson, A. G., Race, R. E., Sim, V. L., Hayes, S. F., and Caughey, B. (2005): The most infectious prion protein particles. *Nature* **437**, 257-261.
- Simons, K. and Ikonen, E. (1997): Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572.
- Sklenar, V., Piotto, M., Leppik, R., and Saudek, V. (1993): Gradient-Tailored Water Suppression for 1H-15N HSQC Experiments Optimized to Retain Full Sensitivity. *J. Magn. Reson.* **102**, 241-245.

- Slupsky, C. M., Boyko, R. F., Booth, V. K., and Sykes, B. D. (2003): Smartnotebook: a semi-automated approach to protein sequential NMR resonance assignments. *J Biomol NMR*. **27**, 313-321.
- Soto, C. and Castilla J. (2004): The controversial protein-only hypothesis of prion propagation. *Nat. Med.* **10**, 63-67.
- Spielhauer, C. and Schätzl, H. M. (2001): PrP^C directly interacts with proteins involved in signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **276**, 44604-44612.
- Sreerama, N. and Woody, R. W. (2000): Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.* **287**, 252-260.
- Stefani, M. and Dobson, C. M. (2003): Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J. Mol. Med.* **81**, 678-699.
- Suzuki, T., Kurokawa, T., Hashimoto, H., and Sugiyama, M. (2002): cDNA sequence and tissue expression of Fugu rubripes prion protein-like: a candidate for the teleost orthologue of tetrapod PrPs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **294**, 912-917.
- Tatzelt, J., Prusiner, S. B., and Welch, W. J. (1996): Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein. *EMBO J.* **15**, 6363-6373.
- Telling, G. C., Scott, M., Hsiao, K. K., Foster, D., Yang, S.-L., Torchia, M., Sidle, K. C. L., Collinge, J., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. (1994): Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from humans to transgenic mice expressing chimeric human-mouse prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 9936-9940.
- Telling, G. C., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. (1995): Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* **83**, 79-90.
- Thompsett, A. R., Abdelraheim, S. R., Daniels, M., and Brown, D. R. (2005): High affinity binding between copper and full-length prion protein identified by two different techniques. *J. Biol. Chem.* **280**, 42750-42758.
- Tsenkova, R. N., Iordanova, I. K., Toyoda, K., and Brown, D. R. (2004): Prion protein fate governed by metal binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **325**, 1005-1012.
- van de Ven, F. J. M. (1995): *Multidimensional NMR in Liquids - Basic Principles and Experimental Methods*, Wiley-VCH, New York.
- Vogtherr, M., Grimme, S., Elshorst, B., Jacobs, D. M., Fiebig, K., Griesinger, C., and Zahn, R. (2003): Antimalarial drug quinacrine binds to C-terminal helix of cellular prion protein. *Med. Chem.* **46**, 3563-3564.
- Watzlawik, J., Skora, L., Frense, D., Griesinger, C., Zweckstetter, M., Schulz-Schaeffer, W. J., and Kramer, M. L. (2006): Prion protein helix1 promotes aggregation but is not converted into beta-sheet. *J. Biol. Chem.* **281**, 30242-30250.

- Weissmann, C. (2004): The state of the prion. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 861-871.
- Whitmore, L. and Wallace, B. A. (2004): DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res.* **32**, (Web Server issue): W668-673.
- Will, R. G., Ironside, J. W., Zeidler, M., Cousens, S. N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A., and Smith, P. G. (1996): A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* **347**, 921-925.
- Wille, H., Michelitsch, M. D., Guenebaut, V., Supattapone, S., Serban, A., Cohen, F. E., Agard, D. A., and Prusiner, S. B. (2002): Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 3563-3568.
- Wishart, D. S., Sykes, B. D., and Richards, F. M. (1991): Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure. *J. Mol. Biol.* **222**, 311-333.
- Wishart, D. S., Watson, M. S., Boyko, R. F., and Sykes, B. D. (1997): Automated ¹H and ¹³C Chemical Shift Prediction Using the BioMagResBank. *J. Biomol. NMR* **10**, 329-336.
- Wittekind, M. and Müller, L. (1993): HNCACB, a High-Sensitivity 3D NMR Experiment to Correlate Amide-Proton and Nitrogen Resonances with the Alpha- and Beta-Carbon Resonances in Proteins. *J. Magn. Reson.* **101**, 201-205.
- Wopfner, F., Weidenhöfer, G., Schneider, R., von Brunn, A., Gilch, S., Schwarz, T. F., Werner, T., and Schätzl, H. M. (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.
- Xu X. P. and Case D. A. (2001): Automated prediction of ¹⁵N, ¹³C_{alpha}, ¹³C_{beta} and ¹³C' chemical shifts in proteins using a density functional database. *J. Biomol. NMR* **21**, 321-333.
- Yin, S.-M., Sy, M.-S., Yang, H.-Y., and Tien, P. (2004): Interaction of Doppel with the full-length laminin receptor precursor protein. *Arch. Biochem. Biophys.* **428**, 165-169.
- Zahn, R., Liu, A., Lührs, T., Riek, R., von Schroetter, C., López Garcia, F., Billeter, M., Calzolari, L., Wider, G., and Wüthrich, K. (2000): NMR solution structure of the human prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 145-150.
- Zahn, R. (2003): The octapeptide repeats in mammalian prion protein constitute a pH-dependent folding and aggregation site. *J. Mol. Biol.* **334**, 477-488.
- Zanata, S. M., Lopes, M. H., Mercadante, A. F., Hajj, G. N. M., Chiarini, L. B., Nomizo, R., Freitas, A. R. O., Cabral, A. L. B., Lee, K. S., Juliano, M. A., de Oliveira, E., Jachieri, S. G., Burlingame, A., Huang, L., Linden, R., Brentani, R. R., and Martins, V. R. (2002): Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *EMBO J.* **21**, 3307-3316.

Zhu, Z., Hu, S., Li, L., Chang, L., Chen, L., Liu, J., and Teng, M. (2006): Epitope mapping and structural analysis of an anti-ErbB2 antibody A21: Molecular basis for tumor inhibitory mechanism. To be Published

Ziegler, J., Sticht, H., Marx, U. C., Müller, W., Rösch, P., and Schwarzinger, S. (2003): CD and NMR studies of prion protein (PrP) helix 1. *J. Biol. Chem.* **278**, 50175-50181.

Ziegler, J. and Schwarzinger, S. (2006): Genetic algorithms as a tool for helix design - computational and experimental studies on prion protein helix 1. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **20**, 47-54.

Ziegler, J. (2007): Untersuchungen zur Konformationsumwandlung des Prionproteins und seine Interaktion mit dem Lamininrezeptor. *Dissertation, Universität Bayreuth.*

10. Anhang

10.1 Plasmide

His₆-huPrP(23-230) wt in pRSET-A

atgaaatacctgctgccgaccgctgctgctggtctgctgctcctcgctgccagccggcg
M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A

atggccatggcggaggctccagctgcagcagctctggagctgagctggcggaggcctgggact
M A M A E V Q L Q Q S G A E L A R P G T

tcagtgaacctgtcttgtaagacttctggctacagcttcacaggctatggtgtaagttgg
S V N L S C K T S G Y S F T G Y G V S W

gtgaagcagcgaattggacagggccttgagtggattggagagatttatcctagaagtgg
V K Q R I G Q G L E W I G E I Y P R S G

aatacttactacaatgagaagttcaagggcaaggccacactgactgcagacaaatcctcc
N T Y Y N E K F K G K A T L T A D K S S

aacacggcgtacatggagctccgcagcctgacatctgaggactctgcggtctatcttctgt
N T A Y M E L R S L T S E D S A V Y F C

gcaagatggaactgggaaagggatgcaatggactactggggcaaggaacctcagtcacc
A R W N W E R D A M D Y W G Q G T S V T

gtctcctcagccaaaacgacacccccatctgactatccactagccggcggaggcggttca
V S S A K T T P P S D Y P L A G G G G S

ggcggagggtggctctggcgggtggcggatccgacattgtgatgacccaaactccactctcc
G G G G S G G G G S D I V M T Q T P L S

ctgcctgtcagctcttgagatcaagcctccatctcttgaggcttagtcagagccttgaa
L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S L E

agcagtagtggatatccccatttgaactggctacctccagaaaccaggccagctctccacaa
S S S G Y P H L N W Y L Q K P G Q S P Q

ctcctgatctacagggtttccaaccgattttctggggctcctagacaggttcagtggtagt
L L I Y R V S N R F S G V L D R F S G S

ggatcagggacagatcttcacactgcaaatcagcagagtgaggctgaggatttgggagtt
G S G T D F T L Q I S R V E A E D L G V

tatttctgcctccaaattacacatgtcccgtggacgcttcgggtggaggccaccaagctggaa
Y F C L Q I T H V P W T F G G G T K L E

atcaaacgggctgatgctgcaccaactgtatccgcgggccgaagaacagaaactgatcagc
I K R A D A A P T V S A A E E Q K L I S

