

# **Entwicklung Prionprotein-bindender Enterosorbentien zum Schutz gegen die orale Übertragung Spongiformer Enzephalopathien**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel

vorgelegt von  
**Thurid Boetel**

Kiel  
2006

Referent/in: Prof. Dr. Dr. Silvia Bulfone-Paus

Korreferent/in: Prof. Dr. Thomas Roeder

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2006

zum Druck genehmigt: Kiel, 24.11.2006

Der Dekan

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>4</b>
2.1	PRIONEN-ERKRANKUNGEN .....	4
2.1.1	<i>Prionen als Krankheitserreger .....</i>	4
2.1.2	<i>Eigenschaften von Prionen.....</i>	5
2.1.3	<i>Pathomechanismus Spongiformer Enzephalopathien .....</i>	6
2.2	DAS ZELLULÄRE PRIONPROTEIN (PRP <sup>c</sup> ) .....	7
2.2.1	<i>Allgemeine und strukturelle Aspekte .....</i>	7
2.2.2	<i>Biologie und Funktion.....</i>	9
2.2.3	<i>PrP-Liganden .....</i>	10
2.3	TRANSMISSIBILITÄT SPONGIFORMER ENZEPHALOPATHIEN .....	12
2.3.1	<i>Orale Transmission und Propagation von PrP<sup>sc</sup> .....</i>	12
2.4	PRÄVENTION DER ORALEN SE-TRANSMISSION.....	14
2.4.1	<i>Immunprophylaxe gegen ein Selbst-Antigen? .....</i>	14
2.4.2	<i>SE-Prophylaxe durch ‚Intestinale Prion-Dekontamination‘? .....</i>	15
2.5	BAKTERIELLER DISPLAY PROTEINÖSER DETERMINANTEN DURCH AUTOTRANSPORTER.....	18
2.6	ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	20
<b>3</b>	<b>MATERIALIEN .....</b>	<b>21</b>
3.1	SPEZIELLE GERÄTE UND APPARATUREN .....	21
3.2	CHEMIKALIEN .....	21
3.2.1	<i>Lösungsmittel und Chemikalien für die Peptidsynthese.....</i>	21
3.2.2	<i>Allgemeine Chemikalien.....</i>	22
3.2.3	<i>Fluoreszenzfarbstoffe (NHS-Ester).....</i>	22
3.2.4	<i>Bausteine für die Peptidsynthese .....</i>	23
3.3	SPEZIELLE VERBRAUCHSMATERIALIEN UND HILFSMITTEL .....	24
3.4	WEITERE SPEZIELLE MATERIALIEN.....	24
3.4.1	<i>Nachweis- und Testsysteme, Kits.....</i>	24
3.4.2	<i>Standards, Molekulargewichtsmarker, cDNA.....</i>	24
3.5	ENZYME UND PROTEINE .....	25
3.6	MEDIEN UND ZUSÄTZE FÜR DIE ZELLKULTUR .....	25
3.7	ANTIKÖRPER UND STREPTAVIDIN .....	26
3.7.1	<i>Primärantikörper.....</i>	26
3.7.2	<i>Sekundärantikörper und Streptavidin .....</i>	26
3.8	OLIGONUKLEOTIDE .....	27
3.9	VEKTOREN .....	28
3.10	BAKTERIENSTÄMME .....	29
3.11	ZELL-LINIEN .....	30
3.12	SOFTWARE.....	30
3.13	HÄUFIG VERWENDETE PUFFER .....	31

<b>4</b>	<b>METHODEN</b> .....	<b>32</b>
4.1	PEPTIDSYNTHESE.....	32
4.1.1	<i>Synthese festphasengebundener Peptidbibliotheken</i> .....	33
4.1.2	<i>Synthese löslicher Peptide</i> .....	33
4.2	ALLGEMEINE PROTEINCHEMISCHE ARBEITEN.....	34
4.2.1	<i>Konzentrationsbestimmung von Proteinen</i> .....	34
4.2.2	<i>MALDI-TOF Massenspektrometrie</i> .....	34
4.2.3	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Proteinfärbung</i> .....	35
4.2.4	<i>Immobilisierung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen</i> .....	37
4.3	ANALYSE MEMBRAN-IMMOBILISierter PROTEINE UND PEPTIDE.....	37
4.3.1	<i>Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen</i> .....	38
4.3.2	<i>Festphasenassays mit Peptiden</i> .....	39
4.4	MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITEN.....	41
4.4.1	<i>Präparation und Reinigung von Plasmid-DNA</i> .....	41
4.4.2	<i>Ethanol-Präzipitation von DNA</i> .....	42
4.4.3	<i>Konzentrationsbestimmung von DNA</i> .....	42
4.4.4	<i>Polymerase Kettenreaktion (PCR)</i> .....	42
4.4.5	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i> .....	43
4.4.6	<i>Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen</i> .....	44
4.4.7	<i>Reinigung von DNA</i> .....	44
4.4.8	<i>Herstellung doppelsträngiger DNA-Fragmente</i> .....	44
4.4.9	<i>Ligation</i> .....	45
4.4.10	<i>Sequenzierung von DNA</i> .....	45
4.5	ALLGEMEINE ARBEITEN MIT BAKTERIEN.....	45
4.5.1	<i>Kultivierung von Bakterien</i> .....	45
4.5.2	<i>Stammhaltung von Bakterien</i> .....	46
4.5.3	<i>Bestimmung der optischen Dichte (OD<sub>600</sub>)</i> .....	46
4.5.4	<i>Lysieren von Bakterien im analytischen Maßstab</i> .....	46
4.5.5	<i>Differentielle Fraktionierung von E. coli</i> .....	46
4.6	GENTECHNISCHE VERÄNDERUNG VON E. COLI.....	47
4.6.1	<i>Herstellung chemisch kompetenter E.coli</i> .....	47
4.6.2	<i>Transformation chemisch kompetenter E.coli</i> .....	48
4.6.3	<i>Selektion von Transformanden</i> .....	49
4.7	PRODUKTION REKOMBINANTER PRIONPROTEIN-FRAGMENTE.....	49
4.7.1	<i>Heterologe Expression von murinen PrP-Fragmenten in E. coli</i> .....	50
4.7.2	<i>Isolierung von PrP-haltigen Einschlußkörperchen</i> .....	50
4.7.3	<i>Denaturieren der Einschlußkörperchen</i> .....	50
4.7.4	<i>Affinitätschromatographische Reinigung über Ni-NTA-Agarose</i> .....	51
4.7.5	<i>Renaturieren der rekombinanten Proteine</i> .....	51
4.8	MARKIERUNG VON PROTEINEN MIT FLUORESZENZFARBSTOFFEN.....	52
4.8.1	<i>Kopplungsreaktion</i> .....	52
4.8.2	<i>Weiterverarbeitung der Kopplungsansätze</i> .....	52
4.8.3	<i>Analyse des Derivatisierungsgrades</i> .....	53

4.9	BINDUNGSSTUDIEN MIT BAKTERIEN.....	54
4.9.1	<i>Pull-Down Assay</i> .....	54
4.10	ANALYSE DER VERDAUUNGSSTABILITÄT VON PRP-LIGANDEN.....	55
4.10.1	<i>Untersuchung der Proteolyse-Sensitivität von Peptiden</i> .....	56
4.10.2	<i>Proteasebehandlung von Bakterien</i> .....	57
4.11	ANALYSE DER PRP-BINDUNG VON PEPTIDEN IM ELISA.....	57
4.12	UNTERSUCHUNG DER BIOTINYLIERUNG VON PEPTIDEN DURCH BIRA.....	59
4.12.1	<i>Durchführung der Kompetitionsexperimente</i> .....	59
4.12.2	<i>Analyse der Biotinylierungsreaktionen im Immunoassay</i> .....	60
4.13	ARBEITEN MIT EUKARYOTISCHEN ZELLEN.....	61
4.13.1	<i>Kultivierung von Caco-2<sub>BBE1</sub>-Zellen</i> .....	61
4.13.2	<i>Bindungsstudien mit Caco-2<sub>BBE1</sub> Zellen</i> .....	61
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE (TEIL I)</b> .....	<b>63</b>
5.1	HERSTELLUNG REKOMBINANTER MURINER PRIONPROTEIN-FRAGMENTE.....	63
5.1.1	<i>Plasmidkonstrukte und exprimierte Proteine</i> .....	63
5.1.2	<i>Heterologe Expression der rekombinanten PrP-Spezies</i> .....	65
5.1.3	<i>Reinigung der rekombinanten PrP-Spezies</i> .....	66
5.2	FLUORESCENZMARKIERUNG VON PROTEINEN.....	68
5.2.1	<i>Etablierung der Markierungsreaktionen für PrP90-231</i> .....	68
5.2.2	<i>Fluoreszenzmarkierung von PrP90-231</i> .....	71
5.2.3	<i>Fluoreszenzmarkierung von BSA und <math>\alpha</math>-Flag M2</i> .....	72
5.2.4	<i>Bestimmung des Derivatisierungsgrades</i> .....	72
5.2.5	<i>Bestimmung der Nachweisgrenze für PrP-680</i> .....	73
5.3	IDENTIFIZIERUNG PEPTIDISCHER PRP-LIGANDEN.....	73
5.3.1	<i>NCAM</i> .....	74
5.3.2	<i>Plasminogen (PLG)</i> .....	76
5.3.3	<i>Laminin</i> .....	78
5.3.4	<i>Laminin Rezeptor Precursor (LRP)</i> .....	79
5.3.5	<i>Bcl-2</i> .....	80
5.4	AUSWAHL UND WEITERE ANALYSE DER PRP-PEPTIDLIGANDEN.....	81
5.4.1	<i>Vergleich der PrP-Bindungskapazitäten der peptidischen Liganden</i> .....	81
5.4.2	<i>Einfluss der Fluorophorkomponente auf die Peptidbindung durch PrP-680</i> ...	82
5.4.3	<i>Verifizierung der spezifischen PrP-Bindung im Peptid-ELISA</i> .....	83
5.4.4	<i>Verdauungsstabilität der peptidischen PrP-Liganden</i> .....	85
5.5	BAKTERIELLER DISPLAY VON PRP-LIGANDEN.....	87
5.5.1	<i>Herstellung der AIDA-Konstrukte</i> .....	88
5.5.2	<i>Untersuchungen zur AIDA-vermittelten Expression von PrP-Liganden</i> .....	90
5.5.3	<i>Bindungsstudien mit modifizierten Bakterien</i> .....	93
5.6	STABILITÄT VON C600-(AIDA-K3) IM DÜNNDARMLUMEN.....	98
5.6.1	<i>Sensitivität des E. coli-exponierten Flag-Peptids gegenüber intestinalen Proteasen</i> .....	98
5.6.2	<i>Einfluss intestinaler Proteasen auf die PrP-Bindungskapazität von C600-(AIDA-K3)</i> .....	99

<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE (TEIL II)</b> .....	<b>101</b>
6.1	NACHWEIS DER INTERAKTION VON STREPTAVIDIN MIT PRP90-231 .....	101
6.2	KARTIERUNG UND ANALYSE LINEARER BINDESTELLEN .....	102
6.3	ANALYSE DER STREPTAVIDIN-BINDUNG DURCH DIE DELETIONSMUTANTE PRP101-231 .....	104
6.4	KOMPETITION DER BINDUNG VON PRP90-231 AN STREPTAVIDIN DURCH BIOTIN .....	105
6.5	UNTERSUCHUNGEN ZUR PUTATIVEN BIOTIN-IMITATION DURCH PRP90-231 <i>IN VIVO</i> ...	107
6.5.1	<i>Kompetitionsanalyse der Bindung von PrP90-231 an Caco-2<sub>BBet</sub>-Zellen durch Biotin</i> .....	107
6.5.2	<i>Einfluss von PrP90-231 auf BirA-katalysierte Biotinylierungsreaktionen</i> .....	109
<b>7</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>114</b>
7.1	ANALYSE PUTATIVER PRP-LIGANDEN UND IDENTIFIZIERUNG PEPTIDISCHER PRP-BINDER .....	115
7.1.1	<i>NCAM</i> .....	115
7.1.2	<i>Plasminogen</i> .....	117
7.1.3	<i>Laminin</i> .....	119
7.1.4	<i>Laminin Rezeptor Precursor</i> .....	120
7.1.5	<i>Bcl-2</i> .....	121
7.1.6	<i>Streptavidinbindung und putative Biotinimitation durch PrP90-231</i> .....	123
7.2	VALIDIERUNG DER PRP-BINDUNG DURCH PEPTIDISCHE LIGANDEN .....	125
7.3	AIDA-VERMITTELTE EXPRESSION DER PRP-LIGANDEN IN <i>E. COLI</i> .....	127
7.4	PRP-BINDUNG DURCH MODIFIZIERTE BAKTERIEN .....	130
7.5	<i>DE NOVO</i> GENERIERUNG HÖHERAFFINER PEPTIDLIGANDEN .....	130
7.6	ANWENDBARKEIT DER PRP-SPEZIFISCHEN ENTEROSORBENZIEEN <i>IN VIVO</i> .....	132
7.7	PLANUNG WEITERFÜHRENDER STUDIEN: EIN AUSBLICK .....	136
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>137</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>149</b>
9.1	SEQUENZDATEN .....	149
9.1.1	<i>PrP90-231 und PrP101-231</i> .....	149
9.1.2	<i>Der AIDA Autotransporter</i> .....	150
9.1.3	<i>Aminosäuresequenzen der PrP-Liganden</i> .....	154
9.2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	158

# 1 Zusammenfassung

Spongiforme Enzephalopathien sind stets tödlich verlaufende neurodegenerative Erkrankungen mit speziesübergreifender Transmissibilität. Gemäß der sogenannten Prion-Hypothese repräsentiert das infektiöse Agens PrP<sup>Sc</sup> ein sich autokatalytisch replizierendes Konformer des körpereigenen Prionproteins PrP<sup>C</sup>. Da gegenüber Prionen als fehlgefalteter Isoform eines Selbst-Antigens keine körpereigenen Abwehrmechanismen existieren, wurde in dieser Arbeit ein Konzept für eine nicht-immunologische Prävention der intestinalen Aufnahme von Prionen untersucht. Hierfür wurden gentechnisch modifizierte, PrP-bindende Bakterien entwickelt, die als selbstreplizierendes, spezifisches Entersorbens mit der Nahrung aufgenommene Prionen abfangen und eine Invasion des Pathogens verhindern könnten.