gaagaagatctcgagcaccaccaccaccactga
E E D L E H H H H H H -

huPrP(23-231) wt *tagless* in pET-17b

atgtctaagaagcgccccgaagcctggaggatggaacactgggggcagccgatacccgggg
M S K K R P K P G G W N T G G S R Y P G
cagggcagccctggaggcaaccgctaccacctcagggcggtggtggctgggggcagcct
Q G S P G G N R Y P P Q G G G G W G Q P
catggtggtggctgggggcagcctcatggtggtggctgggggcagcccatggtggtggc
H G G G W G Q P H G G G W G Q P H G G G
tggggacagcctcatggtggtggctgggggtcaaggaggtggcaccacagtcagtggaac
W G Q P H G G G W G Q G G G T H S Q W N
aagccgagtaagccaaaaaccaacatgaagcacatggctggtgctgcagcagctggggca
K P S K P K T N M K H M A G A A A A G A
gtggtggggggccttggcggctacatgctgggaagtgccatgagcaggcccatcatacat
V V G G L G G Y M L G S A M S R P I I H
ttcggcagtgactatgaggaccggttactatcgtgaaaacatgcaccggtaccccaaccaa
F G S D Y E D R Y Y R E N M H R Y P N Q
gtgtactacaggcccatggatgagtacagcaaccagaacaactttgtgcacgactgcgctc
V Y Y R P M D E Y S N Q N N F V H D C V
aatatcacaatcaagcagcacacgggtcaccacaaccaccaagggggagaacttcaccgag
N I T I K Q H T V T T T T K G E N F T E
accgacgtaagatgatggagcgcggtgggttgagcagatgtgtatcaccagtagcagagg
T D V K M M E R V V E Q M C I T Q Y E R
gaatctcaggcctattaccagagaggatcgagctag
E S Q A Y Y Q R G S S -

shPrP(23-231) wt in pET-15b

atgagcagcagccatcatcatcatcatcacagcagcggcctggaagttctggtccagggg
M S S S H H H H H S S G L E V L F Q G
ccccaaaagcggccaaagcctggaggggtggaacactggcggaagccgataccctgggcag
P K K R P K P G G W N T G G S R Y P G Q
ggcagccctggaggcaaccgctaccacctcaggggtggcggcacatgggggcaaccctat
G S P G G N R Y P P Q G G G T W G Q P H
ggtggtggctggggacagcccatggtggtggctggggacagcccatggtggtggctgg
G G G W G Q P H G G G W G Q P H G G G W
ggtcagcccatggtggtggctgggggtcaaggaggtggcaccacaatcagtggaacaag
G Q P H G G G W G Q G G G T H N Q W N K
cccagtaagccaaaaaccaacatgaagcacatggccggcgctgctgcggcaggggcccgtg
P S K P K T N M K H M A G A A A A G A V
gtggggggccttgggtggctacatgctggggagtgccatgagcaggcccatgatgcatttt
V G G L G G Y M L G S A M S R P M M H F

ggcaatgactgggaggaccgctactaccgtgaaaacatgaaccgctaccctaaccaagtg
G N D W E D R Y Y R E N M N R Y P N Q V
tattaccggccagtgaccaggtacaacaaccagaacaactttgtgcacgattgtgtcaac
Y Y R P V D Q Y N N Q N N F V H D C V N
atcaccatcaagcagcacacagtcaccaccaccaccaagggggagaacttcacggagacc
I T I K Q H T V T T T T K G E N F T E T
gacatcaagataatggagcgcgtggtggagcagatgtgtaccaccagtatcagaaggag
D I K I M E R V V E Q M C T T Q Y Q K E
tcccaggcctactacgatggaagaaggctctaa
S Q A Y Y D G R R S -

scF_v W226 in pET-22b

---pelB---Nco1---HC---Linker---LC---Eag1---c-Myc---XhoI---HHHHHH---X

atgccccgttctcatcatcatcatcatcatgggtatggctagcatgactgggtggacagcaa
M R G S H H H H H H G M A S M T G G Q Q
atgggtcgggatctgtacgacgatgacgataaggatcgatggggatccctggaagttctg
M G R D L Y D D D D K D R W G S L E V L
ttccagggcccaagaagcgcgccgaagcctggaggatggaacactgggggcagccgatac
F Q G P K K R P K P G G W N T G G S R Y
ccggggcagggcagccctggaggcaaccgctaccacctcagggcggtggtggctggggg
P G Q G S P G G N R Y P P Q G G G G W G
cagcctcatgggtggtggctgggggcagcctcatgggtggtggctgggggcagcccatggt
Q P H G G G W G Q P H G G G W G Q P H G
ggtggctggggacagcctcatgggtggtggctgggggtcaaggaggtggcaccacagtcag
G G W G Q P H G G G W G Q G G G T H S Q
tggacaagccgagtaagccaaaaaccaacatgaagcacatggctggtgctgcagcagct
W N K P S K P K T N M K H M A G A A A A
ggggcagtggtggggggccttggcggctacatgctgggaagtgccatgagcaggcccatc
G A V V G G L G G Y M L G S A M S R P I
atacatttcggcagtgactatgaggaccgttactatcgtgaaaacatgcaccgttacccc
I H F G S D Y E D R Y Y R E N M H R Y P
aaccaagtgtactacaggccatggatgagtagcaaccagaacaactttgtgcacgac
N Q V Y Y R P M D E Y S N Q N N F V H D
tgcgtcaatatcacaatcaagcagcacacgggtcaccacaaccaccaagggggagaacttc
C V N I T I K Q H T V T T T T K G E N F
accgagaccgacgtaagatgatggagcgcgtggttgagcagatgtgtatcaccagtac
T E T D V K M M E R V V E Q M C I T Q Y
gagaggggaatctcaggcctattaccagagaggatcgtaatga
E R E S Q A Y Y Q R G S - -

W226_#3a in pET-15b

Start---HIS---Thrombin---Nde1---[025---heavy---145]---xx---Xho1

atgggcagcagccatcatcatcatcatcacagcagcggcctggtgccgcgcggcagccat
M G S S H H H H H H S S G L V P R G S H
atggaggtccagctgcagcagctctggagctgagctggcgaggcctgggacttcagtgaac
M E V Q L Q Q S G A E L A R P G T S V N
ctgtcttgtaagacttctggctacagcttcacaggctatggtgtaagttgggtgaagcag
L S C K T S G Y S F T G Y G V S W V K Q
cgaattggacagggccttgagtggtggattggagagatttatcctagaagtggtaataacttac
R I G Q G L E W I G E I Y P R S G N T Y
tacaatgagaagttcaagggcaaggccacactgactgcagacaaatcctccaacacggcg
Y N E K F K G K A T L T A D K S S N T A
tacatggagctccgcagcctgacatctgaggactctgcggtctatcttctgtgcaagatgg
Y M E L R S L T S E D S A V Y F C A R W
aactgggaaagggatgcaatggactactgggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctca
N W E R D A M D Y W G Q G T S V T V S S
gccaaataatgactcgag
A K - - L E

W226_#4a in pET-15b

Start---HIS---Thrombin---Nde1---[171---light---283]---xx---Xho1

atgggcagcagccatcatcatcatcatcacagcagcggcctggtgccgcgcggcagccat
M G S S H H H H H H S S G L V P R G S H
atggacattgtgatgacccaaactccactctccctgctcagtcagtccttgagatcaagcc
M D I V M T Q T P L S L P V S L G D Q A
tccatctcttgaggctctagtcagagccttgaaagcagtagtgatccccatttgaac
S I S C R S S Q S L E S S S G Y P H L N
tggtacctccagaaaccaggccagctctccacaactcctgatctacagggtttccaaccga
W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y R V S N R
ttttctggggctcctagacaggttcagtggttagtgatcagggacagatttcacactgcaa
F S G V L D R F S G S G S G T D F T L Q
atcagcagagtgaggctgaggatttgggagtttatttctgcctccaaattacacatgctc
I S R V E A E D L G V Y F C L Q I T H V
ccgtggacgttcgggtggaggcaccaagctggaaatcaaacggtaatgactcgag
P W T F G G G T K L E I K R - - L E

W226_#3b in pET-22b

Start--- pelB---Nco1---PreScission---[025---heavy---145]---Xho1---HIS---X

atgaaatacctgctgccgaccgctgctgctggtctgctgctcctcgctgcccagccggcg
M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A
atggccatggcgctcgaggtgctggttcaaggtccggaggtccagctgcagcagtctgga
M A M A L E V L F Q G P E V Q L Q Q S G
gctgagctggcgaggcctgggacttcagtgaacctgtcttgtaagacttctggctacagc
A E L A R P G T S V N L S C K T S G Y S
ttcacaggctatggtgtaagttgggtgaagcagcgaattggacagggccttgagtggatt
F T G Y G V S W V K Q R I G Q G L E W I
ggagagatttatcctagaagtggtaataacttactacaatgagaagttcaagggcaaggcc
G E I Y P R S G N T Y Y N E K F K G K A
acactgactgcagacaaatcctccaacacggcgtacatggagctccgcagcctgacatct
T L T A D K S S N T A Y M E L R S L T S
gaggactctgcggctctatcttctgtgcaagatggaactgggaaagggatgcaatggactac
E D S A V Y F C A R W N W E R D A M D Y
tggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctcagccaaactcgagcaccaccaccaccac
W G Q G T S V T V S S A K L E H H H H H
cactga
H -

W226_#4b in pET-22b

Start--- pelB---Nco1---PreScission---[171---light---283]---Xho1---HIS---X

atgaaatacctgctgccgaccgctgctgctggtctgctgctcctcgctgcccagccggcg
M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A
atggccatggcgctcgaggtgctggttcaaggtccggacattgtgatgacccaaactcca
M A M A L E V L F Q G P D I V M T Q T P
ctctccctgcctgtcagtccttgagatcaagcctccatctcttgaggtctagtcagagc
L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S
cttgaaagcagtagtgatccccatttgaactggtacctccagaaaccaggccagtct
L E S S S G Y P H L N W Y L Q K P G Q S
ccacaactcctgatctacaggggttccaaccgattttctggggctctagacaggttcagt
P Q L L I Y R V S N R F S G V L D R F S
ggtagtgatcagggacagatctcacactgcaaatcagcagagtgagggtgaggatttg
G S G S G T D F T L Q I S R V E A E D L
ggagtttatttctgcctccaaattacacatgtcccgtggacgttcggtggaggcaccaag
G V Y F C L Q I T H V P W T F G G G T K
ctggaaatcaaacggctcgagcaccaccaccaccactga
L E I K R L E H H H H H H H -

10.2 Oligodesoxyribonukleotide

Alle Start-Primer hybridisieren N-terminal und sind zum nicht-codierenden Strang kompatibel. Die Stop-Primer hybridisieren am C-Terminus und sind zum codierenden Strang kompatibel. Die *codon usage* wurde nicht angepasst. Die aufgelisteten Oligonukleotide wurden für die Klonierung von *single domain*-Konstrukten im Rahmen dieser Arbeit entworfen.