Murines Prionprotein (Aminosäuren 90-231) wurde rekombinant in *Escherichia coli* exprimiert, gereinigt, mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und zur Kartierung linearer Bindestellen der putativen Prionprotein-Interaktionspartner NCAM, Plasminogen (PLG), Laminin, Bcl-2 und des Laminin Rezeptor Precursors (LRP) verwendet. Die durch Analyse von Peptidbibliotheken identifizierten PrP-bindenden Sequenzmotive wurden auf ihre affinitätsbestimmenden Kernbereiche eingeeengt und hinsichtlich ihrer jeweiligen PrP-Bindungskapazität miteinander verglichen. Die drei vielversprechendsten 15-20mer Kandidatenpeptide aus NCAM, PLG und LRP wurden in permissive Loci des AIDA Auto-transporters inseriert und konnten in *E. coli* erfolgreich exprimiert und oberflächenassoziiert präsentiert werden. Eine Peptidliganden-vermittelte Adsorption von PrP an die modifizierten Bakterien konnte jedoch durchflusszytometrisch nicht nachgewiesen werden. Eine effiziente Bindung von PrP<sup>90-231</sup> wurde hingegen für Bakterien gezeigt, die die polypeptidische Kringle-Domäne 3 aus PLG exprimierten, deren AIDA-vermittelte Translokation und Exposition trotz ihrer umfangreichen Tertiärstruktur erreicht werden konnte. Konformationelle, Kringle-spezifische Determinanten können daher als essentiell für die Vermittlung einer affinen Interaktion von PrP mit Kringle-exponierenden *E. coli* und ebenso mit PLG angesehen werden. Da eine Adsorption von PrP durch Kringle 3-exponierende Bakterien auch nach Behandlung der Zellen mit muriner Intestinallavage nachweisbar blieb, soll das protektive Potential dieses potentiellen Entersorbens in einem Schutzexperiment überprüft werden, dessen Durchführung aufgrund der langen Inkubationszeit von Prionen-Erkrankungen im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war.

Ein weiterer Focus der Arbeit betraf die Untersuchung einer putativen Biotin-Imitation durch PrP<sup>90-231</sup>. Durch Kompetitionsstudien und Analyse einer PrP-Deletionsmutante wurden die Aminosäuren 90-100 von PrP als Vermittler einer spezifischen Bindung an Streptavidin über dessen Biotin-Bindetasche identifiziert. Eine potentielle Interferenz von PrP<sup>90-231</sup> im Biotinstoffwechsel wurde untersucht, konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

## Abstract

Spongiform encephalopathies represent transmissible neurodegenerative disorders that affect both humans and animals. They are believed to be caused by prions (PrP<sup>Sc</sup>), an autocatalytically replicating conformer of the ubiquitously expressed cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>). Being misfolded isoforms of a self-antigen, prions do not provoke immune responses and thus, infection might have to be prevented by non-immunological means. In this work, genetically modified, PrP-binding bacteria were designed which shall capture prions in the intestines and thereby prevent invasion of PrP<sup>Sc</sup> after oral exposure to contaminated food.

Murine prion protein encompassing amino acids 90-231 (PrP<sup>90-231</sup>) was recombinantly expressed in *Escherichia coli*, purified by affinity chromatography and labelled with fluorophores. Screening of peptide libraries representing the amino acid sequences of the putatively PrP<sup>C</sup>-interacting molecules NCAM, plasminogen, laminin, Bcl-2 and LRP (laminin receptor precursor) revealed several peptidic ligands with PrP-affinity. These peptides were compared with respect to their PrP binding capabilities *in vitro*, and three of the most promising 15-20mer candidates originating from the proteins NCAM, plasminogen and LRP were inserted into a permissive site of the *E. coli* AIDA autotransporter for bacterial surface display. The AIDA chimeras were shown to be efficiently expressed in transformed *E. coli*, but although translocation of the heterologous passenger domain to the bacterial outer surface was confirmed, no significant adsorption of labelled PrP could be demonstrated by flow cytometry. In contrast to that, a strong binding of fluorescently labeled prion protein to modified bacteria was observed when *E. coli* presenting the complete kringle-domain 3 of murine plasminogen were used in pull-down assays. Thus, conformational determinants in kringle domains are assumed to be essential for PrP-binding by plasminogen, and beyond, by kringle-exposing bacteria. AIDA-mediated surface display of the polypeptidic kringle-domain was achieved in spite of its disulfide bridge containing bulky tertiary structure, a feature which is known to hamper efficient translocation of heterologous passenger domains by autotransporters. As the PrP-binding capabilities of the Kringle 3-presenting bacteria could be shown to persist over a period of approximately twenty minutes in murine intestinal lavage fluid, the protective power of these potential bacterial enterosorbents against oral exposure to prions ought to be assessed in challenge studies in a mouse model system. Because of the long incubation time of prion diseases, conduction of these experiments in the context of the current work was not attainable. Instead, a novel feature of PrP<sup>90-231</sup> was investigated. Blotting experiments, competition studies and analysis of the PrP deletion mutant PrP<sup>101-231</sup> revealed a specific binding of amino acids 90-100 of PrP<sup>90-231</sup> to the biotin-binding pocket of streptavidin. Nevertheless, spot checks to reveal a physiological significance of the hitherto unknown property of PrP remained inconclusive.



## 2 Einleitung

### 2.1 Prionen-Erkrankungen

Unter dem Sammelbegriff der Prionen-Erkrankungen werden degenerative Erkrankungen des Zentralen Nervensystems (ZNS) zusammengefasst, die im Anschluss an eine Jahre bis Jahrzehnte dauernde Inkubationsperiode klinisch progressiv und stets tödlich verlaufen. Das Krankheitsbild ist durch neurologische Dysfunktionen wie Koordinationsstörungen, Gedächtnisverlust, Verhaltensänderungen oder Schlafstörungen geprägt. Die sichere Diagnose einer Prionen-Erkrankung ist jedoch erst *post mortem* durch histologische Untersuchungen des Hirngewebes möglich. Hierbei fallen als pathologische Veränderungen neben einer schwammartigen Aufweichung, der Vakuolisierung des Gewebes und Nervenzellverlusten auch eine astrozytäre Gliose und die Ablagerung proteinöser Aggregate (Amyloid-Plaques) auf. Aufgrund der typischen schwammartigen („spongiformen“) Hirndegeneration werden Prionenerkrankungen auch als Spongiforme Enzephalopathien (SE) bezeichnet.

Das Auftreten Spongiformer Enzephalopathien wurde sowohl für den Menschen als auch für verschiedene Tierarten beschrieben. Humane SE-Formen sind die *Creutzfeldt-Jakob-Krankheit* (CJD), *Kuru*, die *Fatale Familiäre Insomnie* (FFI) und das *Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom* (GSS). Beispiele für Prionenerkrankungen der Tiere sind die *Bovine Spongiforme Encephalopathie* (BSE), *Scrapie* bei Schafen, *Transmissible Mink Encephalopathie* (TME) bei Nerzen, die *Chronic Wasting Disease* (CWD) der Hirsche oder die *FSE (Feline Spongiforme Encephalopathie)* der Katzen.

#### 2.1.1 Prionen als Krankheitserreger

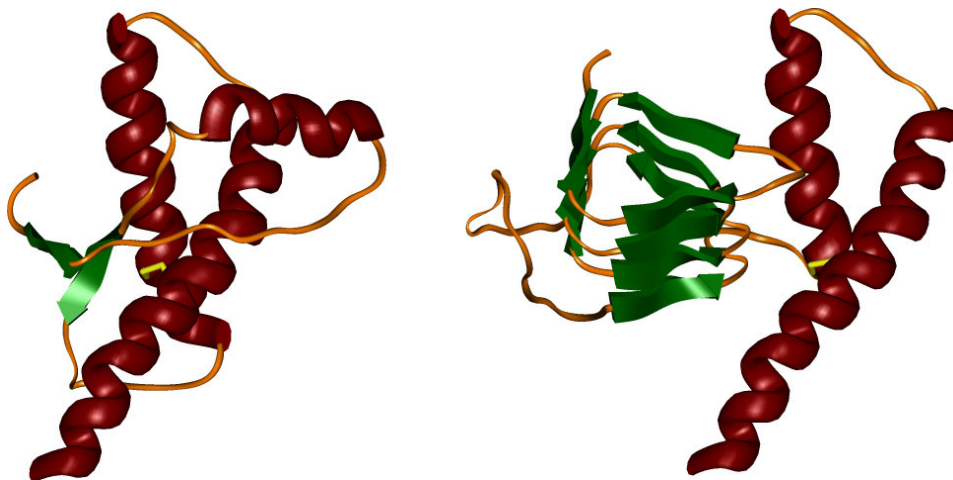
Spongiforme Enzephalopathien heben sich von anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimerschen Krankheit oder Morbus Parkinson dadurch ab, dass sie nicht nur sporadischen oder hereditären, sondern auch infektiösen Ursprungs sein können.

Die ursprünglich vermutete Ätiologie der SE als langsam verlaufende virale Infektion mit lang andauernder Inkubationsphase führte zur Begriffsprägung der ‚slow virus disease‘. Der Nachweis ungewöhnlicher Eigenschaften des Pathogens wie der Resistenz gegenüber DNA- und RNA-schädigender Strahlung bzw. Chemikalien sowie gegenüber hohen Temperaturen [1] zog jedoch schon früh den Schluss nach sich, dass es sich bei dem infektiösen Agens um einen unkonventionellen und für seine Replikation nicht auf Nukleinsäuren angewiesenen Erregertyp handeln müsste [2]. Die Idee eines rein proteinösen, autokatalytisch replizierenden Agens wurde 1967 von Griffith formuliert [3] und durch in der Gruppe um Stanley Prusiner durchgeführte Studien weiter untermauert [4, 5].

1982 wurde von Prusiner der Begriff ‚proteinaceous infectious particle‘ eingeführt, um den abgekürzt als ‚Prion‘ bezeichneten Erreger von bakteriellen oder viralen Pathogenen abzugrenzen [6]. Die Identifikation des für die Entstehung Spongiformer Enzephalopathien verantwortlichen Proteins als ein körpereigenes Genprodukt, welches in allen untersuchten Spezies sowohl in gesundem als auch in infiziertem Gewebe nachgewiesen werden konnte [7, 8], führte als Erweiterung der sogenannten ‚Prion-Hypothese‘ zu der Schlussfolgerung, dass zwei unterschiedliche Isoformen des Proteins existieren. Dem zellulären, apathogenen Prionprotein (cellular prion protein, PrP<sup>c</sup>) wurde so ein infektiöses Prion-Konformer gegenübergestellt, das in Anlehnung an die Scrapie-Erkrankung der Schafe als PrP<sup>sc</sup> (scrapie prion protein) bezeichnet wurde.

### 2.1.2 Eigenschaften von Prionen

Es konnte gezeigt werden, dass sich die pathogene Isoform PrP<sup>sc</sup> in einer Reihe biochemischer und physikalischer Eigenschaften von ihrem zellulären Gegenstück unterscheidet. Während das nicht-infektiöse PrP<sup>c</sup> eine hauptsächlich  $\alpha$ -helicale Struktur und eine gute Löslichkeit in nicht-ionischen Detergenzien aufweist, wurde für PrP<sup>sc</sup> eine durch  $\beta$ -Faltblätter geprägte Struktur und eine Neigung zur Bildung unlöslicher Aggregate beschrieben [9, 10].



**Abbildung 2.1: Vergleichende Darstellung der konformationellen PrP-Isomere.** Durch Umfaltung des  $\alpha$ -helicalen zellulären PrP<sup>c</sup> (links) entsteht die  $\beta$ -Faltblatt-reiche Alternativkonformation von PrP<sup>sc</sup> (rechts). Da aufgrund der Unlöslichkeit von PrP<sup>sc</sup> keine NMR-Daten für die pathogene Form vorliegen, stellt die abgebildete Struktur nur eine Annäherung an die realen Verhältnisse dar.

Die veränderte Tertiärstruktur verleiht Prionen weiterhin eine erhöhte Stabilität gegenüber proteolytischer Degradation. Eine Behandlung von PrP<sup>Sc</sup> mit gastrointestinalen Proteasen oder Proteinase K (PK) resultiert in der Abspaltung eines aminoterminalen Fragments von circa 70 Aminosäuren Länge; das verdauungsresistente Kernprotein bleibt intakt [11, 12]. Da PrP<sup>C</sup> durch Proteasen innerhalb kürzester Zeit vollständig abgebaut wird, wird der immunologische Nachweis von PrP in PK-behandeltem Material auch als biochemischer Marker für die Anwesenheit von Prionen und die *post-mortem* Diagnose einer SE verwendet. Die Infektiosität von PrP<sup>Sc</sup> und die Fähigkeit zur Ausbildung amyloider Aggregatstrukturen bleibt durch die partielle Degradation unbeeinflusst [13].

### 2.1.3 Pathomechanismus Spongiformer Enzephalopathien

Der auslösende Faktor für die Entstehung einer SE ist das Eindringen infektiösen Materials in den Körper oder die *de novo* Entstehung von fehlgefaltetem PrP<sup>Sc</sup> im Organismus selbst. Beispiele für die letztere Möglichkeit sind die sporadische Form der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (sCJD) und die hereditären Prionenerkrankungen, zu denen die familiäre Form der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (fCJD), GSS und FFI gehören. Während bei der sCJD aus nicht bekannten Gründen heraus eine spontane Umfaltung des zellulären Prionproteins stattfindet, konnten bei den vererbbaeren SE-Formen spezifische Mutationen im Gen für PrP identifiziert werden, von denen man annimmt, dass sie die (spontane) Konversion in die pathogene Form begünstigen [14].