Oligo W226_#3a_start

5'-aaa aaa cat atg gag gtc cag ctg cag cag tct gga gct gag-3'->PCR

Oligo W226_#3a_stop

5'-aaa aaa ctc gag tca tta ttt ggc tga gga gac ggt gac tga ggt tcc-3'->PCR

Oligo W226_#4a_start

5'-aaa aaa cat atg gag att gtg atg acc caa act cca ctc tcc-3'->PCR

Oligo W226_#4a_stop

5'-aaa aaa ctc gag tca tta ccg ttt gat ttc cag ctt ggt gcc tcc acc-3'->PCR

Oligo W226_#3b_start

5'-aaa aaa gcc atg gcg ctc gag gtg ctg ttt caa ggt ccg gag gtc cag ctg cag
cag tct gga gct gag-3'->PCR

Oligo W226_#3b_stop

5'-aaa aaa ctc gag ttt ggc tga gga gac ggt gac tga ggt tcc-3'->PCR

Oligo W226_#4b_start

5'-aaa aaa gcc atg gcg ctc gag gtg ctg ttt caa ggt ccg gac att gtg atg acc
caa act cca ctc tcc-3'->PCR

Oligo W226_#4b_stop

5'-aaa aaa ctc gag ccg ttt gat ttc cag ctt ggt gcc tcc acc-3'->PCR

10.3 Peptide

Alanin-Scan

PANATecs GmbH, Tübingen, D

C-Terminus: CONH

N-Terminus: Acetyl

huPrP 143-157

Ac-SDYEDRYYRENMHRY	18/06-2 wt
Ac-ADYEDRYYRENMHRY	18/06-3 S143
Ac-SAYEDRYYRENMHRY	18/06-4 D144
Ac-SDAEDRYYRENMHRY	18/06-5 Y145
Ac-SDYADRYYYRENMHRY	18/06-6 E146
Ac-SDYEARYYYRENMHRY	18/06-7 D147
Ac-SDYEDAYYYRENMHRY	18/06-8 R148
Ac-SDYEDRAYRENMHRY	18/06-9 Y149
Ac-SDYEDRYYAENMHRY	18/06-10 R151
Ac-SDYEDRYYRANMHRY	18/06-11 E152
Ac-SDYEDRYYREAMHRY	18/06-12 N153
Ac-SDYEDRYYRENAHRY	18/06-13 M154
Ac-SDYEDRYYRENMARY	18/06-14 H155
Ac-SDYEDRYYRENMHAY	18/06-15 R156

VRQ14-Peptid

PANATecs GmbH, Tübingen, D

C-Terminus: CONH

N-Terminus: Acetyl

Ac-DSGKTYSPGQSYLVSR

Prof. Dr. Theodoros Sklaviadis (Universität Thessaloniki)

Peptid I: LPLTPLP, freie Termini

Peptid II: ATTRTLPGGG, freie Termini

Peptid III: LMPHSSQGGG, freie Termini

Peptid IV: KCCYPVPGGG, freie Termini

10.4 Nährmedien

10.4.1 Luria Bertani (LB) - Vollmedium

LB (500 ml):	Pepton	5.0 g
	Hefe-Extrakt	2.5 g
	NaCl	5.0 g
	ddH ₂ O	ad 500 ml

LB-Agarplatten: Zum LB-Grundrezept (500 ml) wurden 7.5 g Agar hinzu gegeben.
(ca. 16 Platten)

10.4.2 M9-Minimalmedium (Sambrook *et al.*, 1989)

Das M9-Minimalmedium wurde für die Anzucht in isotonenangereichertem Medium verwendet. Auf diese Weise konnte die Expression isotonenmarkierter Proteine erreicht werden.

1 x M9 + Zusätze (1000 ml): 800 ml ddH₂O in einen Kolben geben und gemeinsam autoklavieren, abkühlen lassen, steril hinzugeben:

10 x M9-Salze	100 ml	
1M MgSO ₄	2.0 ml	
TS ₂ -Spurenelemente (1 x)	2.0 ml	(Meyer & Schlegel, 1983)
10 mM Fe(III)citrat	1.0 ml	
1M CaCl ₂	0.1 ml	
MEM-Vitamine (100 x)	10.0 ml	
Ampicillin (100 mg/ml)	1.0 ml	
Glucose (20 % (w/v))	20.0 ml	
NH ₄ Cl (20 g/l)	50.0 ml	
ddH ₂ O (steril)	ad 100 ml	

10.5 Gelelektrophorese

15 % SDS-Gele, verstärkter *Crosslinker* (1 Gel):

	Trenngel	Sammelgel
Na ₂ SO ₃	10 mg	-
Acrylamid (Rotiphorese [®] A Lsg., Roth, Karlsruhe, D)	2.9 ml	0.3 ml
Bisacrylamid (Rotiphorese [®] B Lsg., Roth, Karlsruhe, D)	1.2 ml	0.1 ml
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	1.5 ml	-
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	-	0.5 ml
ddH ₂ O	0.4 ml	0.9 ml
=> filtrieren, nach der SDS-Zugabe entgasen		
SDS (10 % (w/v))	60 µl	20 µl
APS (10 % (w/v))	60 µl	20 µl
TEMED	4 µl	2 µl

Es wurden Gele mit 8 cm Breite, 8 cm Höhe und 0.75 mm Dicke gegossen, wobei die Höhe des Trenngels etwa 6 cm und die des Sammelgels etwa 2 cm betrug.

10.6 Puffer & Lösungen

Alle Puffer (Tab. 10.1) und Lösungen wurden mit vollständig deionisiertem Wasser (ddH₂O) (Seralpur PRO 90 CN-Reinstwasseranlage, Seral, Ransbach-Baumbach, D) hergestellt. Steriles ddH₂O wurde entweder durch Autoklavieren (121 °C, 1 bar Überdruck, 20 min) oder Sterilfiltration (Spritzenvorsatzfilter: 0.2 µm Porengröße, Sartorius, Göttingen) hergestellt.

Tab. 10.1: Liste der verwendeten Puffer.

Angegeben sind die in dieser Arbeit verwendeten Puffer, ihre Zusammensetzung und der eingestellte pH-Wert.

Puffer	Zusammensetzung	pH
SDS-Laufpuffer	Tris-HCl (50 mM) pH 8.3 Glycin (385 mM) SDS (0.1 % (w/v))	pH 8.3
Coomassie-Färber	Coomassie [®] Brilliantblau R-250 (0.05 % (w/v)) Ethanol (45 % (v/v)) Essigsäure (9.2 % (v/v))	/
Entfärber I	Ethanol (25 % (v/v)) Essigsäure (1 % (v/v))	/
Entfärber II	Ethanol (5 % (v/v)) Essigsäure (7 % (v/v))	/
Aufschlusspuffer	Tris-HCl, pH 8.0 (50 mM) MgCl ₂ (1 mM) DNaseI (5 mg pro 1000 ml Kultur) Lysozym (15 mg pro 1000 ml Kultur) Proteaseinhibitorcocktail Complete (1 Tablette)	pH 8.0

Lösungen:

9-Aminoacridin:	33.3 mM in NMR-Puffer, pH 4.5
Ampicillin:	100 mg/ml in ddH ₂ O, sterilfiltriert
Chloramphenicol:	34 mg/ml in 100 % Ethanol p.A., sterilfiltriert
Glucose:	200 g/l in ddH ₂ O sterilfiltriert
IPTG:	1 M in ddH ₂ O
Quinacrin:	50 mM in NMR-Puffer, pH 4.5
PMSF:	0.1 M in Isopropanol

10.7 Chemikalien, Enzyme & verschiedene Verbrauchsmaterialien

Aldrich, Milwaukee, WI, USA: D₂O (99.9 % D)

Amersham Biosciences, Uppsala, SE: PreScissionTM - Protease (2 U/μl)

Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA: d₄-Essigsäure (99.5 %)

Campro Scientific, Berlin, D: ¹⁵N-Ammoniumsulfat (99 % ¹⁵N)

Eurisotop, Gif-sur-Yvette, F: Deuterium-Oxid (99.90 % D); d₆-DMSO (99.96 % D)

Fisher, Loughborough, UK: Acetonitril, HPLC Gradient grade

Fluka, Buchs, CH: Coomassie[®] Brilliantblau R-250, Natriumazid

GE Healthcare, Braunschweig, D: OMNISCANTM Lösung

Gerbu, Gaiberg, D: Ampicillin; IPTG; Rifampicin

Invitrogen, Carlsbad, CA, USA: MEM-Vitamine (100 x)

Macherey-Nagel, Düren, D: NucleoSpin[®] Plasmid Kit

Merck, Darmstadt, D: CertiPUR[®] pH-Eichpufferlösungen pH 2.00; pH 4.00 und pH 7.00 je bei 20 °C mit pH ± 0.015

Millipore, Bedford, MA, USA: Microcon[®] 500 μl, 10000 Da Ausschlussvolumen; Steriflip[®] 50 ml, 0.22 μm Porengröße

Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA: Nalgene[®] Sterilfiltereinheiten, 500 ml

Qiagen, Hilden, D: Ni-NTA Superflow

Roche, Mannheim, D: DNaseI; Proteaseinhibitorcocktail Complete EDTA-free

Roth, Karlsruhe, D: Agarose; b-Mercaptoethanol; Carbenicillin; Chloramphenicol; Ethidiumbromid 1 % (w/v); Glucose; Glycin; GSH; GSSG; Hefeextrakt; Imidazol; Natriumhypochloridlg., 12 % Cl; Pepton; Roti[®]-Load 1 (4 x); Rotiphorese[®] Gel A Lsg.; Rotiphorese[®] Gel B Lsg.; Spectra/Por[®] Dialyseschläuche, 3500 Da und 8000 Da Ausschlussvolumen; Sucrose; Trifluoressigsäure