Unabhängig von der Art der Entstehung oder Aufnahme bildet das einmal im Körper vorhandene fehlgefaltete Prion den Ausgangspunkt für die weitere Propagation, in deren Verlauf durch einen dominoartigen autokatalytischen Umfaltungsprozess eine Netto-Neubildung von PrP<sup>Sc</sup> stattfindet [15]. Es wird angenommen, dass die Konversion des Wirts-PrP<sup>C</sup> eine Heterodimerisierung beider Isoformen erfordert, welche entweder auf der Zelloberfläche oder in endozytotischen Kompartimenten erfolgt [16, 17]. Das Vorhandensein von körpereigenem Prionprotein ist hierbei eine Voraussetzung für die Suszeptibilität gegenüber Prionenerkrankungen. Dies konnte in Challenge-Experimenten mit PrP-defizienten Mäusen nachgewiesen werden, die selbst nach intrazerebraler Inokulation keine PrP<sup>Sc</sup>-Propagation und keine histopathologischen Veränderungen zeigten [18].

## 2.2 Das zelluläre Prionprotein (PrP<sup>c</sup>)

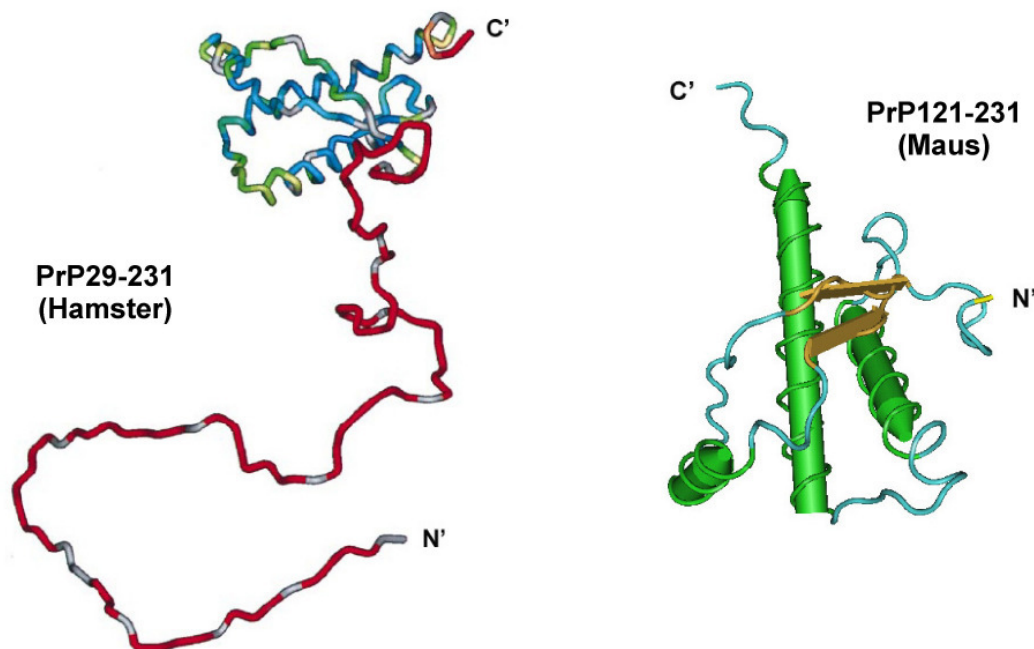
### 2.2.1 Allgemeine und strukturelle Aspekte

Das zelluläre Prionprotein, dessen Vorhandensein im Körper eine Grundvoraussetzung für die Entstehung einer Spongiformen Enzephalopathie darstellt, ist ein innerhalb der Säugetiere hochkonserviertes, auf der Zelloberfläche verankertes Glykoprotein mit einer je nach Spezies variierenden Länge von 208-220 Aminosäuren [19]. Die Biosynthese des Vorläuferproteins, das beim murinen PrP<sup>c</sup> 254 Aminosäuren umfasst, findet am rauen endoplasmatischen Reticulum (ER) statt. Nach Translokation des Präproteins in das ER-Lumen wird die aminoterminal Signalsequenz von 23 Aminosäuren (aa) Länge abgespalten. Posttranslationale Modifikationen beinhalten die N-glykosidische Addition komplexer und variabler Oligosaccharid-Ketten an die Asparaginreste 180 und 196 der murinen Sequenz [20-22] sowie die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen 178 und 213 und das Anhängen eines Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Ankers an Serin 231 mit gleichzeitiger Entfernung des C-terminalen, hydrophoben Signalpeptids [23]. Über den Golgi-Apparat, in dem die terminale Glykosylierung stattfindet, und den sekretorischen Weg erreicht das reife Protein die Zelloberfläche, wo es über den GPI-Anker gekoppelt membrangebunden verbleibt.

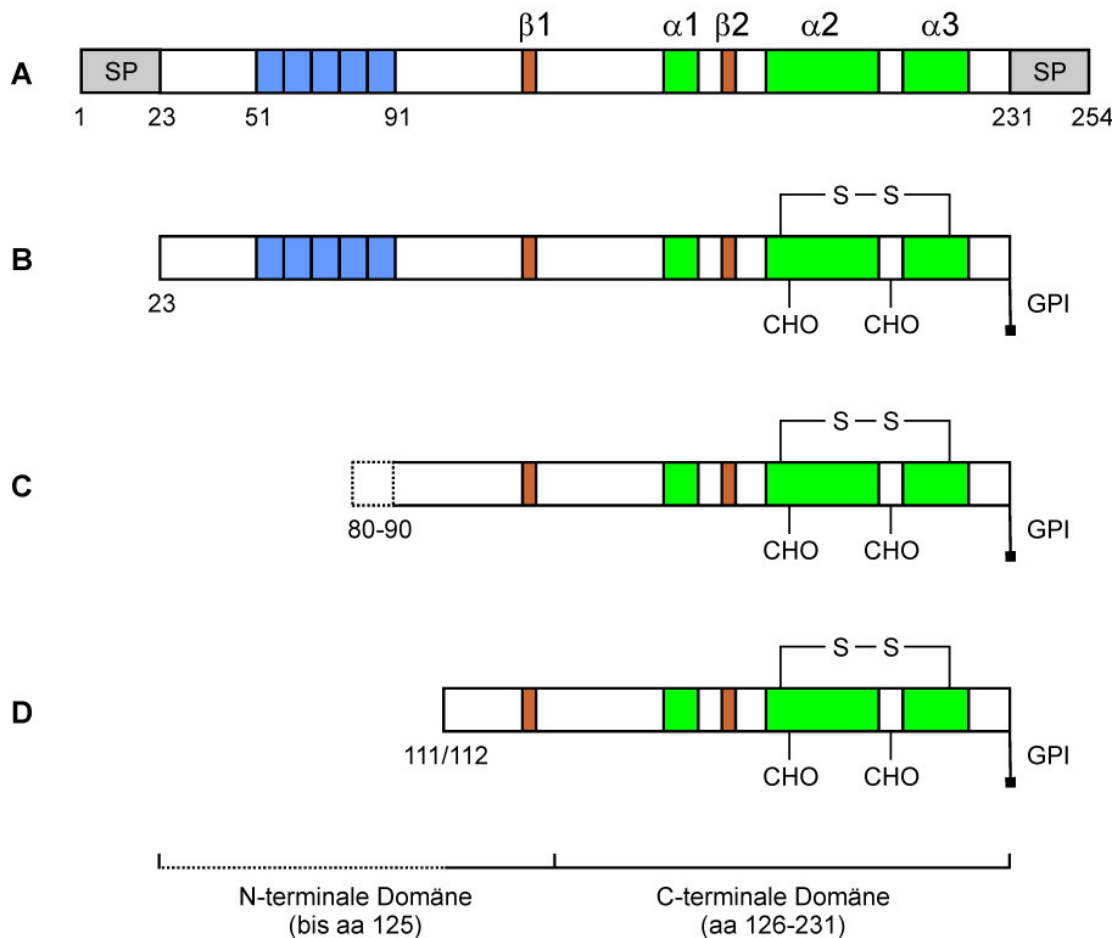
Die Struktur zellulärer Prionproteine unterschiedlicher Säugetier-Spezies, die durch NMR (Nuclear Magnetic Resonance)-Spektroskopie unter Nutzung rekombinanten Proteinmaterials aufgeklärt werden konnte [24-28] ist nahezu identisch. Während der flexible Aminoterminus (aa 23-125 des murinen PrP<sup>c</sup>) keine distinkte Tertiärstruktur aufweist, ist der C-terminale Bereich als globuläre Domäne organisiert, die aus drei  $\alpha$ -Helices und einem kurzen zweisträngigen, antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt besteht. Innerhalb des unstrukturierten N-Terminus finden sich fünf Wiederholungen eines Prolin- und Glycin-reichen Sequenzmotivs von 8 Aminosäuren Länge („Octarepeats“), dem Funktionen bei der PrP-vermittelten Chelatierung von Kupfer-Ionen zugeschrieben werden.

Membranständiges Prionprotein durchläuft einen zyklischen Prozess aus Internalisierung in endozytotische Kompartimente und Rücktransport des intakten oder eines durch proteolytische Prozessierung entstehenden aminoterminal deletierten PrP<sup>c</sup> auf die Zelloberfläche [29]. Während in einigen Veröffentlichungen ein rezeptorunabhängiger Internalisierungs-Mechanismus über caveoläre Strukturen postuliert wird [30, 31], konnten auch Hinweise auf eine rezeptorvermittelte Endozytose von PrP<sup>c</sup> über „Clathrin-coated pits“ [32] gefunden werden.

Für eine effiziente Internalisierung von zellulärem PrP ist das Vorhandensein des kompletten Aminoterminus des Proteins erforderlich [33] der eventuell über Bindung an den postulierten PrP<sup>c</sup>-Rezeptor LRP (Laminin Rezeptor Precursor) die spezifische Endozytose vermittelt [34]. Die (Re-) Internalisierung N-terminal verkürzter PrP-Spezies, deren natürliches Vorkommen *in vivo* durch verschiedene Studien bestätigt wurde, verläuft daher ineffizient. Populationen deletierter Prionproteine umfassen zum einen als C1-Fragmente bezeichnete Moleküle, deren Aminoterminus durch Histidin 111 oder Methionin 112 gebildet wird; weiterhin existiert eine eher heterogene Prionprotein-Population, deren Aminotermini zwischen Position 80 und 90 beginnen [35-37].



**Abbildung 2.2: Struktur des zellulären Prionproteins (PrP<sup>c</sup>).** Rechts: NMR-Struktur des organisierten C-terminalen Bereichs (aa 121-231) von murinem PrP<sup>c</sup> (PDB Accession No. 1XYX) mit Darstellung der Sekundärstrukturen ( $\alpha$ -Helices: grün;  $\beta$ -Faltblatt: braun). Links: Struktur der Aminosäuren 29-231 von Hamster-PrP<sup>c</sup> (Graphik modifiziert nach Donne *et al.*, 1997 [26]). Die Darstellung des Carboxyterminus (aa 90-231) beruht auf PDB Accession No. 1B10; der flexible, unstrukturierte N-Terminus wurde zur Illustration manuell hinzugefügt (Farbkodierung: Flexibilität der Polypeptidkette; Rot>Grün>Blau).



**Abbildung 2.3: Schematische Darstellung posttranslationaler Modifikationen und proteolytischer Prozessierungen von murinem PrP<sup>c</sup>.** Farblich hervorgehoben wurden die Signalpeptide (SP; grau), die Region der Octarepeats (blau) und Areale mit Sekundärstrukturen ( $\alpha$ -Helices 1-3 (grün) :  $\alpha 1$  (aa 144-154),  $\alpha 2$  (aa 175-193),  $\alpha 3$  (aa 200-219);  $\beta$ -Faltblatt (braun):  $\beta 1$  (aa 128-131),  $\beta 2$  (aa 161-164)). A: Präprotein mit N- und C-terminalen Signalpeptiden. B: Reifes PrP<sup>c</sup> (208 aa). Reifes PrP<sup>c</sup> entsteht durch die Abspaltung der terminalen Signalpeptide, die Addition variabler Zuckerstrukturen (CHO) an Asn<sub>180</sub> und Asn<sub>196</sub> und das Anhängen des GPI-Ankers an Ser<sub>231</sub>. Eine Disulfidbrücke (S-S) verknüpft die  $\alpha$ -Helices 2 und 3 (Cys<sub>178</sub>/Cys<sub>213</sub>). C, D: proteolytisch prozessierte und dadurch N-terminal verkürzte PrP-Spezies. Das in (D) dargestellt Fragment beginnt am His<sub>111</sub> oder Met<sub>112</sub> und wird auch als C1-Fragment bezeichnet. In (C) angedeutet ist die heterogene PrP<sup>c</sup>-Population mit Aminotermini, die zwischen aa 80 und aa 90 liegen.

### 2.2.2 Biologie und Funktion

Die physiologische Funktion des zellulären Prionproteins sowie die biologische Relevanz seiner verschiedenen Iso- und Glycoformen konnte bis heute nicht eindeutig aufgeklärt werden. Histologische Studien und quantitative Analysen der PrP-Expression auf mRNA-Ebene zeigten, dass das zelluläre Prionprotein in fast allen Geweben nachgewiesen werden kann, die höchste Expressionsrate sich jedoch in neuronalem Gewebe findet [38].

In weiterführenden Untersuchungen konnte eine bevorzugte Lokalisation von PrP<sup>c</sup> auf der Oberfläche synaptischer Endigungen im ZNS demonstriert werden [39, 40]. Doch obwohl die hauptsächlich neuronale, synaptische Präsenz zusammen mit der hohen Expressionsrate, der starken Konservierung innerhalb der Säugetiere sowie dem Nachweis von PrP-Homologen in verschiedenen Vertebraten-Spezies [41-44] eine evolutionär konservierte, essentielle Funktion für PrP<sup>c</sup> impliziert, verlief die phänotypische Analyse PrP-defizienter Mäuse (PrP<sup>0/0</sup>) unergiebig und mit stark schwanken Ergebnissen. Während in ersten Studien von einer normal verlaufenden Entwicklung der phänotypisch dem Wildtyp gleichenden PrP<sup>0/0</sup>-Mäuse berichtet wurde [45], konnten in späteren Untersuchungen Anzeichen für eine Beeinflussung der zirkadianen Rhythmik [46] oder der synaptischen Funktionen [47] gefunden werden.