Sartorius, Göttingen, D: Minisart[®]-RC25 Spritzenvorsatzfilter, 0.2 µm Porengröße

Serva, Heidelberg, D: N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

Sigma, St. Louis, MO, USA: Antifoam Y-30 Emulsion, Molecular biology grade; Benzamidin; DSS; L-Alanin; L-Arginin-Monohydrochlorid; L-Asparagin; L-Asparaginsäure; L-Cystein-Hydrochlorid Monohydrat; L-Glutamin; L-Glutaminsäure; Glycin; L-Histidin- Monohydrochlorid Monohydrat; L-Isoleucin; L-Leucin; L-Lysin-Monohydrochlorid; L-Methionin; L-Phenylalanin; L-Prolin; L-Serin; L-Threonin; L-Tryptophan; L-Tyrosin; L-Valin; Lysozym; Triton[®] X-100

Spectra Gases, Columbia, MD, USA: ¹⁵N-L-Alanin (98 % ¹⁵N), ¹⁵N-Ammoniumchlorid (> 99 % ¹⁵N), ¹⁵N-L-Arginin (98 % ¹⁵N), ¹³C₆-D-Glucose (> 99 % ¹³C), ¹⁵N-Glycin (98 % ¹⁵N), ¹⁵N-L-Leucin (98 % ¹⁵N), ¹⁵N-Threonin (98 % ¹⁵N), ¹⁵N-L-Tyrosin (98 % ¹⁵N), ¹⁵N-L-Valin (98 % ¹⁵N)

Vivascience, Hannover, D: VIVASPIN 20 ml, 10000 Da Ausschlussvolumen

10.8 Geräte

10.8.1 Gelelektrophorese

Mighty Small II SE250/SE260 Elektrophoresekammer (Hoefel/Pharmacia, Freiburg, D)
EPS 301 Netzgerät (Pharmacia, Freiburg, D)
ST 5 Schüttler (CAT, Staufen, D)

10.8.2 Klonierung & Expression

MicroPulserTM Elektroporator (BioRad, Hercules, CA, USA)
Elektroporationsküvetten (0,1 cm) (BioRad, Hercules, CA, USA)
Brutschrank Modell 200 (Mettler, Schwabach, D)
C25KC Schüttelinkubator (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA)
Innova[®] 44 Schüttelinkubator (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA)
BIOSTAT[®]B 1 l Fermenter (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D)
BIOSTAT[®]B 10 l Fermenter (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D)
Labsonic[®]U Ultraschall-Desintegrator (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D)

10.8.3 Proteinreinigung

FPLC

P-1 Peristaltikpumpe (Pharmacia, Freiburg, D)
Econo[®]-Säulen-Set, 2.5 cm Durchmesser (BioRad, Hercules, CA, USA)
Programmer GP-250 PLUS (Pharmacia, Freiburg, D)
Econo EG1 Gradienten-Monitor (BioRad, München, D)
Uvicord SII Detektor (Pharmacia, Freiburg, D)
REC 101 Schreiber (Pharmacia, Freiburg, D)
FRAC-100 Fraktionssammler (Pharmacia, Freiburg, D)
Christ Alpha 1-4 Gefriertrocknungsanlage (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D)

10.8.4 Spektroskopische Methoden

Uvikon 930 UV/VIS-Zweistrahlenspektrophotometer (Kontron Instruments, München, D)
Halb-Mikro-Küvette, Polystyrol, 1 cm Schichtdicke (Sarstedt, Nümbrecht, D)
Schwarzwandquarzküvetten, 1 cm Schichtdicke (Hellma, Mühlheim, D)

Circular Dichrograph J-810 (Jasco, Groß-Umstadt, D)
Quarzküvette, 1 mm Schichtdicke (Hellma, Mühlheim, D)

NMR:

Avance 400 MHz Micro mit einem 5 mm TXI-z-Gradienten-Probenkopf und einer BVT 2000 und BCU 05 Temperaturkontrolleinheit (Bruker, Karlsruhe, D)
DRX 600 mit einem 5 mm TXI-ATM-x,y,z-Gradienten-Probenkopf und einer BVT 3000 und BCU 05 Temperaturkontrolleinheit (Bruker, Karlsruhe, D)

Avance 700 Ultrashield mit einem 5 mm TCI-CryoProbe[™]-z-Gradienten-Probenkopf und einer BVT 3000 und BCU 05 Temperaturkontrolleinheit (Bruker, Karlsruhe, D)

Avance 800 Ultrastabilized mit einem 5 mm TCI-CryoProbe[™]-z-Gradienten- oder TXI-ATM-z-Gradienten-Probenkopf und einer BVT 3000 und BCU 05 Temperaturkontrolleinheit (Bruker, Karlsruhe, D)

Ultraprecision NMR Sample Tubes, ab 500 µl Probenvolumen (Norell, Mays Landing, NJ, USA)

Shigemi[®] NMR Sample Tubes, ab 300 µl Probenvolumen (Shigemi, Allison Park, PA, USA)

10.8.5 Zentrifugen

In Abhängigkeit von Volumen, Geschwindigkeit und Temperatur wurden folgende Zentrifugen verwendet:

Tischzentrifuge 5415 C (Eppendorf, Hamburg, D) für Probenvolumina bis 2.0 ml bei maximal 14000 rpm

Tischzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus, Hanau, D) für Probenvolumina bis 2.0 ml bei maximal 13000 rpm unter Kühlung

Tischzentrifuge Rotanta 430 R (Hettich, Tuttlingen, D) für Probenvolumina bis 85 ml bei maximal 18000 g unter Kühlung

Standzentrifuge Centrikon T-324 (Kontron Instruments, München, D) für Probenvolumina bis 500 ml bei maximal 9000 rpm mit einem A 6.9 Festwinkelrotor bei Verwendung von Sicherungsringen unter Kühlung

10.8.6 Autoklaven

Melag Autoklav 23 (Melag AG, Berlin, D)

Varioklav[®] Typ 500 (H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, D)

Autoklav V-150 (Systec, Wetzlar, D)

10.8.7 Verschiedene

pH 535 MultiCal[®] pH-Meter (WTW, Weinheim, D) mit ORION SURE-FLOW ROSS semi-micro pH (Thermo, Boston, MA, USA) und Biotrode pH 2 -11 (Hamilton, Bonaduz, CH) pH-Elektroden

Blockthermostat BT 100 (Kleinfeld Labortechnik, Gehrden, D)

Herasafe Klasse II Sicherheitswerkbank (Heraeus, Osterode, D)

Ultraschallbad RK 106 S (Sonorex, Berlin, D)

Laborwaage LC 2200 P (Sartorius, Göttingen, D)

Laborwaage LC 4200 (Sartorius, Göttingen, D)

Laborwaage AQT-1500 (Adam Equipment Co Ltd, Milton Keynes, UK)

Analysewaage AC 210 S (Sartorius, Göttingen, D)

Analysewaage AC 121 S (Sartorius, Göttingen, D)

TTS 2 Mixer (IKA, Wilmington, NC, USA)

Anti-Statik-Pistole (piezo-electric pistol) Zerostat 3 (Milty, Bury St. Edmunds, Suffolk, England)

10.9 Computer-Software

Chromas 2.24 (Technelysium Pty. Ltd.)

Corel DRAW[®] X3 Graphics Suite (Corel Corporation, Ottawa, ON, Canada)

Grafit 3.0 Erithacus Software (Staines, UK)

ImageJ 1.30v Rasband, W. (NIH, Bethesda, USA)

Matlab 7.1.0.183 (R14) Service Pack 3 (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA)

NMRView 4.1.3 (One Moon Scientific, New Jersey, USA)

PyMOL (DeLano Scientific LLC, San Francisco, CA, USA)

X-Winnmr 3.0 (Bruker Biospin, Rheinstetten, D)

WebLab Viewer 5 Lite (Accelrys, San Diego, CA, USA)

10.10 Messbedingungen und Daten

Experimentelle Parameter für die NMR-Experimente mit scF_v W226:

Für deuterierte Proben wurde die 2H-Entkopplung mittels dem 2-HTX Board erreicht. Die Temperatur betrug in allen Experimenten 308 K. Die unten angeführten Parameterlisten wurden mit dem Shell-Skript „750.sh“ erzeugt (S. Schwarzinger) und mit Einträgen für TD2, TD3 und die spektralen Breiten in den indirekten Domänen aus den Bruker acquis-Dateien ergänzt.

HSQC-Parameter

```
INSTRUM= AVANCE 800 US TCI-CryoProbe mit z-Gradienten und TXI-ATM mit z-Gradient
PULPROG= <sgtrosyct.ks> NS= 32 (bis 640 bei Titrationen)
TD= 1024(H) x 256-368(N) TD0= 1
DS= 16 RG= 1024
DECIM= 16 SW= 13.0186565651357
SW_h= 1041 7 SFO1= 800.133763
SW_n= 2838
O1= 3763 SFO2= 201.215986177635
O2= 23137.177635 SFO3= 81.086036023342
O3= 9567.023342 TE= 308

NUCLEI
NUC1= <1H> NUC2= <13C>
NUC3= <15N> NUC4= <off>
```

PULSE WIDTHS (usec)

```
p 0= 5,0 p 1= 9,0 p 2= 18,0 p 3= 15,0
p 4= 31,0 p 9= 120,0 p16= 1000,0 p17= 100,0
p21= 42,0 p22= 84,0 p28= 40,0 p30= 625,0
p31= 2500,0
```

DELAYS (sec)

```
d 0= 0,000004 d 1= 2,000000 d 2= 0,000000 d 3= 0,000000
d 6= 0,000000 d 7= 0,000000 d11= 0,000000 d12= 0,000020
d13= 0,000003 d16= 0,000100 d19= 6,000000 d20= 0,000000
```

POWER LEVELS (dB)

```
p1 1=-3,000000 p1 2=-5,000000 p1 3=-4,000000 p116=10,000000
p118=10,000000 p130=-1,000000 p131=11,000000
```

HNCA-Parameter

```
INSTRUM= AVANCE 800 US, TCI-CryoProbe mit z-Gradienten
PULPROG= <trhnca2h.ks> NS= 8
TD= 1024(H) x 80(N) x 128(C) TD0= 1
DS= 64 RG= 2048
DECIM= 16 SW= 13.0186565651357
SW_h= 10417 SFO1= 800.133763
SW_n= 2059 SW_c= 6036
O1= 3763 SFO2= 201.204109
O2= 11259.9999999929 SFO3= 81.0860927768703
O3= 9623.7768703 TE= 308
```


HNCO-Parameter

INSTRUM= AVANCE 800 US, TCI-CryoProbe mit z-Gradienten
PULPROG= <trhnco2.ks> NS= 8
TD= 1024(H) x 80(N) x 80(C) TD0= 1
DS= 16 RG= 1024
DECIM= 16 SW= 13.0186564837827
SW_h= 104167 SFO1= 800.133768
SW_n= 2059 SW_c= 2616
O1= 3768 SFO2= 201.227649
O2= 34800 SFO3= 81.0860927768703
O3= 9623.7768703 TE= 308

NUCLEI

NUC1= <1H> NUC2= <13C>
NUC3= <15N> NUC4= <off>

PULSE WIDTHS (usec)

p 0= 5,0	p 1= 9,0	p 2= 18,0	p 3= 12,0
p 9= 120,0	p11= 1750,0	p12= 41,0	p14= 256,0
p15= 37,0	p16= 1000,0	p21= 42,0	p22= 84,0
p26= 40,0	p28= 40,0	p30= 625,0	p31= 2500,0

DELAYS (sec)

d 0= 0,000004	d 1= 2,000000	d 2= 0,000000	d 3= 0,000000
d 7= 0,000000	d10= 0,000004	d11= 0,000000	d12= 0,000020
d13= 0,000003	d16= 0,000100	d19= 6,000000	d26= 0,000000

POWER LEVELS (dB)

p1 1=-3,000000	p1 2=-3,000000	p1 3=-4,000000	p111=41,000000
p112= 3,000000	p116=10,000000	p118=10,000000	p119= 9,000000
p130=-1,000000	p131=11,000000		

HN(CA)CO-Parameter

INSTRUM= AVANCE 800 TCI-CryoProbe mit z-Gradienten
PULPROG= <trhnca2h.ks> NS= 16
TD= 1024(H) x 80(N) x 96(C) TD0= 1
DS= 128 RG= 2048
DECIM= 16 SW= 13.0186564837827
SW_h= 104167 SFO1= 800.133768
SW_n= 2075 SW_c= 2616
O1= 3768 SFO2= 201.227649
O2= 34800 SFO3= 81.0860927768703
O3= 9623.7768703 TE= 308

NUCLEI

NUC1= <1H> NUC2= <13C>
NUC3= <15N> NUC4= <2H>

PULSE WIDTHS (usec)

p 0= 5,0	p 1= 9,0	p 2= 18,0	p 3= 12,0
p 9= 120,0	p11= 1750,0	p12= 37,0	p13= 384,0
p14= 256,0	p15= 33,0	p16= 1000,0	p17= 300,0
p21= 41,0	p22= 82,0	p26= 40,0	p28= 40,0
p30= 625,0	p31= 2500,0		

DELAYS (sec)

d 0= 0,000004	d 1= 2,000000	d 2= 0,000000	d 3= 0,000000
d 7= 0,000000	d10= 0,000004	d11= 0,000000	d12= 0,000020
d13= 0,000003	d16= 0,000100	d19= 7,000000	d24= 0,000000

POWER LEVELS (dB)

pl 1=-3,000000 pl 2=-5,000000 pl 3=-4,000000 pl 4=-4,000000
 pl11=41,000000 pl12= 3,000000 pl16=10,000000 pl17=-4,000000
 pl18=10,000000 pl19= 9,000000 pl30=-1,000000 pl31=11,000000

HNCACB-Parameter

INSTRUM= AVANCE 800 US TCI-CryoPobe mit z-Gardienten
 PULPROG= <trhncacb2h.ks> NS= 16
 TD= 1024(H) x 80(N) x 128(C) TD0= 1
 DS= 16 RG= 1024
 DECIM= 16 SW= 13.0186564837827
 SW_h= 10417 SFO1= 800.133768
 SW_n= 2075 SW_c= 13076
 O1= 3768.00000003641 SFO2= 201.201299
 O2= 8450.0000000105 SFO3= 81.0860927768703
 O3= 9623.7768703 TE= 308

NUCLEI

NUC1= <1H> NUC2= <13C>
 NUC3= <15N> NUC4= <2H>

PULSE WIDTHS (usec)

p 0= 5,0 p 1= 9,0 p 2= 18,0 p 3= 15,0
 p 4= 31,0 p 9= 120,0 p11= 1750,0 p14= 256,0
 p16= 1000,0 p17= 300,0 p21= 41,0 p22= 82,0
 p26= 40,0 p28= 40,0 p30= 625,0 p31= 2500,0

DELAYS (sec)

d 0= 0,000010 d 1= 1,000000 d 2= 0,000000 d 3= 0,000000
 d 7= 0,000000 d10= 0,000004 d11= 0,000000 d12= 0,000020
 d13= 0,000003 d16= 0,000100 d19= 6,000000 d23= 0,000000

POWER LEVELS (dB)

pl 1=-3,000000 pl 2=-5,000000 pl 3=-4,000000 pl 4=-4,000000
 pl11=41,000000 pl12= 3,000000 pl16=10,000000 pl17=-4,000000
 pl18=10,000000 pl19= 9,000000 pl30=-1,000000 pl31=11,000000

HN(CO)CACB-Parameter

INSTRUM= AVANCE 800 US TCI-CryoPobe mit z-Gardienten
 PULPROG= <trhncocacb2h.ks> NS= 16
 TD= 1024(H) x 80(N) x 128(C) TD0= 1
 DS= 128 RG= 1024
 DECIM= 16 SW= 13.0186564837827
 SW_h= 10417 SFO1= 800.133768
 SW_n= 2075 SW_c= 13076
 O1= 3768 SFO2= 201.201299
 O2= 8450.0000000105 SFO3= 81.0860927768703
 O3= 9623.7768703 TE= 308

NUCLEI

NUC1= <1H> NUC2= <13C>
 NUC3= <15N> NUC4= <2H>

PULSE WIDTHS (usec)

p 0= 5,0 p 1= 9,0 p 2= 18,0 p 3= 12,0
 p 9= 120,0 p11= 1750,0 p12= 37,0 p13= 384,0
 p14= 256,0 p15= 33,0 p16= 1000,0 p17= 300,0

p21= 42,0 p22= 84,0 p26= 40,0 p28= 40,0
p30= 625,0 p31= 2500,0

DELAYS (sec)

d 0= 0,000010 d 1= 2,000000 d 2= 0,000000 d 3= 0,000000
d 7= 0,000000 d10= 0,000004 d11= 0,000000 d12= 0,000020
d13= 0,000003 d16= 0,000100 d19= 6,000000 d23= 0,000000

POWER LEVELS (dB)

pl 1=-3,000000 pl 2=-5,000000 pl 3=-4,000000 pl 4=-4,000000
pl11=41,000000 pl12= 3,000000 pl16=10,000000

Zuordnung des scF_v W226: Übersicht über die ermittelten chemischen Verschiebungen