Im Zusammenhang mit der Fähigkeit von PrP<sup>c</sup>, über die im flexiblen N-Terminus lokalisierten Octarepeats Kupfer-Ionen zu binden [48, 49], wurde eine Rolle des Proteins im Metabolismus und der Homoöstase von Kupfer postuliert. So fanden Herms *et al.* [39] Hinweise auf die PrP<sup>c</sup>-vermittelte Regulation der synaptischen Aktivität durch Steuerung der präsynaptischen Konzentration von Kupfer, während andere Gruppen eine Superoxid Dismutase (SOD)-ähnliche Aktivität des Prionproteins selbst bzw. eine regulatorische Wirkung von PrP<sup>c</sup> auf intrazelluläre antioxidative Enzyme [50, 51] und eine hieraus abgeleitete Funktion in der zellulären Resistenz gegenüber oxidativem Stress nachwiesen.

Ein wichtiges Instrument zur funktionellen Charakterisierung von PrP war und ist darüber hinaus die Identifikation potentieller Liganden des Prionproteins.

### 2.2.3 PrP-Liganden

Bis heute wurde eine Vielzahl von PrP-bindenden Proteinen beschrieben, und zumindest für einige von ihnen konnte eine *in vivo*-Funktionalität der Interaktion direkt oder indirekt nachgewiesen werden. So konnten Schmitt-Ulms *et al.* [52] eine Bindung von PrP<sup>c</sup> an das neuronale Zelladhäsionsmolekül (neural cell adhesion molecule) NCAM zeigen. Dieses Zelloberflächen-Glycoprotein kommt in drei Isoformen, die sich durch die Länge ihrer carboxyterminalen Domäne unterscheiden, fast ausschließlich in neuronalem Gewebe vor und wirkt dort als Modulator der synaptischen Plastizität [53]. Die Bindung von PrP<sup>c</sup> an NCAM wurde von Santucci *et al.* [54] *in situ* anhand von Kulturen hippocampaler Neuronen bestätigt. In ihrer Studie konnte gezeigt werden, dass die Interaktion des zellulären Prionproteins mit NCAM über die Aktivierung einer p59<sup>lyn</sup>-vermittelten Signalkaskade zur Induktion der NCAM-abhängigen Neurogenese führt.

Weitere Hinweise für die Involvierung von PrP<sup>c</sup> in Prozessen der neuronalen Morphogenese wurden aus der Identifikation von Laminin, Plasminogen und dem Plasminogen-Aktivator

t-PA als PrP-Bindepartner entnommen [55, 56]. Aus dem hauptsächlich in der Leber exprimierten, aber auch in anderen Geweben einschließlich des ZNS vorkommenden Plasminogen [57] entsteht durch die Plasminogen-Aktivator-vermittelte proteolytische Spaltung die Serinprotease Plasmin. Das aktivierte Plasmin kann ein breites Spektrum extrazellulärer Proteine wie z.B. Fibrin, Laminin oder Fibronectin degradieren, so dass dem Plasminogen/Plasminogen-Aktivator System neben der gut untersuchten fibrinolytischen Aktivität ebenfalls Funktionen bei der Gewebeorganisation z.B. im Zuge der Neurogenese zugeordnet werden [58, 59]. Eine Bindung des zellulären Prionproteins an Plasminogen (PLG) und an den PLG-Aktivator t-PA wird über die sogenannten Kringle-Domänen vermittelt [60, 61] und resultiert in einer signifikanten Stimulation der Plasminogen-Aktivierung [62]. Kringle-Domänen repräsentieren autonome strukturelle Module, von denen fünf im Aminoterminus von PLG und zwei im N-terminalen Bereich von t-PA zu finden sind.

Die stark glycosylierten, heterotrimeren Laminine übernehmen als Bestandteil der extrazellulären Matrix auch im zentralen Nervensystem wichtige Funktionen bei der Regulation zellulärer Interaktion [63-65]. Der von Graner *et al.* [56] postulierte Bindungsloкус für PrP<sup>c</sup> umfasst die Aminosäuren 1575-1584 der  $\gamma_1$ -Kette von Laminin, denen eine Rolle bei der Migration von Neuronen und der Neubildung von Neuriten zugeschrieben wird [66, 67]. Tatsächlich konnte durch Experimente mit neuronalen Primärkulturen der Ratte eine Rolle für PrP<sup>c</sup> bei Laminin-induzierten neuronalen Differenzierungsprozessen abgeleitet werden [56, 68].

Als weitere PrP-Liganden wurden der Laminin Rezeptor Precursor LRP, aus dem durch Heterodimerisierung mit einem bislang noch nicht identifizierten Kofaktor [69, 70] der reife 67 kDa Laminin Rezeptor (LR) entsteht, und der Apoptoseregulator Bcl-2 beschrieben. Verschiedene Studien zeigten, dass LRP bzw. LR sowohl von PrP<sup>c</sup> als auch vom fehlgefalteten PrP<sup>sc</sup> als zellulärer Rezeptor genutzt werden kann [34, 71] und dass das Vorhandensein von LR auf Zelloberflächen für die Propagation von PrP<sup>sc</sup> in Kulturen Scrapie-infizierter Neuroblastomzellen [72] und für die Endocytose der infektiösen Isoform durch Enterocyten [73] notwendig ist.

Die Interaktion zellulären Prionproteins mit dem antiapoptotischen Protein Bcl-2 wird mit neuroprotektiven Funktionen von PrP<sup>c</sup> und der neurotoxischen Wirkung von PrP<sup>sc</sup> *in vivo* in Verbindung gebracht [74-76]. Die spezifische Interaktion beider Proteine wurde im ‚Yeast-Two Hybrid‘-Screen gefunden und auf den Carboxyterminus von Bcl-2 eingeeengt [77]. Bounhar *et al.* konnten zeigen, dass PrP neuronale Zellen vor Bax-induzierter Apoptose schützen kann [74] und dass die protektive Wirkung von zellulärem PrP ähnlich dem für das antiapoptotisch wirkende Bcl-2 postulierten Mechanismus auf einer Inhibition der Konformationsänderung des proapoptotischen Proteins Bax beruht.



## **2.3 Transmissibilität spongiformer Enzephalopathien**

Die Einzigartigkeit von Prionen-Erkrankungen besteht in ihrer horizontalen Transmissibilität. Eine direkte Übertragung von Mensch zu Mensch wurde zum einen für die Kuru-Krankheit beschrieben, die innerhalb des Eingeborenenstamms der Fore (Papua Neuguinea) durch rituellen Kannibalismus verbreitet wurde [78]; weiterhin wurde von iatrogenen CJD-Infektionen z.B. durch die Transplantation prionkontaminierter Augenhornhäute, die Nutzung unzureichend sterilisierter neurochirurgischer Instrumente [79, 80] oder durch Bluttransfusionen [81] berichtet.

Aus epidemiologischer Sicht wichtiger ist jedoch die Möglichkeit einer speziesübergreifenden oralen SE-Übertragung durch Verzehr kontaminierter Nahrungsmittel. So wird angenommen, dass die BSE-Epidemie in Großbritannien, die zwischen 1990 und 1995 ihren Höhepunkt erreichte und in deren Verlauf über 200.000 klinisch manifeste BSE-Fälle registriert wurden [82], durch Verfütterung von mit Scrapie-Erregern kontaminiertem Schafs-Tiermehl ausgelöst wurde [83]. Die Weiterführung der Infektionskette von Scrapie-erkrankten Schafen über BSE-infizierte Rinder zum Auftreten der neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit im Menschen (nvCJD) hin wird ebenfalls vermutet [84-86] und auf den Verzehr von prionenbelastetem Rindfleisch zurückgeführt.

Die Effizienz der SE-Transmission in susceptible Individuen ist insgesamt umso höher, je größer die verabreichte Infektionsdosis ist und je direkter das infektiöse Agens in das zentrale Nervensystem gelangt, wobei Inkubationszeit und Krankheitsverlauf mit der Menge an inokuliertem infektiösem Material korrelieren [87-89]. Bei einer speziesübergreifenden Infektion spielt darüber hinaus der Grad der Sequenzhomologie zwischen Wirts-PrP<sup>C</sup> und den aufgenommenen Prionen eine Rolle [90-93]. Diese sogenannte Speziesbarriere kann eine Übertragung entweder komplett verhindern oder so stark beeinträchtigen, dass klinische Manifestationen erst nach einer langen Inkubationsperiode und bei (intrazerebraler) Verabreichung hoher Infektionsdosen auftreten.

### **2.3.1 Orale Transmission und Propagation von PrP<sup>Sc</sup>**

Die orale Aufnahme von Prionen durch Verzehr kontaminierter Nahrungsmittel wie z.B. das Fleisch BSE-kranker Rinder ist für Mensch und Tier der wahrscheinlichste natürliche Übertragungsweg Spongiformer Enzephalopathien. Die Aufklärung des von Prionen genutzten Invasionsmechanismus und des Aufnahmeortes ist daher ebenso Gegenstand der Forschung wie die Entwicklung potentiell protektiver Strategien, die ein Eindringen des Erregers und/oder seine weitere Ausbreitung im Körper verhindern können.

Nach der Ingestion sind alle proteinösen Lebensmittelbestandteile der Degradation durch proteolytische Enzyme des Gastrointestinaltrakts ausgesetzt, die durch ihre unspezifische Wirkungsweise das breite Spektrum fast aller Nahrungsproteine abdecken. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das außergewöhnlich stabile fehlgefaltete PrP<sup>Sc</sup> auch unter den im Verdauungstrakt herrschenden extremen Bedingungen nur einen partiellen Abbau erfährt [12], siehe auch Abschnitt 2.1.2); das infektiöse Kernprotein, das mit den Aminosäuren ~90-231 die globulär organisierte C-terminale Domäne umfasst, bleibt so zum Großteil erhalten.

Über welche Aufnahmeroute das PrP<sup>Sc</sup>-Kernprotein die epitheliale Barriere überwindet und in den Körper gelangt, konnte noch nicht eindeutig aufgeklärt werden. Heppner *et al.* [94] fanden Hinweise auf einen M-Zell-vermittelten Transport von Prionen. M-Zellen finden sich im Follikel-assoziierten Epithel der Peyer'schen Plaques und dienen dem transepithelialen Transport partikulärer Antigene aus dem Darmlumen [95]. Als weitere Möglichkeit kommen intestinale Dendritische Zellen in Frage, die durch die ‚Tight-junctions‘ der Enterozyten hindurch Ausläufer in das Darmlumen entsenden und direkt luminal Antigene sammeln können [96]. Auch eine rezeptorvermittelte Transzytose könnte möglich sein. So wiesen Morel *et al.* eine Laminin Rezeptor-abhängige Aufnahme von PrP<sup>Sc</sup> in Kulturen humaner Enterozyten (Caco-2/TC7) nach [73], während Mishra *et al.* einen indirekten Mechanismus mit Kotransport von PrP<sup>Sc</sup> und Ferritin postulierten [12]. Weiterhin wäre ein parazellulärer Durchtritt durch die Darmwand im Zuge von Mikroverletzungen oder Entzündungszuständen der Darmmukosa denkbar.

Nach Passage der epithelialen Barriere werden die Prionen wahrscheinlich durch Dendritische Zellen oder Makrophagen in das Darm-assoziierte lymphatische Gewebe transportiert, wo die initiale Prion-Replikation stattfindet. Während der asymptomatisch verlaufenden Inkubationsperiode, die mehrere Jahre dauern kann, erfolgt die weitere Dissemination von PrP<sup>Sc</sup> über das Lymphoreticuläre System und das Periphere Nervensystem [97-99]. Translokation in das Zentrale Nervensystem und weitere PrP<sup>Sc</sup>-Akkumulation im Hirngewebe führt schließlich zur terminalen, progressiv verlaufenden Phase der klinisch manifesten Erkrankung, die histopathologisch durch die charakteristische spongiforme Degeneration und die Ablagerung PrP<sup>Sc</sup>-haltiger Plaques im ZNS gekennzeichnet ist.

## 2.4 Prävention der oralen SE-Transmission

Bis heute steht weder ein Heilmittel für durch Prionen hervorgerufene Erkrankungen zur Verfügung noch ein valides Nachweissystem zur Früh- bzw. *ante mortem*-Diagnose einer SE. Gesetzliche Restriktionen wie das Fütterungsverbot für Tiermehl, das 1988 in Großbritannien für Rindermischfutter und im Jahre 2001 EU-weit für Tierfutter im Allgemeinen beschlossen wurde, erfordern das Vorhandensein umfangreicher Kontrollinstrumente und können im Zeitalter des weltweiten Handels im besten Falle lokal eine Wirkung zeigen. Die prophylaktische Untersuchung von Schlachttieren ist kostenintensiv und ebenfalls nur lokal durchsetzbar; auch kann eine sichere Diagnose aufgrund der mangelnden Sensitivität der Nachweissysteme nur in fortgeschrittenem Krankheitsstadium erfolgen. Diese Tatsachen, die noch immer lückenhafte Kenntnis über mögliche Infektionsquellen bzw. das eventuelle Vorhandensein tierischer Reservoirs und die langen Inkubationszeiten der Prionen-Erkrankungen, die auch für Menschen einen SE-Trägerstatus denkbar erscheinen lassen [100-103], erfordern die Entwicklung prophylaktischer Maßnahmen gegenüber einer möglichen oralen Transmission von SE-Erregern.

### 2.4.1 Immunprophylaxe gegen ein Selbst-Antigen?

Die erste Wahl zur Verhinderung einer bakteriellen, viralen oder fungalen Infektion stellt normalerweise die aktive Immunisierung dar, die im Idealfall und bei korrekter Grund- und Aufbauimmunisierung eine mehrjährige bis lebenslange Immunität vermittelt.