Sequenz	HN	N	Ca	Ca(i-1)	Cβ	Cβ(i-1)	CO	CO(i-1)
A Ala 24			51.825		18.755		177.003	
E Glu 25	8.333	121.371	56.046	51.825	29.928	18.755	175.814	177.003
V Val 26	7.419	122.028	62.606	56.276	31.449	29.925	175.212	175.837
L Leu 28			56.040		41.605		174.899	
Q Gln 29	9.114	122.567	54.406	56.040	29.928	41.605	176.333	174.899
Q Gln 30	9.752	129.321	55.809	54.403	31.451	29.927	176.217	176.316
S Ser 31	7.662	114.702	57.918	55.809	63.445	31.451	175.832	176.177
G Gly 32	8.614	108.647	44.789	57.918	-100.000	63.434	172.211	175.828
A Ala 33	8.021	120.242	52.763	44.796	19.263	-100.000	178.364	172.266
E Glu 34	8.507	119.430	54.402	52.769	32.975	19.263	175.622	178.362
L Leu 35	8.520	128.076	53.937	54.404	42.116	32.975	175.438	175.621
A Ala 36	8.742	128.821	49.947	53.934	22.818	41.608	175.620	175.405
R Arg 37	8.078	119.838	53.101	49.944	28.912	22.818	174.813	175.639
P Pro 38								
G Gly 39	10.058	111.914	44.655	62.937	-100.000	30.435	174.912	177.582
T Thr 40	7.231	112.058	60.979	44.798	70.046	-100.000	171.497	174.916
S Ser 41	7.795	110.903	56.045	60.965	66.490	70.045	174.101	171.563
V Val 42	8.311	114.466	59.093	56.156	35.006	66.492	172.795	174.168
N Asn 43	8.509	121.977	52.294	59.094	40.084	35.006	173.490	172.782
L Leu 44	8.991	128.106	54.402	52.295	41.100	40.084	176.188	173.459
S Ser 45	8.642	113.235	56.512	54.338	66.999	41.100	174.812	176.233
C Cys 46	8.736	125.853	56.278	56.512	44.910	-100.000	174.811	174.811
W Trp 60			55.316		29.958		175.925	
V Val 61	9.206	122.876	60.373	55.316	37.653	29.958	173.162	175.925
K Lys 62	9.461	128.929	54.216	60.373	36.041	37.653	174.315	173.162
Q Gln 63	9.389	128.234	54.803	54.216	30.910	36.041	174.826	174.315
R Arg 64	8.521	129.913	55.105	54.803	30.943	30.910	176.056	174.826
I Ile 65	8.498	125.923	62.841	55.107	36.529	30.943	177.655	176.068
G Gly 66	8.799	115.830	45.262	61.435	-100.000	36.518	174.304	177.655
Q Gln 67	8.140	119.425	54.872	45.028	29.443	-100.000	175.825	174.404
G Gly 68	8.188	108.634	44.846	54.867	-100.000	29.443	172.919	175.826
N Asn 85			52.254		38.077		178.081	
E Glu 86	9.727	106.873	59.387	52.254	28.969	38.077	-100.000	178.081
K Lys 87	7.810	115.757	57.837	59.387	31.959	28.969	177.048	178.275
F Phe 88	8.187	114.407	57.837	57.837	40.134	-100.000	175.733	177.048
K Lys 89	7.314	124.196	58.351	57.837	30.952	40.134	177.579	175.733
G Gly 90			45.026		-100.000		173.093	
K Lys 91	7.432	121.790	55.338	45.026	31.451	-100.000	173.935	173.093
A Ala 92	7.724	120.064	49.135	55.240	21.805	31.959	176.179	173.965
T Thr 93	8.402	115.060	61.436	49.246	70.554	21.802	174.191	176.159
L Leu 94	8.608	130.814	53.283	61.436	41.088	70.554	175.322	174.191
T Thr 95	8.328	111.467	60.396	53.248	73.130	41.088	-100.000	175.295
A Ala 96	8.967	121.712	52.063	60.396	20.787	73.125	174.610	174.852
D Asp 97	9.191	121.295	52.058	52.058	42.116	20.787	174.635	174.631

S	Ser	99			60.906		62.973		174.911
S	Ser	100	7.156	113.199	56.843	60.906	64.968	62.973	175.212 174.911
N	Asn	101	7.395	121.660	53.466	56.746	36.529	64.968	173.765 175.224
T	Thr	102	7.120	112.807	61.444	53.300	70.575	36.518	171.355 173.794
A	Ala	103	8.837	130.120	49.757	61.436	21.329	-100.000	174.294 171.355
Y	Tyr	104			56.343		41.125		176.013
M	Met	105	8.661	124.208	54.287	56.343	32.980	41.125	173.089 176.013
E	Glu	106	8.469	129.623	53.696	54.169	31.450	32.975	176.133 173.084
L	Leu	107	8.521	128.759	52.763	53.697	44.147	31.451	175.286 176.169
R	Arg	108	8.158	120.423	53.698	52.531	32.975	44.147	174.925 175.267
S	Ser	109	8.207	115.607	56.982	53.849	61.444	32.975	175.015 174.916
L	Leu	110	8.043	117.617	55.574	56.980	42.113	61.413	178.773 175.217
T	Thr	111	9.592	114.353	59.094	55.581	72.586	42.116	176.151 178.761
E	Glu	113			57.881		28.418		177.038
D	Asp	114	8.245	117.340	54.803	57.881	42.124	28.418	177.442 177.038
S	Ser	115	7.607	119.936	59.326	54.803	62.425	42.124	173.541 177.446
A	Ala	116	8.842	129.698	51.587	59.325	20.279	62.425	174.376 173.541
V	Val	117	7.925	119.089	61.436	51.589	31.959	20.279	174.304 174.405
D	Asp	131			53.779		41.100		175.262
Y	Tyr	132	7.939	121.760	55.354	53.779	38.053	41.100	173.976 175.262
G	Gly	134			44.689		-100.000		173.179
Q	Gln	135	8.554	116.164	56.342	44.689	27.392	-100.000	176.952 173.179
G	Gly	136	7.759	110.946	44.176	56.342	-100.000	27.388	172.569 176.952
T	Thr	137	8.268	119.776	62.425	44.176	72.075	-100.000	174.202 172.574
S	Ser	138	9.037	123.818	57.881	62.425	62.937	72.078	173.233 174.198
V	Val	139	9.058	128.905	61.201	57.917	33.990	62.937	175.387 173.236
T	Thr	140	8.545	124.686	61.669	61.201	70.047	33.935	172.310 175.420
V	Val	141	8.391	129.242	60.027	61.668	30.942	70.046	176.173 172.330
S	Ser	142	8.484	123.081	57.681	60.027	63.953	30.943	173.594 176.231
S	Ser	150			58.055		63.953		174.201
D	Asp	151	8.184	122.379	53.934	58.055	40.592	63.953	174.609 174.201
Y	Tyr	152	7.806	120.570	55.811	53.934	39.577	40.592	174.382 174.560
P	Pro	153			62.369		33.482		175.928
L	Leu	154	8.227	123.371	55.107	62.369	41.100	33.482	177.351 175.928
A	Ala	155	8.270	125.474	52.060	55.106	18.755	41.100	178.263 177.384
S	Ser	170			57.881		63.964		174.085
D	Asp	171	8.033	123.347	53.777	57.881	40.084	63.964	176.144 174.085
I	Ile	172	9.123	123.743	61.399	53.777	36.022	40.084	176.424 176.148
V	Val	173	8.529	106.806	61.985	61.399	32.980	36.024	176.128 176.424
M	Met	174	8.991	128.623	51.355	61.985	29.928	32.975	175.919 176.128
T	Thr	175	9.633	122.185	62.139	51.356	69.029	-100.000	174.539 175.919
P	Pro	178			62.373		34.498		175.218
L	Leu	179	8.614	121.413	57.684	62.373	41.101	34.498	178.367 175.218
S	Ser	180	7.679	112.987	56.335	57.859	64.460	41.100	172.272 178.467
L	Leu	181	9.034	128.151	51.355	56.505	43.639	64.460	171.796 172.262
P	Pro	182			60.496		30.435		177.247
V	Val	183	9.006	120.215	58.972	60.496	35.514	30.435	175.273 177.247
S	Ser	184	8.480	118.892	57.212	59.093	63.445	35.511	174.302 175.222
L	Leu	185	8.455	123.036	56.519	57.211	39.069	63.445	178.774 174.306
G	Gly	186	9.359	113.420	44.555	56.509	-100.000	39.069	173.958 178.804
D	Asp	187	7.746	122.292	53.936	44.558	41.100	-100.000	174.816 173.998
Q	Gln	188	8.061	117.617	54.168	53.933	29.927	41.101	175.321 174.812
A	Ala	189	8.504	124.025	50.421	54.404	22.310	29.928	175.421 175.317
S	Ser	190	7.682	115.947	56.981	50.533	64.460	22.310	172.313 175.524

W	Trp	210			56.043		31.959		175.014
Y	Tyr	211	9.422	119.899	56.279	56.043	42.624	31.959	173.490 175.014
L	Leu	212	8.498	122.780	52.647	56.514	44.655	42.623	174.500 173.491
Q	Gln	213	9.704	129.007	53.934	52.529	30.943	44.655	174.964 174.502
K	Lys	214	8.997	107.670	55.110	53.939	30.435	30.943	173.564 174.978
P	Pro	215							
G	Gly	216			45.496		27.346		174.101
Q	Gln	217	7.958	118.926	53.608	45.496	30.943	27.346	175.724 174.101
S	Ser	218	8.344	116.014	56.275	53.696	62.429	30.943	172.069 175.721
L	Leu	222			54.780		41.100		176.211
I	Ile	223	7.448	125.908	62.372	54.780	39.069	41.100	180.891 176.211
S	Ser	240			57.212		65.984		174.021
G	Gly	241	8.350	110.105	45.491	57.212	-100.000	65.984	171.942 174.021
S	Ser	242	7.320	110.838	57.681	45.496	63.952	-100.000	173.898 171.919
G	Gly	243	9.401	111.359	48.162	57.621	-100.000	63.953	173.200 173.950
T	Thr	244	8.222	117.363	60.500	48.309	70.575	-100.000	174.303 173.181
D	Asp	245	7.423	122.860	54.168	60.492	43.131	70.575	173.316 174.361
F	Phe	246	8.674	122.840	56.980	54.170	42.118	43.131	175.724 173.336
T	Thr	247	8.890	118.810	61.433	56.981	72.254	42.116	171.914 175.728
L	Leu	248	8.602	129.395	52.762	61.435	40.592	72.586	173.877 171.925
Q	Gln	249	8.908	125.643	53.463	52.762	31.451	40.592	174.354 173.922
I	Ile	250	8.592	124.447	59.560	53.464	38.561	31.451	176.843 174.403
S	Ser	251	8.924	122.387	59.793	59.329	62.937	38.561	173.795 176.799
R	Arg	252	6.588	119.843	55.340	59.793	29.928	62.937	174.100 173.797
V	Val	253	8.514	123.613	63.775	55.340	31.959	29.928	176.438 174.103
E	Glu	254	9.177	129.733	53.700	63.780	31.451	31.959	177.148 176.466
A	Ala	255	8.915	124.007	55.339	53.699	17.232	31.451	180.157 177.148
E	Glu	256	8.265	114.243	57.214	55.107	28.404	16.826	175.929 180.194
D	Asp	257	7.873	119.915	53.933	57.322	40.592	28.404	176.640 175.930
L	Leu	258	6.928	118.505	55.806	53.934	40.084	40.594	175.776 176.684
G	Gly	259	7.476	108.221	44.090	55.806	-100.000	40.084	170.447 175.795
V	Val	260	7.911	120.553	60.498	44.086	32.467	-100.000	174.459 170.444
Y	Tyr	261	8.820	126.408	56.426	60.374	41.526	32.487	177.600 174.459
F	Phe	262	9.588	119.998	56.980	56.512	43.757	41.608	175.131 177.655
C	Cys	263	7.510	116.380	52.527	56.981	44.655	43.757	172.397 175.147
T	Thr	272			59.380		73.116		172.344
F	Phe	273	9.058	121.243	55.927	59.380	42.116	73.116	179.186 172.344
G	Gly	274	8.990	108.686	44.688	-100.000	-100.000	-100.000	174.808 179.186
G	Gly	275	8.449	131.014	46.198	44.688	-100.000	-100.000	174.811 174.808
G	Gly	276	6.907	106.845	44.091	46.198	-100.000	-100.000	172.824 174.875
T	Thr	277	8.019	119.400	61.431	44.092	72.586	-100.000	172.878 172.878
K	Lys	278	8.404	129.119	55.343	61.434	32.467	73.091	173.694 173.566
L	Leu	279	9.075	107.834	54.862	55.346	43.131	32.467	175.332 173.728
E	Glu	280	8.059	124.834	53.464	54.638	32.975	43.131	173.591 175.323
I	Ile	281	8.135	121.806	58.859	53.469	37.545	32.974	176.741 173.592
K	Lys	282	8.256	128.751	55.808	58.855	32.467	37.545	175.930 176.737
R	Arg	283	8.429	125.538	55.571	55.812	30.435	32.467	176.046 175.904
A	Ala	284	8.380	126.490	52.062	55.340	18.755	30.435	177.351 176.030
D	Asp	285	8.191	119.817	53.700	52.060	40.592	18.755	175.762 177.391
A	Ala	286	7.942	124.129	51.737	53.931	18.755	40.597	176.993 175.781
A	Ala	287	8.122	125.303	50.256	51.737	17.597	18.749	175.627 177.042

P	Pro	288	62.748			66.492		177.148		
T	Thr	289	8.132	115.320	61.544	62.748	69.539	66.492	174.646	177.148
V	Val	290	8.051	122.885	61.444	61.444	32.487	69.506	176.057	174.643
S	Ser	291	8.305	120.318	57.910	61.672	61.444	32.467	174.303	176.030
A	Ala	292	8.297	126.928	52.254	57.915	18.755	63.953	177.757	174.329
A	Ala	293	8.131	123.382	52.254	52.254	18.247	18.755	178.217	177.747
E	Glu	294	8.159	120.046	56.368	52.527	29.409	18.247	176.909	178.217
E	Glu	295	8.211	122.083	56.368	56.368	29.409	29.409	176.718	176.911
Q	Gln	296	8.212	121.604	55.854	56.368	28.381	29.409	175.954	176.711
K	Lys	297	8.127	123.234	55.854	55.854	31.980	28.381	176.333	175.954
L	Leu	298	8.137	124.041	54.825	55.854	41.100	31.980	177.208	176.337
I	Ile	299	7.985	122.455	60.408	54.825	38.081	41.125	176.145	177.189
S	Ser	300	8.336	120.643	57.837	60.408	63.953	38.053	174.774	176.126
E	Glu	301	8.468	123.697	56.809	57.837	29.420	63.953	177.012	174.778
E	Glu	302	8.279	120.738	56.809	56.809	29.415	29.415	176.542	177.012
D	Asp	303	8.064	121.256	54.311	56.809	40.591	29.421	176.698	176.542
L	Leu	304	7.909	122.629	55.851	54.311	41.095	40.590	178.067	176.718
E	Glu	305	8.060	119.496	56.809	55.851	28.895	41.103	176.909	178.070

Zuordnung des scF_v W226:

Übersicht der Originalwerte zur Aufstellung des Verschiebungsindex (a), ermittelte relative Effektstärken nach Titration mit PrP-Helix 1-Peptid (b) und normierte Intensitäten nach Zugabe von OMNISCAN™ (c)

a)		Deuterium delta-ppm		Korrektur		CSI		Σ	b)	c)
Seq		Ca	CO	Ca	CO	Ca	CO		PrP-H1	OMNISCAN
									Titration	norm.
A	24	-0.97	-1.5	-0.6	-1.4	0	-1	-1		
E	25	-0.55	-0.79	-0.2	-0.7	0	-1	-1	0	
V	26	0.01	-1.79	0.41	-1.7	0	-1	-1	2030	0.18
L	28	0.54	-3.3	0.94	-3.2	1	-1	0		
Q	29	-1.79	-0.47	-1.4	-0.4	-1	0	-1	919	0.46
Q	30	-0.39	-0.58	0.01	-0.5	0	0	0	691	0.47
S	31	-0.78	0.43	-0.4	0.53	0	1	1	748	0.42
G	32	-0.61	-2.69	-0.2	-2.6	0	-1	-1	0	
A	33	-0.04	-0.14	0.36	-0	0	0	0	0	0.06
E	34	-2.2	-0.98	-1.8	-0.9	-1	-1	-2	199	0.29
L	35	-1.56	-2.76	-1.2	-2.7	-1	-1	-2	0	0.12
A	36	-2.85	-2.88	-2.5	-2.8	-1	-1	-2	0	0.45
R	37	-3.4	-2.29	-3	-2.2	-1	-1	-2	0	
P	38									
G	39	-0.74	0.01	-0.3	0.11	0	0	0	0	0.42
T	40	-1.02	-4.1	-0.6	-4	0	-1	-1	0	0.43
S	41	-2.66	-1.3	-2.3	-1.2	-1	-1	-2	0	
V	42	-3.51	-4.21	-3.1	-4.1	-1	-1	-2	247	
N	43	-1.01	-2.61	-0.6	-2.5	0	-1	-1	273	0.02
L	44	-1.1	-2.01	-0.7	-1.9	0	-1	-1	738	
S	45	-2.19	-0.59	-1.8	-0.5	-1	0	-1	320	
C	46	0.68	-0.69	1.08	-0.6	1	-1	0	532	0.56
W	60	-2.28	-1.17	-1.9	-1.1	-1	-1	-2		
V	61	-2.23	-3.84	-1.8	-3.7	-1	-1	-2	1935	0.42
K	62	-2.48	-3.09	-2.1	-3	-1	-1	-2	1365	0.67
Q	63	-1.4	-1.97	-1	-1.9	-1	-1	-2	542	0.72
R	64	-1.4	-1.04	-1	-0.9	-1	-1	-2	2638	0.52
I	65	1.24	0.56	1.64	0.66	1	1	2	1879	
G	66	-0.14	-0.6	0.26	-0.5	0	0	0	0	0.38
Q	67	-1.33	-0.98	-0.9	-0.9	-1	-1	-2	363	
G	68	-0.55	-1.98	-0.2	-1.9	0	-1	-1	322	0.09
N	85	-1.05	1.98	-0.6	2.08	0	1	1		
E	86	2.79	1.7	3.19	1.8	1	1	2	1741	0.20
K	87	1.14	-0.35	1.54	-0.3	1	0	1	1593	0.35
F	88	-0.26	-0.87	0.14	-0.8	0	-1	-1	808	
K	89	1.65	0.18	2.05	0.28	1	0	1	992	0.33
G	90	-0.37	-1.81	0.03	-1.7	0	-1	-1		
K	91	-1.36	-3.47	-1	-3.4	-1	-1	-2	2159	
A	92	-3.67	-2.32	-3.3	-2.2	-1	-1	-2	1058	0.55
T	93	-0.56	-1.41	-0.2	-1.3	0	-1	-1	2178	0.43
L	94	-2.22	-2.88	-1.8	-2.8	-1	-1	-2	29204	
T	95	-1.6	-0.7	-1.2	-0.6	-1	-1	-2	497	-0.01
A	96	-0.74	-3.89	-0.3	-3.8	0	-1	-1	0	0.02
D	97	-2.14	-1.67	-1.7	-1.6	-1	-1	-2	329	0.09