Spongiforme Enzephalopathien jedoch sind unter den Infektionskrankheiten dahingehend einzigartig, als das infektiöse Agens keinen körperfremden Erreger bzw. kein Fremdprotein darstellt und daher weder vom angeborenen noch vom adaptiven Immunsystem als potentiell gefährlich erkannt werden kann. Allein die veränderte Tertiärstruktur scheint für die spezifische Erkennung von PrP<sup>sc</sup> nicht ausreichend zu sein, so dass weder während der Inkubationsperiode noch in der klinischen Phase einer SE eine inflammatorische oder immunologische Reaktion beobachtet werden kann [104, 105]. In PrP-defizienten PrP<sup>0/0</sup>-Mäusen ist der Mechanismus der Autotoleranz nicht wirksam, und folgerichtig konnte in diesen Mäusen nach Immunisierung eine starke PrP-spezifische Immunantwort nachgewiesen werden [106, 107], wobei die im Zuge der polyklonalen Antwort erzeugten Antikörper-Spezies in den meisten Fällen sowohl das zelluläre Prionprotein als auch PrP<sup>sc</sup> erkannten. Weitere experimentelle Vakzinierungen konnten zwar zeigen, dass durch die Anwendung rigider Immunisierungsprotokolle und den Einsatz starker Adjuvantien auch in Wildtyp-Mäusen die (niedrigtitrige) Produktion PrP-spezifischer Antikörper induziert werden kann [108-110]. In Challenge-Experimenten mit systemisch immunisierten Tieren konnte

jedoch keine Schutzwirkung, sondern im besten Fall eine Verlängerung der Inkubationsphase bzw. der mittleren Überlebenszeit nachgewiesen werden [111-113].

Eine Verbesserung der präventiven Wirkung experimenteller PrP-Impfstoffe konnte durch mukosale Vakzinierungen erreicht werden. Im Gegensatz zur systemischen Immunisierung wird hierbei das Antigen oral oder nasal appliziert und dadurch direkt über die Mukosen aufgenommen, wobei neben der Produktion von Immunglobulinen der Klasse G (systemische IgG) die Herstellung PrP-spezifischer Immunglobuline der Klasse A (IgA) induziert wird. Sekretorische IgA (sIgA) werden in das Darmlumen sezerniert, binden dort ihr spezifisches Antigen und können seine Immobilisierung im intestinalen Mukus bewirken [114-116]. Goni *et al.* konnten nach intragastraler Gabe einer DNA-Vakzine bei 30 % der immunisierten Versuchstiere einen Schutz vor oraler SE-Infektion nachweisen, während die übrigen 70 % der Tiere eine Verlangsamung des Krankheitsverlaufs zeigten, der mit der Höhe des sIgA-Titers korrelierte [117]. Dies deutet auf einen wichtigen Einfluss sekretorischer Immunglobulin A-Moleküle hin, der wahrscheinlich auf das Potential von sIgA zurückzuführen ist, durch Verhinderung der Antigen-Aufnahme eine sogenannte sterilisierende Immunität zu induzieren. Ein vollständiger Schutz wäre demnach durch eine permanente Sekretion genügend hoher Mengen an PrP-spezifischem sIgA zu erreichen [118].

Eine stabile und langfristige Immunantwort gegen das tolerogene PrP ist jedoch wenn überhaupt nur durch massive Intervention induzierbar und beinhaltet stets auch die Gefahr einer unkontrollierbaren Autoimmunreaktion gegen das körpereigene Prionprotein. Ein immunprophylaktischer Ansatz zur Verhinderung der Ausbreitung Spongiformer Enzephalopathien erscheint daher wenig erfolgversprechend.

#### **2.4.2 SE-Prophylaxe durch ‚Intestinale Prion-Dekontamination‘?**

Unter der Annahme, dass zum einen eine prophylaktische Immunisierung gegen das Selbst-Antigen PrP nicht möglich oder ausreichend ist und zum anderen die Propagation von eingedrungenem PrP<sup>Sc</sup> aufgrund fehlender körpereigener Verteidigungsmechanismen nicht mehr aufgehalten werden kann, erscheint die Suche nach alternativen Methoden, die auf eine passive Weise und ohne Einbeziehung des Wirts-Immunsystems ein Aufnahme von Prionen im Gastrointestinaltrakt verhindern können, sinnvoll. Auch der protektive Effekt von PrP-spezifischem sekretorischem IgA (s. Abschnitt 2.4.1) deutet darauf hin, dass ein Schutz vor Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien am ehesten durch Mechanismen erreicht werden könnte, die bereits mit der Invasion des Erregers als erstem Schritt der Infektionskaskade interferieren [118].

### 2.4.2.1 Klassische Enterosorbentien

Eine schon seit langer Zeit erfolgreich verwendete Methode zur Adsorption und Elimination intestinaler Noxen ist die Verwendung von Enterosorbentien. Die klassische Form dieser enteralen Bindemittel sind Kohletabletten, die bei akuten gastrointestinalen Intoxikationen oder Infektionen oral verabreicht werden; durch unspezifische Physisorption wird die Aufnahme der schädigenden oder pathogenen Stoffe in den Körper verhindert und ihre Ausscheidung aus dem Intestinaltrakt in gebundener Form bewirkt. Man bezeichnet diesen Vorgang, der ohne unerwünschte Nebenwirkungen verläuft, auch als ‚Gastrointestinale Dekontamination‘ [119, 120].

In neuerer Zeit wurde das Konzept der Enterosorption durch die Entwicklung von spezifisch wirkenden Sorbentien weiterentwickelt. Die Substanz HCSAS (hydratisiertes Natrium-Calcium-Aluminosilicat) beispielsweise wird weltweit in großem Maßstab in der Tierfütterung zur intestinalen Adsorption von Aflatoxinen genutzt, wobei die Gabe hierbei prophylaktisch als Additiv zu potentiell kontaminierten Futtermitteln erfolgt [121-123]. Da akute und subakute lebensmittelbedingte Aflatoxikosen insbesondere in Entwicklungsländern auch eine Relevanz für den Menschen besitzen und durch die hochpotente karzinogene Wirkung des fungalen Aflatoxins B<sub>1</sub> schwere Spätfolgen haben können, wird nun auch der präventive Einsatz des Aflatoxin-Enterosorbens im Humanbereich diskutiert [124].

Naheliegender für das Design spezifischer Sorptionsmittel ist darüber hinaus das Ausnutzen von Rezeptor-Ligand-Interaktionen. So wurden von der Firma Synsorb Biotech (Calgary, Alberta) oral zu verabreichende Adsorbentien hergestellt, die über Kohlenhydrat-basierte Surrogatrezeptoren spezifisch bakterielle Toxine wie das von *Shigella dysenteriae* bzw. enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) produzierte Shiga Toxin [125] oder das *Clostridium difficile* Toxin A [126] binden und neutralisieren können.

Der Nachteil aller bisher vorgestellten, auf inerten Materialien basierenden Enterosorbentien beruht jedoch auf der Tatsache, dass sie anders als z.B. das bei einer Immunisierung induzierte sekretorische IgA keiner Regulation durch körpereigene bzw. biologische Mechanismen unterliegen. Ohne die Fähigkeit zur Selbst-Regeneration oder -Replikation muss das Material entweder wie im Falle des HCSAS-Sorbens permanent prophylaktisch eingenommen werden, oder aber wie die Kohletablette unmittelbar nach der Aufnahme des schädigenden Stoffes gegeben werden. Bei intestinalen Intoxikationen liegt das Zeitfenster für die Gabe von Aktivkohle-Tabletten bei maximal einer Stunde [120], so dass das schnelle Bemerkens der intestinalen Kontamination eine Grundvoraussetzung für die Möglichkeit einer therapeutischen Intervention mit Sorptionsmitteln ist. Da Prionen jedoch bei ihrer Aufnahme keinerlei Symptomatik verursachen und ihre Präsenz daher nicht wahrgenommen würde, ist ein Einsatz Prion-spezifischer Adsorbentien nur prophylaktisch sinnvoll.

### 2.4.2.2 Selbstreplizierende Enterosorbenzien

Die präventive Einnahme von Prion-spezifischen Enterosorbenzien mit der Nahrung wäre aufwendig, kostspielig und flächendeckend schwer durchsetzbar. Durch die Verwendung selbstreplizierender kommensaler Darmbakterien als Träger spezifischer Pathogen-Rezeptoren hingegen könnte das Problem der fortwährenden oralen Verabreichung von Sorptionsmitteln umgangen und eine ständige ‚Bioverfügbarkeit‘ gewährleistet werden. Als in dieser Hinsicht wegbereitend könnte die Studie von Paton *et al.* angesehen werden: durch ‚probiotische‘ Gaben eines rekombinanten Bakteriums, das ein Shiga Toxin-Rezeptorimitat auf seiner Oberfläche exponierte, konnte ein vollständiger Schutz gegenüber einer in der Kontrollgruppe zu 100% tödlich verlaufenden Infektion mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli* erreicht werden [127].

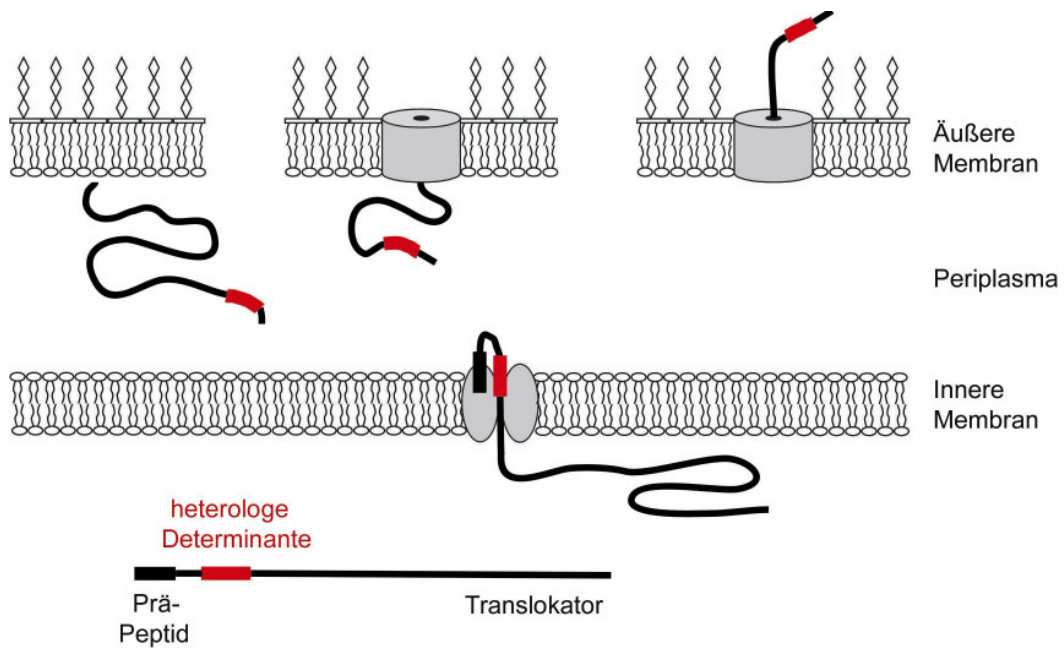
Zwar wird die gentechnische Veränderung kommensaler Bakterien, vor allem bei einer beabsichtigten Anwendung im Humanbereich, kontrovers diskutiert. Hierbei wird auf der einen Seite das potentielle Gefährdungspotential für den Wirt, auf der anderen Seite die möglichen Konsequenzen einer Ausbreitung der Bakterien und einer Weitergabe des Transgens an andere Bakterienspezies hervorgehoben. Bei adäquater Wahl eines apathogenen, nicht-invasiven Kommensalen und Einführung spezieller Schutzmechanismen, die die Lebensfähigkeit eines Transgen-tragenden Bakteriums auf das intestinale Milieu beschränken, ist eine Anwendung im Menschen jedoch nicht utopisch. So wurden zur nebenwirkungsfreien, permanenten Therapie von Morbus Crohn, einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung, gentechnisch veränderte IL-10 sezernierende Bakterien der Spezies *Lactococcus lactis* entwickelt. Ein therapeutischer Effekt wurde sowohl im Mausmodell [128] als auch im Rahmen einer klinische Studie im Menschen nachgewiesen [129].

Das von Paton *et al.* [127] genutzte System zur Umwandlung von *E. coli*-Zellen in bakterielle Enterosorbenzien basierte auf heterologer Substitution spezifischer Glycosyltransferasen, die eine Modifikation des normalen *E.coli* Lipopolysaccharids zu dem Kohlenhydrat-basierten Toxinrezeptor bewirkten. Es existieren jedoch auch weniger komplexe und nicht auf die Präsentation von Zuckerstrukturen limitierte Systeme, die für den bakteriellen Display heterologer, proteinogener Determinanten genutzt werden können. Vielversprechende Kandidaten für diesen Verwendungszweck stellen die bakteriellen Autotransporter dar: Mitglieder dieser Proteinfamilie bewirken ihren eigenen Transport auf die Oberfläche gramnegativer Bakterien und sind hierfür nicht auf die Mithilfe akzessorischer Proteine angewiesen [130, 131]. Für die Autotransporter-vermittelte Exposition spezifischer Pathogen-Liganden könnte dadurch auf ein breites Spektrum potentieller Wirtsbakterien mit Prä-Adaption an unterschiedliche Habitate im Intestinum von Wiederkäuern, Pflanzen- und Fleischfressern zurückgegriffen werden.

## 2.5 Bakterieller Display proteinöser Determinanten durch Autotransporter

Bis heute wurde eine große Anzahl bakterieller Autotransporter identifiziert. Einige von ihnen wie z.B. die IgA<sub>1</sub>-Protease aus *Neisseria gonorrhoeae* [132], MisL (protein of membrane insertion and secretion) aus *Salmonella enterica* [133], Ag43 (Antigen 43) aus *E. coli* [134] und AIDA (Adhesin involved in diffuse adherence) aus *E. coli* [135, 136] wurden nach ihrer Isolierung modifiziert und konnten erfolgreich für den heterologen Display proteinöser Determinanten auf den Oberflächen gramnegativer Bakterien wie *E. coli* oder *S. enterica* verwendet werden.

Zu den am besten charakterisierten Autotransporter-Systemen gehört der AIDA Autotransporter, der aus dem enteropathogenen *E. coli* Stamm 2787 (O126:H27) als die diffuse Adhäsion an HeLa-Zellen vermittelnder Virulenzfaktor isoliert wurde [137]. Wie alle Autotransporter wird das Protein als Vorläuferprotein mit einer aminoterminalen Signalsequenz synthetisiert, die, wahrscheinlich über einen sec-abhängigen Mechanismus, den Transport durch die innere bakterielle Membran in das Periplasma vermittelt. Nach Abspaltung des Signalpeptids inseriert die carboxyterminale  $\beta$ - (Translokator-) Domäne in einer  $\beta$ -barrel ähnlichen Konformation in die äußere Membran und bildet dabei eine zentrale Pore, durch die dann die N-terminale  $\alpha$ - (Passenger-) Domäne auf die Oberfläche des Bakteriums transportiert wird [138]. Beim nativen AIDA repräsentiert die translozierte  $\alpha$ -Domäne ein bakterielles Adhäsins; dieses wird durch eine endogene Protease vom carboxyterminalen Translokator abgespalten, bleibt jedoch über nichtkovalente Wechselwirkungen mit der äußeren Membran assoziiert [139]. Im Zuge einer Modifikation des Proteins für die Oberflächenexposition heterologer (Poly-) Peptide wurden unterschiedliche AIDA-Konstrukte entwickelt. Meist wurde hierbei der größte Teil der für die Passenger-Domäne kodierenden DNA-Sequenz deletiert und durch die kodierende Sequenz der zu exportierenden Domäne ersetzt. Die Passenger-Domäne wurde dabei entweder wie im nativen AIDA im Anschluss an den Export abgespalten, was zur Sekretion des heterologen Peptids führte. Durch das Einführen einer Mutation im Bereich der endogenen Protease-Schnittstelle wurden jedoch auch AIDA-Konstrukte hergestellt, deren  $\alpha$ -Domäne kovalent verknüpft auf der äußeren Membran des Bakteriums verblieb. Der modifizierte, plasmidkodierte AIDA Autotransporter konnte konstitutiv in *E. coli* und *S. enterica* exprimiert werden. Sowohl die Membranintegration der Translokator-domäne als auch die Oberflächenexposition der in permissive Loci der Passenger-Domäne eingefügten Aminosäure-Sequenzmotive konnte dabei bestätigt werden [135, 136, 140-143].



**Abbildung 2.4: Oberflächenexposition heterologer Determinanten in gramnegativen Bakterien durch den modifizierten AIDA Autotransporter.** Im Anschluss an die Synthese des Präproteins im Cytoplasma erfolgt der Transport durch die innere Membran und die Insertion des carboxyterminalen Translokators in die äußere Membran. Die aminoterminalen Passenger-Domäne, die die das eingefügte heterologe (Poly-) Peptid enthält, wird auf die bakterielle Oberfläche transloziert und dort exponiert.



## 2.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung PrP-bindender Bakterien, die als potentielle selbstreplizierende Enterosorbentien auf nicht-immunologischer Basis einen passiven Schutz vor der oralen Transmission von Prionen bieten können. Hierfür sollen proteinöse PrP-bindende Determinanten im *Escherichia coli*-Modellsystem heterolog exprimiert und oberflächenassoziiert präsentiert werden.

Aufgrund seines einfachen und modularen Aufbaus, der Möglichkeit zur Insertion heterologer (Poly-) Peptide und des breiten Wirtsspektrums wurde der modifizierte AIDA Autotransporter als geeigneter Kandidat für die Translokation und Präsentation der PrP-bindenden Domäne ausgewählt. Da eine stabile Expression und ein effektiver Export der inserierten Domäne im AIDA-System durch umfangreiche Tertiärstrukturen behindert werden kann, befasst sich der erste Teil der Arbeit mit der Suche nach peptidischen Liganden des Prionproteins. In diesem Kontext sollten lineare, PrP-affine Sequenzmotive putativer Interaktionspartner des Prionproteins kartiert werden. Die kodierenden Sequenzen identifizierter peptidischer PrP-Binder und ebenso die von potentiell PrP-bindenden polypeptidischen Domänen sollten anschließend in permissive Loci des AIDA Autotransporters inseriert werden. Im Anschluss an die Verifizierung der Membranintegration des Translokators und der Oberflächenexposition des heterologen Inserts sollten die modifizierten Bakterien auf ihre PrP-adsorptiven Eigenschaften hin untersucht und die Stabilität der bakteriellen Konstrukte bzw. der Prionprotein-Liganden im intestinalen Milieu *in vitro* evaluiert werden.

### 3 Materialien

Eine Angabe des Staates für den Firmensitz erfolgt nur bei nicht in Deutschland ansässigen Firmen.

#### 3.1 Spezielle Geräte und Apparaturen

Bezeichnung	Hersteller
AutoSpot Pipettierroboter ASP 222	Intavis (Köln)
ChemiDoc 2000 System	Bio-Rad Laboratories (München)
Dot Blotter SRC 96D Minifold I	Schleicher&Schuell (Dassel)
ELISA-Washer Columbus Pro	Tecan (Crailsheim)
ELISA-Reader Versa Max	Molecular Devices (Ismaning)
FACSCalibur Durchflussscytometer	BD Biosciences (Heidelberg)
French Pressure Cell Press SLM Aminco	SLM instruments (Urbana, IL, USA)
Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences (Bad Homburg)
Spektrometer MBA 2000	PerkinElmer (Rodgau-Jügesheim)
Ultrazentrifuge L7-65, Rotor SW-40-Ti	Beckmann-Coulter (Krefeld)

#### 3.2 Chemikalien

##### 3.2.1 Lösungsmittel und Chemikalien für die Peptidsynthese

Bezeichnung	Hersteller
Dichlormethan	Merck
Diisopropylcarbodiimid (DICD)	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie
N,N'-Dimethylformamid (DMF)	LGC Promochem (Wesel)
Essigsäureanhydrid	Merck
N-Hydroxybenzotriazol (HOBT)	Dojindo Laboratories (Kumamoto, Japan)
1-Methyl-2-pyrrolidon	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie
N-Methylimidazol (Melm)	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie
Mischbett-Ionenaustauscher AG 501-X8 (D)	Bio-Rad Laboratories
Molekularsieb, 8-12 mesh Kugeln, Porengröße 4 Å	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie
Phosphorpentoxid	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie
Piperidin	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie
Silica Gel Blau (Blaugel)	Roth
Trifluoressigsäure (TFA)	Acros Organics (Geel, Belgien)
Triisobutylsilan (TIBS)	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie

### 3.2.2 Allgemeine Chemikalien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Allgemeine Laborchemikalien in p.a. Qualität	Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe)
Acrylamid 4K Lösung (Mix 29:1)	AppliChem (Darmstadt)
AEBSF (4-(2-Aminoethyl)benzol- sulfonylfluorid x HCl)	AppliChem
Agarose NEEO, Ultra Qualität	Roth
Ampicillin Natriumsalz	Roth
Aprotinin	AppliChem
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Sigma-Aldrich Chemie
Bromphenolblau	Merck
Cholsäure, Natriumsalz	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie
Coomassie Brilliant Blue R250	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie
Desoxynukleotid Lösung (Mix: 10 µM je dNTP)	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
Leupeptin Hemisulfat	AppliChem
N,N'-Dimethylacetamid	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie
DTT (1,4-Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich Chemie
EDTA (di-Na-Ethylendiamintetraacetat)	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie
Ethidiumbromid-Lösung 1 %	Roth
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	Roth
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich Chemie
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Sigma-Aldrich Chemie
TBABH (Tetrabutylammoniumborhydrid)	Fluka/Sigma-Aldrich Chemie
TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)	Sigma-Aldrich Chemie
Tween-20	Sigma-Aldrich Chemie

### 3.2.3 Fluoreszenzfarbstoffe (NHS-Ester)

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Alexa Fluor 680 NHS Ester	Invitrogen (Karlsruhe)
5-/6-Carboxyfluorescein NHS Ester	EMP Biotech (Berlin)

### 3.2.4 Bausteine für die Peptidsynthese

Alle für die Peptidsynthese verwendeten Aminosäurederivate und sonstige Synthesebausteine waren wasserfrei und von bester erhältlicher Qualität.

Derivat	Baustein	Hersteller
Alanin (Fmoc-Ala-OH)		Novabiochem/Merck Biosciences (Schwalbach/Ts.)
$\beta$ -Alanin (Fmoc- $\beta$ -Ala-Opfp)		Bachem (Weil am Rhein)
Aminoundecansäure (Fmoc-11-Aun-OH)		Peptides International (Louisville, KY, USA)
Biocytin (Fmoc-Lys (Biotin)-OH)		Advanced Chemtech (Louisville, KY, USA)
Arginin (Fmoc-Arg (Pbf)-OH)		Novabiochem
Asparagin (Fmoc-Asn (Trt)-OH)		Novabiochem
Asparaginsäure (Fmoc-Asp (OtBu)-OH)		Novabiochem
Carboxyglutaminsäure (Fmoc-Gla (OtBu) <sub>2</sub> -OH)		Iris Biotech (Marktrechwitz)
5(6)-Carboxymethylrhodamin		Fluka/Sigma-Aldrich Chemie
Cystein (Fmoc-Cys (Acm)-OH)		Novabiochem
11-(2-(2,4-Dichlorphenoxy)acetylamino)- undecansäure		Dr. Steffen Bade (Forschungszentrum Borstel)
Glutamin (Fmoc-Gln (Trt)-OH)		Novabiochem
Glutaminsäure (Fmoc-Glu (OtBu)-OH)		Novabiochem
Glutaminsäure-Biotin (Fmoc-Glu(biot-PEG)-OH)		Novabiochem
Glycin (Fmoc-Gly-OH)		Novabiochem
Histidin (Fmoc-His (Trt)-OH)		Novabiochem
Isoleucin (Fmoc-Ile-OH)		Novabiochem
Leucin (Fmoc-Leu-OH)		Novabiochem
Lysin (Boc-Lys (Fmoc)-OH, Fmoc-Lys (Boc)-OH)		Novabiochem
Methionin (Fmoc-Met-OH)		Novabiochem
Phenylalanin (Fmoc-Phe-OH)		Novabiochem
Polyethylenglycol (Fmoc-amino PEG diglycolic acid (n = 2))		Novabiochem
Prolin (Fmoc-Pro-OH)		Novabiochem
Serin (Fmoc-Ser (tBu)-OH)		Novabiochem
Threonin (Fmoc-Thr (tBu)-OH)		Novabiochem
Tryptophan (Fmoc-Trp (Boc)-OH)		Novabiochem
Tyrosin (Fmoc-Tyr (tBu)-OH)		Novabiochem
Valin (Fmoc-Val-OH)		Novabiochem

### 3.3 Spezielle Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Amberlite MB-6113 Ionenaustauscher	Merck (Darmstadt)
Dialyseschlauch Spektra/Por	Spektrum (Rancho Dominguez, USA)
Küvetten UVette	Eppendorf (Hamburg)
<u>Mikrotiterplatten, 96-Loch</u>	Corning (Wiesbaden)
hochbindend, Polystyrol, Flachboden	
unbehandelt, Polypropylen, Rundboden	
Nitrocellulose Membran Protran, 0,2 µm	Whatman (Dassel)
<u>Zellkultur-Zubehör</u>	
EasyFlask Nunclon Δ, 25 cm <sup>2</sup>	Nunc (Wiesbaden)
6-Loch Platte Nunclon Δ	Nunc

### 3.4 Weitere spezielle Materialien

#### 3.4.1 Nachweis- und Testsysteme, Kits

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Bugbuster Protein Extraction Reagent	Merck Biosciences/Novagen (Darmstadt)
Micro BCA Assay	Pierce Biotechnology (Bonn)
Ni-NTA-Agarose Säulenmaterial	Qiagen (Hilden)
Nucleospin Extract	Macherey-Nagel (Düren)
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
Super Signal West Pico Chemilum. Substrat	Pierce Biotechnology

#### 3.4.2 Standards, Molekulargewichtsmarker, cDNA

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Albumin Standard 2,0 mg/ml	Pierce Biotechnology
murine cDNA	PD. Dr. Norbert Reiling
(revers transkribiert aus Leber-RNA)	(Forschungszentrum Borstel)
Precision Plus All Blue Protein Standard	Bio-Rad Laboratories
SigmaMarker Wide Range Standard	Sigma-Aldrich Chemie
2-Log DNA Ladder	New England Biolabs (Frankfurt am Main)

### 3.5 Enzyme und Proteine

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs
Benzonase Nuclease	Merck Biosciences/Novagen (Darmstadt)
BirA Biotin-Protein Ligase	Avidity (Denver, CO, USA)
Biotinyliertes BSA (Bio-BSA) (biotinyliert mit 5x molarem Überschuss an Sulfosuccinimidyl-6-(Biotinamido)Hexanoat)	Dr. Verena Olivier (Forschungszentrum Borstel)
BSA, Fraktion V (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich Chemie
BSA10	British BioCell International (Cardiff, UK)
Casein, Hammarsten Qualität	BDH Laboratory Supplies (Poole, UK)
<b><u>DNA-Polymerasen</u></b>	
AccuSure DNA Polymerase	Bioline (Luckenwalde)
Taq DNA Polymerase	New England Biolabs
Lysozym (aus Hühnereiweiß)	Roth
<b><u>Proteasen</u></b>	
Trypsin (aus Rinderpankreas)	Sigma-Aldrich Chemie
Chymotrypsin (aus Rinderpankreas)	
<b><u>Restriktionsendonukleasen</u></b>	
BamH I, Kpn I, Nde I, Xba I, Xma I	New England Biolabs
T4 DNA Ligase	New England Biolabs

### 3.6 Medien und Zusätze für die Zellkultur

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller/Herkunft</b>
Foetal Bovine Serum „Gold“ Category „EU“	PAA Laboratories GmbH (Pasching)
DMEM high glucose (4,5 g/l) ohne L-Glutamin mit Natriumpyruvat	PAA Laboratories GmbH
Trypsin-EDTA (10 x)	PAA Laboratories GmbH
Dulbecco's PBS (1 x) ohne Ca & Mg	PAA Laboratories GmbH
Penicillin/Streptomycin (100 x)	PAA Laboratories GmbH
Transferrin human	Sigma-Aldrich

### 3.7 Antikörper und Streptavidin

#### 3.7.1 Primärantikörper

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller/Herkunft</b>
Kaninchen anti-6xHIS Epitope Tag polyklonaler/affinitätsgereinigter IgG IRDye 800-markiert	Rockland Immunochemicals (Gilbertsville, PA, USA)
Kaninchen anti-AIDA C-Terminus polyklonales Serum gegen ein denaturiertes Fusionsprotein (aa 1017-1286 des AIDA Prä-Pro-Proteins) unmarkiert	Prof. Dr. M. Alexander Schmidt, Institut für Infektiologie (ZMBE), Universität Münster Referenz: Suhr <i>et al.</i> , 1996 [139]
Maus anti-human PrP <sup>c</sup> , Klon 6H4 monoklonaler Maus-IgG (kreuzreaktiv mit murinem PrP <sup>c</sup> ) unmarkiert	Prionics (Schlieren, CH)
Maus anti-Flag M2 monoklonaler Maus-IgG unmarkiert	Stratagene (La Jolla, CA, USA)
Maus anti-2,4-D (E2/G2), Aszites monoklonaler Maus-IgG unmarkiert	Dr. Milan Fránek (Veterinary Research Institute, Brno, CZ)

#### 3.7.2 Sekundärantikörper und Streptavidin

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller/Herkunft</b>
Ziege anti-Maus IgG (H+L) Alexa Fluor 680-markiert	Invitrogen
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L) IRDye 800-markiert	Rockland Immunochemicals
Streptavidin Alexa Fluor 680-markiert	Invitrogen
Streptavidin Meerrettichperoxidase (HRP)-markiert	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)

### 3.8 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) bezogen (Qualität: HPSF, High Purity Salt Free). Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen wurden unterstrichen. Komplementäre Oligonukleotide zur Darstellung der kodierenden Sequenzen von PrP-Ligandenpeptiden sind ebenfalls aufgeführt. Das Design von PCR-Primern erfolgte mit der im Internet frei zugänglichen Software Primer 3 [144].