S 99	2.21	-0.49	2.61	-0.4	1	0	1		
S 100	-1.86	-0.19	-1.5	-0.1	-1	0	-1	885	
N 101	0.17	-2.34	0.57	-2.2	0	-1	-1	1004	
T 102	-0.56	-4.25	-0.2	-4.1	0	-1	-1	522	
A 103	-3.04	-4.21	-2.6	-4.1	-1	-1	-2	1061	0.47
Y 104	-1.96	-0.69	-1.6	-0.6	-1	-1	-2		
M 105	-1.51	-4.01	-1.1	-3.9	-1	-1	-2	237	0.26
E 106	-2.9	-0.47	-2.5	-0.4	-1	0	-1	819	0.51
L 107	-2.74	-2.91	-2.3	-2.8	-1	-1	-2	263	0.51
R 108	-2.8	-2.17	-2.4	-2.1	-1	-1	-2	0	
S 109	-1.72	-0.39	-1.3	-0.3	-1	0	-1	0	
L 110	0.07	0.57	0.47	0.67	0	1	1	0	
T 111	-2.91	0.55	-2.5	0.65	-1	1	0	0	0.61
E 113	1.28	0.44	1.68	0.54	1	1	2		
D 114	0.6	1.14	1	1.24	1	1	2	0	
S 115	0.63	-1.86	1.03	-1.8	1	-1	0	0	0.56
A 116	-1.21	-4.12	-0.8	-4	-1	-1	-2	0	
V 117	-1.16	-2.7	-0.8	-2.6	-1	-1	-2	0	
D 131	-0.42	-1.04	-0	-0.9	0	-1	-1		
Y 132	-2.95	-2.72	-2.5	-2.6	-1	-1	-2	0	
G 134	-0.71	-1.72	-0.3	-1.6	0	-1	-1		
Q 135	0.14	0.15	0.54	0.25	0	0	0	1997	0.63
G 136	-1.22	-2.33	-0.8	-2.2	-1	-1	-2	1404	
T 137	0.42	-1.4	0.82	-1.3	1	-1	0	1658	
S 138	-0.82	-2.17	-0.4	-2.1	0	-1	-1	1393	0.05
V 139	-1.4	-1.61	-1	-1.5	-1	-1	-2	336	
T 140	-0.33	-3.29	0.07	-3.2	0	-1	-1	0	
V 141	-2.57	-0.83	-2.2	-0.7	-1	-1	-2	0	
S 142	-1.02	-1.81	-0.6	-1.7	0	-1	-1	0	
S 150	-0.65	-1.2	-0.2	-1.1	0	-1	-1		
D 151	-0.27	-1.69	0.13	-1.6	0	-1	-1	0	
Y 152	-2.49	-2.32	-2.1	-2.2	-1	-1	-2	0	0.22
P 153									
L 154	-0.39	-0.85	0.01	-0.7	0	-1	-1	0	
A 155	-0.74	-0.24	-0.3	-0.1	0	0	0	0	
S 170	-0.82	-1.32	-0.4	-1.2	0	-1	-1		
D 171	-0.42	-0.16	-0	-0.1	0	0	0	513	0.25
I 172	-0.2	-0.68	0.2	-0.6	0	-1	-1	2057	0.24
V 173	-0.62	-0.87	-0.2	-0.8	0	-1	-1	4480	0.51
M 174	-4.45	-1.18	-4	-1.1	-1	-1	-2	1442	
T 175	0.14	-1.06	0.54	-1	0	-1	-1	1917	0.50
P 178									
L 179	2.18	0.17	2.58	0.27	1	0	1	545	0.08
S 180	-2.37	-3.13	-2	-3	-1	-1	-2	0	0.26
L 181	-4.15	-6.4	-3.7	-6.3	-1	-1	-2	370	
P 182									
V 183	-3.63	-1.73	-3.2	-1.6	-1	-1	-2	0	0.62
S 184	-1.49	-1.1	-1.1	-1	-1	-1	-2	0	0.47
L 185	1.02	0.57	1.42	0.67	1	1	2	0	
G 186	-0.84	-0.94	-0.4	-0.8	0	-1	-1	0	0.51
D 187	-0.26	-1.48	0.14	-1.4	0	-1	-1	0	0.47
Q 188	-2.03	-1.48	-1.6	-1.4	-1	-1	-2	0	
A 189	-2.38	-3.08	-2	-3	-1	-1	-2	0	
S 190	-1.72	-3.09	-1.3	-3	-1	-1	-2	0	0.29

W 210	-1.56	-2.09	-1.2	-2	-1	-1	-2		
Y 211	-2.02	-3.21	-1.6	-3.1	-1	-1	-2	1719	0.78
L 212	-2.85	-3.7	-2.5	-3.6	-1	-1	-2	2211	
Q 213	-2.27	-1.84	-1.9	-1.7	-1	-1	-2	633	0.74
K 214	-1.59	-3.84	-1.2	-3.7	-1	-1	-2	3960	0.64
P 215									
G 216	0.1	-0.8	0.5	-0.7	0	-1	-1		
Q 217	-2.59	-1.08	-2.2	-1	-1	-1	-2	0	
S 218	-2.43	-3.33	-2	-3.2	-1	-1	-2	935	
L 222	-0.72	-1.99	-0.3	-1.9	0	-1	-1		
I 223	0.77	3.79	1.17	3.89	1	1	2	0	0.43
S 240	-1.49	-1.38	-1.1	-1.3	-1	-1	-2		
G 241	0.09	-2.96	0.49	-2.9	0	-1	-1	1134	0.09
S 242	-1.02	-1.5	-0.6	-1.4	0	-1	-1	2610	0.28
G 243	2.76	-1.7	3.16	-1.6	1	-1	0	4775	0.31
T 244	-1.5	-1.3	-1.1	-1.2	-1	-1	-2	4670	
D 245	-0.03	-2.98	0.37	-2.9	0	-1	-1	2923	0.43
F 246	-1.12	-0.88	-0.7	-0.8	-1	-1	-2	1707	0.58
T 247	-0.57	-3.69	-0.2	-3.6	0	-1	-1	364	0.62
L 248	-2.74	-4.32	-2.3	-4.2	-1	-1	-2	1892	0.85
Q 249	-2.74	-2.45	-2.3	-2.3	-1	-1	-2	278	
I 250	-2.04	-0.26	-1.6	-0.2	-1	0	-1	656	
S 251	1.09	-1.61	1.49	-1.5	1	-1	0	535	0.39
R 252	-1.16	-3	-0.8	-2.9	-1	-1	-2	481	0.46
V 253	1.18	-0.56	1.58	-0.5	1	0	1	208	
E 254	-2.9	0.55	-2.5	0.65	-1	1	0	674	0.47
A 255	2.54	1.66	2.94	1.76	1	1	2	425	0.14
E 256	0.61	-0.67	1.01	-0.6	1	-1	0	1624	0.29
D 257	-0.27	0.34	0.13	0.44	0	0	0	700	0.46
L 258	0.31	-2.42	0.71	-2.3	1	-1	0	583	0.64
G 259	-1.31	-4.45	-0.9	-4.4	-1	-1	-2	768	0.76
V 260	-2.1	-2.54	-1.7	-2.4	-1	-1	-2	765	0.45
Y 261	-1.87	0.9	-1.5	1	-1	1	0	1494	1.00
F 262	-1.12	-1.47	-0.7	-1.4	-1	-1	-2	3951	0.62
C 263	-3.07	-3.1	-2.7	-3	-1	-1	-2	1596	0.85
T 272	-2.62	-3.26	-2.2	-3.2	-1	-1	-2		
F 273	-2.17	2.59	-1.8	2.69	-1	1	0	1422	0.33
G 274	-0.71	-0.09	-0.3	0.01	0	0	0	3203	0.94
G 275	0.8	-0.09	1.2	0.01	1	0	1	664	0.23
G 276	-1.31	-2.08	-0.9	-2	-1	-1	-2	146	0.55
T 277	-0.57	-2.72	-0.2	-2.6	0	-1	-1	1834	
K 278	-1.36	-3.71	-1	-3.6	-1	-1	-2	0	
L 279	-0.64	-2.87	-0.2	-2.8	0	-1	-1	947	0.66
E 280	-3.14	-3.01	-2.7	-2.9	-1	-1	-2	310	0.57
I 281	-2.74	-0.36	-2.3	-0.3	-1	0	-1	645	
K 282	-0.89	-1.47	-0.5	-1.4	0	-1	-1	156	0.56
R 283	-0.93	-1.05	-0.5	-1	0	-1	-1	0	
A 284	-0.74	-1.15	-0.3	-1	0	-1	-1	0	0.20
D 285	-0.5	-0.54	-0.1	-0.4	0	0	0	0	
A 286	-1.06	-1.51	-0.7	-1.4	0	-1	-1	0	
A 287	-2.54	-2.87	-2.1	-2.8	-1	-1	-2	0	

P	288									
T	289	-0.46	-0.95	-0.1	-0.9	0	-1	-1	0	
V	290	-1.16	-0.94	-0.8	-0.8	-1	-1	-2	0	
S	291	-0.79	-1.1	-0.4	-1	0	-1	-1	0	
A	292	-0.55	-0.74	-0.1	-0.6	0	-1	-1	0	0.24
A	293	-0.55	-0.28	-0.1	-0.2	0	0	0	227	
E	294	-0.23	0.31	0.17	0.41	0	0	0	0	
E	295	-0.23	0.12	0.17	0.22	0	0	0	206	
Q	296	-0.35	-0.85	0.05	-0.7	0	-1	-1	251	
K	297	-0.85	-1.07	-0.4	-1	0	-1	-1	227	
L	298	-0.67	-0.99	-0.3	-0.9	0	-1	-1	190	0.25
I	299	-1.19	-0.95	-0.8	-0.9	-1	-1	-2	0	
S	300	-0.86	-0.63	-0.5	-0.5	0	-1	-1	269	
E	301	0.21	0.41	0.61	0.51	0	1	1	0	
E	302	0.21	-0.06	0.61	0.04	0	0	0	494	
D	303	0.11	0.4	0.51	0.5	0	0	0	1265	0.37
L	304	0.35	-0.13	0.75	-0	1	0	1	1074	0.39
E	305	0.21	0.31	0.61	0.41	0	0	0	1239	

11. Danksagung

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Paul Rösch für die Schaffung hervorragender Arbeitsbedingungen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Stephan Schwarzinger für die Betreuung meiner Arbeit, die richtungsweisenden Hilfestellungen und fachlichen Diskussionen.

Ebenso bedanke ich mich

- bei Herrn Dr. Kristian Schweimer für die Aufnahme mehrdimensionaler NMR-Spektren zur Zuordnung des scF_v W226
- bei Frau Ulrike Persau für die Unterstützung bei der Anzucht selektiv markierter Antikörper
- bei Frau Christine Viehrig für die Klonierung der *single domain*-Vektoren
- bei Herrn Rainer Hofmann für die Klärung aller Rechnerfragen
- bei Frau Dr. Barbara Eckert, Frau Violaine Zigan und Frau Hanna Berkner für das Korrekturlesen meiner Arbeit
- bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern des Lehrstuhls für die gute Arbeitsatmosphäre und die allgemeine Hilfsbereitschaft
- bei Herrn Prof. Dr. Holger Dobbek für die Durchführung von Röntgendiffraktionsmessungen

sowie ganz besonders bei meinen Eltern & meiner Freundin für ihren uneingeschränkten Rückhalt.

12. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner erkläre ich, dass ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, diese Dissertation einzureichen.

Ich habe keine gleichartige Doktorprüfung an einer anderen Hochschule endgültig nicht bestanden.

Bayreuth, den 02.01.2008