(F: forward Primer, R: reverse Primer)

Name	Sequenz (5' - 3')	Verwendung
<b>pMK- 3367F</b>	AGGCCTACAGTATCATATGGAG	PCR- und Sequenzierprimer zum Nachweis von Insertionen in pMK90
<b>pMK- 3777R</b>	TCCCAGTATAATTTGACACG	
<b>FLAG-F</b>	CCGGGATTATAAAGATGACGATGACAAAGCGTAC	Darstellung des FLAG-Tags (XmaI, KpnI)
<b>FLAG-R</b>	GCTTTGTCATCGTCATCTTTATAATC	
<b>LRP- F</b>	CCGGGACATTCCGTGCAACAACAAAGGCGCGCATAGCGTG GGCCTGATGTGGTGGATGCTGGCGCGGTAC	Darstellung des LRP-Peptids (XmaI, KpnI)
<b>LRP-R</b>	CGCGCCAGCATCCACCACATCAGGCCACGCTATGCGCGC CTTTGTTGTTGCACGGAATGTC	
<b>NCAM-F</b>	CCGGGAATGAAAAAGCCTGGGCGAAGAAAGCTGGCATT ACCTGGTATGATGCGTAC	Darstellung des NCAM-Peptids (XmaI, KpnI)
<b>NCAM-R</b>	GCATCATACCAGGTAAAATGCCAGCTTTCTTCGCCAGGC TTTTCCATTC	
<b>PLG-F</b>	CCGGTGGTGCTATACCACCGATAGCCAGCTGCGCTGGGAA TATTGCGAAATTCGTAC	Darstellung des PLG-Peptids (XmaI, KpnI)
<b>PLG-R</b>	GGAATTTTCGCAATATTCCCAGCGCAGCTGGCTATCGGTGG TATAGACCA	
<b>mPLG-F</b>	CCGGTGGGCCATATACCACCGATAGCCAGCTGCGCTGGGAA TATGCCGAAATTCGTAC	Darstellung des modifizierten PLG-Peptids (XmaI, KpnI)
<b>mPLG-R</b>	GGAATTTTCGGCATATTCCCAGCGCAGCTGGCTATCGGTGG TATAGGCCCA	
<b>K3-843F</b>	TCCCCCGGGGCCCAACCTACCAATGTCTG	Amplifikation und Klonierung der Kringle-Domäne 3 (K3-843F, K3-1097R) und der Kringle-Domänen 1-3 (K123-261F/-321F, K3-1097R) (XmaI, KpnI)
<b>K3-1097R</b>	CGGGGTACCAGGACTCGCAGGATGGAATCTC	
<b>K123-261F</b>	GATCGACCCGGGTGGCGGAGAACAGCAAGACTTC	
<b>K123-321F</b>	GATCGACCCGGGAGAGAGTGTATCTGTCAGAATG	
<b>PrP-101F</b>	GATCGATCGTACCATATGCCAGCAAACCAAAAACCAAC	Amplifikation und Klonierung von PrP101-231 (NdeI, BamHI)
<b>PrP-230R</b>	TACGTACGTACGGGATCCTTAGCTGGATCTTCTCCCGTCG TAA	



### 3.9 Vektoren

#### Plasmid pET-15b-(PrP90-231)

Das Plasmid pET-15b ist ein 5708 Basenpaare (bp) umfassender Expressionsvektor der Firma Merck Biosciences/Novagen (Darmstadt). Bei Vektoren des pET-Systems steht die über die ‚Multiple Cloning Site‘ eingefügte Insert-DNA unter der Kontrolle des T7 Promotors, so dass eine Transkription und damit die Expression des heterologen Proteins nur in Gegenwart der RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 stattfinden kann. Zur bakteriellen Produktion der Proteine wird das Plasmid daher in *E. coli* Expressionsstämme transformiert, die als  $\lambda$ (DE3)-Lysogene eine chromosomale Kopie des Gens für die T7 RNA Polymerase besitzen. Die Transkription dieses Gens wird vom *lacUV5* Promotor aus initiiert und kann durch Zugabe von IPTG in das Kulturmedium induziert werden. Plasmidtragende Bakterien können über Ampicillin-Resistenz selektiert werden.

Der pET-15b-(PrP90-231) Expressionsvektor wurde uns von Dr. M. Baier (Robert-Koch-Institut, Berlin) zur Verfügung gestellt und enthält die kodierende Sequenz für die Aminosäuren (aa) 90-231 von murinem Prion Protein (PrP, Swiss Prot Accession No. AAH06703).

#### Plasmid pMK90

Das auf dem pBR322-Klonierungsvektor basierende Plasmid pMK90 wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Alexander Schmidt (Institut für Infektiologie (ZMBE), Universität Münster) entwickelt und uns für das vorliegende Projekt zur Verfügung gestellt. pMK90 enthält die kodierende Sequenz des modifizierten AIDA-Autotransporters (AIDA) aus *E. coli*, der für den bakteriellen Display von PrP-Liganden genutzt werden soll. Das exprimierte Protein umfasst die N-terminalen 54 Aminosäuren (aa) des nativen AIDA Präproteins (aa 1-54 von SwissProt Accession No. CAA46156 bzw. die Nukleotide (nt) 1-207 von GenBank Accession No. X65022), wobei die ersten 49 aa die Signalsequenz für den Proteinexport durch die innere bakterielle Membran darstellen. Die sich anschließende artifizielle Aminosäuresequenz von 19 aa Länge repräsentiert auf DNA-Ebene die gentechnisch eingefügte ‚Multiple Cloning Site‘ (MCS). Hierauf folgen die carboxyterminalen aa 793-1286 des AIDA Präproteins (kodiert durch nt 2421-4080), die die eigentliche Translokations-Einheit (AIDA<sup>c</sup>, aa 848-1286) des Autotransporters enthalten. Die C-terminale  $\beta$ 2-Subdomäne (aa 949-1286) von AIDA<sup>c</sup> integriert in die äußere bakterielle Membran. Über die  $\beta$ 1-Subdomäne, den sogenannten Linkerbereich, der die Aminosäuren 847-949 umfasst, wird die aminoternale ‚Passenger-Domäne‘ auf die bakterielle Oberfläche transportiert. Der Hauptteil der exportierten Passenger-Domäne (AIDA I, aa 50-846 des Präproteins) wurde in pMK90 deletiert (Deletion der aa 55-792), so dass Plasmid-tragende Bakterien in

Ermangelung des funktionstüchtigen Adhäsins nicht den Phänotyp einer diffusen Adhärenz an HeLa-Zellen zeigen. Eine weitere Modifikation betrifft die Abspaltbarkeit der exportierten Domäne: in pMK90 wurde durch Mutagenese die Schnittstelle einer endogenen Protease zerstört ( $A_{847} \rightarrow I_{847}$  durch die Substitution GC  $\rightarrow$  AT bei nt 2584/2585 von X65022), so dass der translozierte Aminoterminus kovalent gebunden auf der bakteriellen äußeren Membran verbleibt. Zusammen mit dem für das modifizierte AIDA kodierenden Leseraster wurde eine 5' gelegene DNA-Sequenz in den Vektor ligiert, die 1064 Basenpaare umfaßt und den AIDA-Wildtyp-Promotor enthält (nt 112-1175 von GenBank Accession No. AJ304444). Dieser bewirkt eine konstitutive Expression des Autotransporters im *E. coli*-System.

Der aus pBR322 übernommene Anteil von pMK90 enthält das Gen für Ampicillin-Resistenz ( $Amp^r$ ) als Selektionsmarker und einen *colE1*-Replikationsursprung, der eine autonome Replikation und eine segregative Stabilität des Plasmids bei niedriger Kopienzahl ermöglicht. Die DNA-Sequenz und die deduzierte Aminosäuresequenz des exprimierten modifizierten AIDA-Autotransporters sind im Anhang (Abschnitt 9.1.2) dargestellt. Eine genauere Beschreibung der Herkunft des Inserts und der Klonierungsstrategie, die zur Entwicklung von pMK90 führte, sind der Dissertationsschrift von Dr. Marc Konieczny [145] zu entnehmen.

### 3.10 Bakterienstämme

Bezugsquelle: Stratagene (La Jolla, CA, USA)

#### ***Escherichia coli* C600**

Genotyp: *e14*<sup>-</sup> (*McrA*<sup>-</sup>) *supE44 thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 tonA21*

Der *Escherichia coli* (*E. coli*) C600 Bakterienstamm wurde als Standard-Klonierungsstamm und für die AIDA-vermittelte Expression und Exposition von PrP-Liganden genutzt.

#### ***Escherichia coli* BL21**

Genotyp: *E. coli* B F<sup>-</sup> *dcm ompT hsdS*(*r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>*) *gal*

Der *ompT*-defiziente *E. coli*-Stamm BL21 wurde als Alternativ-Wirt für das Plasmid pMK90 zur AIDA-vermittelten Expression und Exposition von PrP-Liganden genutzt.

#### ***Escherichia coli* BL21(DE3)**

Genotyp : *E.coli* B F<sup>-</sup> *dcm ompT hsdS*(*r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>*) *gal*  $\lambda$ (DE3)

*Escherichia coli* BL21(DE3) wurde als Expressionsstamm für die Produktion von rekombinantem Prionprotein genutzt. Dieser Stamm ist lysogen für den  $\lambda$ -Bakteriophagen DE3 und enthält dadurch das Gen für die T7 RNA Polymerase.

### 3.11 Zell-Linien

#### C2BBe1 (Caco-2<sub>BBe1</sub>)

Bezugsquelle: American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, Va, USA)  
via LGC Promochem (Wesel)

Die C2BBe1 Zell-Linie (ATCC-No. CRL-2102) ist ein Klon der Caco-2 Zell-Linie (ATCC-No. HTB-37), die aus Gewebe eines humanen Dickdarmtumors (Colon-Adenocarcinom) isoliert wurde.

### 3.12 Software

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller/Herkunft</b>
Adobe Photoshop 7	Adobe Systems (San Jose, CA, USA)
AutoSpot Operation Software 3.12	Intavis (Köln)
Cell Qest Pro	BD Biosciences
Cn3D 4.1	NCBI (Bethesda, MD, USA)
CorelDraw 10 Graphics Suite	Corel (Unterschleißheim)
EndNote 7	Thomson ResearchSoft (Carlsbad, CA, USA)
GraphPad Prism 4	GraphPad Software (San Diego, CA, USA)
Image J 1.3	NIH (Bethesda, MD, USA)
Microsoft Office 2004	Microsoft (Red Wood City, OR, USA)
Odyssey Application Software 1.2	LI-COR (Lincoln, NE, USA)
SoftMax Pro 4.7	Molecular Devices (Ismaning)
WinMDI 2.8	Scripps Research Institute (La Jolla, CA, USA)

### 3.13 Häufig verwendete Puffer

#### D-PBS (10x) Dulbecco's Phosphate-buffered saline

80 g	NaCl
11,5 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
2 g	KCl
2 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
ad 1000 ml	A. bidest.

#### D-PBS (1x) 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 136 mM NaCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,3)

100 ml	D-PBS (10x)
ad 1000 ml	A. bidest.

#### L-PBS (1x) "Lite" PBS, 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,0), 10 mM NaCl

0,584 g	NaCl
1,38 g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O
ad 1000 ml	A. bidest.

mit 1 N NaOH auf pH 7,0 eingestellt

#### SIF (10x) Simulierte Intestinalflüssigkeit

57,6 g	NaCl
8,67 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
2,21 g	KCl
2,22 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
ad 1000 ml	A. bidest.

#### SIF (1x) 8 mM Phosphatpuffer (pH 7,2) 4,6 mM K<sup>+</sup>, 111,3 mM Na<sup>+</sup>, 101,5 mM Cl<sup>-</sup>

100 ml	SIF (10x)
ad 1000 ml	A. bidest.

Nach Lockwood und Randall [146] dem Elektrolytgehalt und pH-Wert des humanen Dünndarms angepasst.

#### PI (100x) Proteaseinhibitorlösung

15,4 µM Aprotinin, 1 mM Leupeptin, 20 mM AEBSF-Hydrochlorid

47 mg	AEBSF-Hydrochlorid
7,84 ml	L-PBS
980 µl	0,1 % (w/v) Aprotinin in L-PBS
980 µl	0,5% (w/v) Leupeptin-Hemisulfat in L-PBS

PI wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C für maximal 6 Monate gelagert.

## 4 Methoden

### 4.1 Peptidsynthese

Festphasengebundene Peptidbibliotheken und lösliche Peptide wurden durch Spot-Synthese nach der Methode von Frank [147] hergestellt. Für eine genaue Beschreibung der Vorgehensweisen und Informationen zur (Vor-) Behandlung der verwendeten Reagenzien und Lösungsmittel wird auf die Literatur verwiesen [148].

Mit Hilfe des genutzten semi-automatischen Verfahrens der Spot-Synthese können bis zu 1700 unterschiedliche Peptide auf insgesamt vier Cellulosefiltern in einem für jedes Peptid genau definierten Areal („Spot“) in nanomolaren Mengen bis zu einer Kettenlänge von 25 Aminosäuren parallel synthetisiert werden. Die Peptidsynthese verläuft im Gegensatz zur *in vivo* Proteinbiosynthese von carboxyterminaler in aminoterminaler Richtung, wobei die carboxyterminale Aminosäure über einen Anker mit dem Cellulosefilter verknüpft ist. Die Synthese der Peptidkette erfolgt in einem zyklischen Prozess, bei dem eine Aminosäure nach der anderen unter Bildung einer Carbonsäureamidbindung auf die zuletzt gekuppelte Aminosäure der wachsenden Peptidkette aufgebracht wird. Um unerwünschte Nebenreaktionen zu vermeiden, müssen die funktionellen Gruppen der zu kuppelnden Aminosäuren mit Ausnahme des Carboxylatrestes durch Schutzgruppen blockiert sein. Als Schutzgruppe für die  $\alpha$ -Aminofunktion wird die Fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc)-Gruppe verwendet, die selektiv durch basische Reagenzien abgespalten werden kann, während die Seitenkettenschutzgruppen bis zum Ende der Synthese auf der wachsenden Peptidkette verbleiben. In jedem Zyklus wird zunächst die freie Carboxylatgruppe einer geschützten Aminosäure in eine reaktivere Form („HOBt-Aktivester“) überführt, bevor sie mit dem freien Aminoterminus der wachsenden Peptidkette verknüpft wird. Nicht reagierte Aminogruppen werden durch Acetylierung mit Essigsäureanhydrid abgesättigt („Capping“), um Deletionen in der Peptidsequenz zu vermeiden. Anschließend wird die  $\alpha$ -Aminofunktion der neu aufgetragenen Aminosäure mit Piperidin selektiv entschützt, bevor der Zyklus wieder von neuem beginnt. Nach Kupplung der endständigen, N-terminalen Aminosäure und dem abschließenden sogenannten „End-Capping“ mit Essigsäureanhydrid werden die Seitenkettenschutzgruppen abgespalten. Je nach Art der Verankerung in der Filtermembran bleiben die synthetisierten Peptide entweder am Celluloseträger gebunden oder werden abgespalten und in Lösung gebracht.

Alle Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Mit dem AutoSpot Pipettierroboter ASP 222, der mit den gewünschten Peptidsequenzmotiven programmiert werden kann, wurden die jeweiligen Aminosäurelösungen mit einer Stahlnadel positionsgenau auf die Syntheseareale aufgetragen. Alle anderen Arbeitsschritte wurden manuell durchgeführt.

Die Waschschritte zwischen den einzelnen Synthesesyklen erfolgten in einer Polypropylenschale auf einem Wippschüttler, wobei immer 2 Filter zusammen in einer Schale behandelt wurden. Für eine längerfristige Lagerung der Filter vor Beendigung der Synthese wurden die Membranen nach dem Absättigen unreaktiver Aminogruppen zunächst in DMF und anschließend in Ethanol gewaschen, im Warmluftstrom getrocknet, in Folie eingeschweißt und in Gegenwart von Trockenmittel bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### **4.1.1 Synthese festphasengebundener Peptidbibliotheken**

Für die Synthese von festphasengebundenen Peptidbibliotheken wurde zunächst der gesamte Celluloseträger mit  $\beta$ -Alanin derivatisiert (erster Anker). Zur Definition der Synthese-Areale wurde anschließend durch den Pipettierroboter der zweite  $\beta$ -Alanin Anker ortsaufgelöst aufgebracht. Nach Abschluss der zyklischen Kupplung der Aminosäuren und dem End-Capping wurden die Seitenkettenschutzgruppen abgespalten, die Filter wurden getrocknet, in Folie eingeschweißt und in Gegenwart von Trockenmittel bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die festphasengebundenen Peptide konnten in dieser Form für weitere Experimente eingesetzt werden.

#### **4.1.2 Synthese löslicher Peptide**

Um eine Abspaltung der synthetisierten Peptide vom Celluloseträger zu ermöglichen, wird statt des  $\beta$ -Alanin-Ankers der Festphasenbibliotheken als erster Anker ein Prolin eingesetzt. Als ortsaufgelöst pipettierter zweiter Anker findet ein Lysin-Derivat Verwendung, das an der  $\alpha$ -Aminogruppe eine tertiäre Butyloxycarbonyl (Boc)-Schutzgruppe trägt, die unter den Bedingungen der Peptidsynthese stabil gebunden bleibt. Die erste (carboxyterminale) Aminosäure der Peptikette wird somit über die  $\epsilon$ -Aminofunktion des Ankerlysins gekuppelt. Das Entschützen der Aminosäureseitenketten zum Abschluß der Peptidsynthese, welches unter stark sauren Bedingungen erfolgt, bewirkt gleichzeitig die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe des Ankerlysins. Durch die Erhöhung des pH-Wertes während des Trocknens der Filter kann nun eine Umlagerung des Lysin-Prolin-Ankers zu einem Diketopiperazinderivat stattfinden. Hierdurch werden die Peptide vom Trägermaterial abgespalten.

Auf den getrockneten Filtern wurden die Synthese-Areale mit den nur noch physikalisch adsorbiert vorliegenden Peptiden mit einem Locheisen (3 mm Durchmesser) ausgestanzt und mit einer Pinzette einzeln in ein 2 ml-Mikroreaktionsgefäß gegeben. Die Peptide wurden mit insgesamt 1 ml TEAA-Puffer von der Cellulosemembran eluiert; die gelösten Peptide wurden anschließend in einem Vakuumkonzentrator lyophilisiert.

Die abgespaltenen Peptide wurden soweit nicht anders beschrieben in je 100  $\mu\text{l}$  L-PBS/0,005 % Tween-20 aufgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

#### **TEAA-Puffer** (für 250 ml)

[0,1 M Triethylammoniumacetat, 20 % (v/v) Ethanol in A. bidest.]

3485  $\mu\text{l}$  Triethylamin

50 ml Ethanol

ad 250 ml A. bidest.

mit Essigsäure auf pH 7,0 – 7,5 eingestellt

## **4.2 Allgemeine Proteinchemische Arbeiten**

### **4.2.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen**

Die Konzentration von Proteinen in Lösung wurde mit Hilfe des Micro BCA Assays analysiert. Die Methode beruht auf der Protein-induzierten Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^{1+}$  in alkalischer Lösung (Biuret-Reaktion). Reduziertes Kupfer wird durch die Bildung eines Farbkomplexen mit Bicinchoninsäure (BCA-Assay) nachgewiesen, wobei die photometrisch bestimmbare Farbintensität linear zur Proteinkonzentration ist.

In einer unbehandelten Mikrotiterplatte mit Flachboden wurden Duplikate von Standardverdünnungen (5 bis 37,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  BSA, Albumin Standard 2,0  $\text{mg}/\text{ml}$ ) in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{l}$  A. bidest pro Kavität angefertigt. Von der zu analysierenden Probe wurden in einem Gesamtvolumen von 100  $\mu\text{l}$  unterschiedliche Verdünnungen angefertigt, wobei die Konzentrationen nach Vorabschätzung auf 10-30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  eingestellt wurde. Zu jeder Probe wurden 100  $\mu\text{l}$  einer frisch bereiteten Reaktionslösung des Micro BCA Assays (25 Volumenteile Lösung A, 24 Volumenteile Lösung B und 1 Volumenteil Lösung C) hinzugefügt. Die Mikrotiterplatte wurde 60 min bei  $60^\circ\text{C}$  inkubiert; nach dem Abkühlen auf RT wurde die Absorption bei einer Wellenlänge  $\lambda = 562\text{ nm}$  mit Hilfe des Versa Max ELISA-Readers gemessen. Der Proteingehalt der unbekanntenen Probe wurde aus der BSA-Standardgeraden bestimmt.

### **4.2.2 MALDI-TOF Massenspektrometrie**

Durch MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time-of-Flight Massenspektrometrie) kann das Molekulargewicht eines Proteins mit hoher Genauigkeit bestimmt werden. Bei diesem Verfahren wird der Analyt in eine kristallisierende Matrix eingebettet, durch einen Laserimpuls herausgelöst und ionisiert. Die geladenen

Probenmoleküle werden im Hochvakuum durch ein elektrisches Feld auf einen Detektor hin beschleunigt; die Flugzeit (Time-of-Flight) wird dabei als Parameter ihrer Masse bestimmt.

Je 25 µg Proteinmaterial einer reinen Lösung wurden gegen A. bidest dialysiert und gefriergetrocknet. Nach Aufnehmen in 2,5 µl A. bidest wurde die Probe 1:1 mit der Matrix-Lösung (30 mg Dihydroxybenzoesäure in 200 µl TA; TA: 2 Teile 0,1 % Trifluoressigsäure gemischt mit 1 Teil Acetonitril) gemischt. Die Analysen wurden im linearen und positiven Detektionsmodus von PD. Dr. Buko Lindner (Forschungszentrum Borstel) durchgeführt.

#### **4.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Proteinfärbung**

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; modifiziert nach Laemmli [149]) dient der Auftrennung denaturierter Proteine in einer Gelmatrix nach ihrem Molekulargewicht. Zu Theorie und Praxis der SDS-PAGE wird verwiesen auf [150].

Die zu untersuchenden Proteinlösungen wurden mit reduzierendem SDS-PAGE-Ladepuffer versetzt, 15 min bei 50 °C inkubiert, anschließend auf Eis gestellt und zusammen mit einem Molekulargewichts-Standard in separate Taschen des Gels geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 12 mA und wurde abgebrochen, sobald der Frontmarker (Bromphenolblau) die untere Kante des Gels erreicht hatte.

Die Polyacrylamidkonzentration der Sammelgele betrug 5 % (w/v), während die Konzentration der Trenngele sich nach dem gewünschten Trennvermögen bzw. dem Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine richtete (10 % oder 12,5 % (w/v)). Die verwendeten Glasplatten für die Gele hatten die Abmessungen 9 x 10 cm; Abstandhalter und Taschenformer hatten eine Dicke von 0,1 cm.

Die Proteingele wurden nach abgeschlossener Elektrophorese entweder mit Coomassie Brilliant Blue R-250 gefärbt (s.u.), oder sie wurden für den Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen (Western Blot) weiterverwendet. Gele zur Auftrennung von Proben fluoreszenzmarkierter Proteine konnten ohne vorherige Anfärbung durch Detektion der ‚in-Gel Fluoreszenz‘ im Odyssey Infrared Imaging System analysiert werden.



**Polyacrylamidgel-Lösungen** (Mengen für 1 Gel)

	<b>Trenngel</b>		<b>Sammelgel</b>
	<b>10 %</b>	<b>12,5 %</b>	<b>5 %</b>
A. bidest.	3,05 ml	2,46ml	2,63 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	1,88 ml	1,88 ml	-
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	-	-	0,47 ml
Acrylamid / Bisacrylamid-Lösung (29:1)	2,48 ml	3,10 ml	0,62 ml
10 % SDS (w/v)	75 µl	75 µl	38 µl
TEMED	11,25 µl	11,25 µl	7,5 µl
10 % (w/v) APS	45 µl	45 µl	30 µl

**SDS-PAGE-Ladepuffer (4x)**

40 % (w/v)	Glycerin
8 % (w/v)	SDS
25 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
0,004 % (w/v)	Bromphenolblau

**Elektrophoresepuffer**

25 mM	Tris-Base
192 mM	Glycin
0,1 % (w/v)	SDS

Für die **Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R-250** wurden die Gele in einer Glasschale mit Coomassie-Färbelösung auf einem Wippschüttler geschwenkt, bis die Gele vollständig angefärbt waren. Anschließend wurden sie zur Reduktion der Hintergrundfärbung in Entfärbelösung inkubiert. Die Dokumentation von Gelen erfolgte mit Hilfe eines Durchlichtscanners.

**Coomassie-Färbelösung**

40 % (v/v)	Methanol
10 % (v/v)	Essigsäure
0,2 % (v/v)	Coomassie Brilliant Blue R-250

**Entfärbelösung**

40 % (v/v)	Methanol
10 % (v/v)	Essigsäure

## 4.2.4 Immobilisierung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen

### 4.2.4.1 Elektrotransfer nach SDS-PAGE

Proteine, die in der SDS-PAGE anhand ihres Molekulargewichts separiert wurden, können durch Elektrotransfer auf Nitrocellulosemembranen überführt und so immobilisiert werden. In membrangebundener Form stehen sie dann für die Detektion mit spezifischen Antikörpern zur Verfügung. Eine genaue Beschreibung der Methode findet sich in [151]. In der vorliegenden Arbeit wurde das sogenannte Tank-Blot Verfahren nach Towbin [152] genutzt. Der Transfer erfolgte bei Raumtemperatur und 300 mA für 2 Stunden.

#### Transferpuffer (nach Towbin, modifiziert)

25 mM	Tris-HCl
192 mM	Glycin
0,05 % (w/v)	SDS
20 % (v/v)	Methanol
pH 8,2 - 8,3	

### 4.2.4.2 Dot Blot

Der Dot Blot ist eine Methode zur schnellen Immobilisierung von Proteinen ohne vorherige gelelektrophoretische Separation. Hierbei wird die zu untersuchende Probe direkt auf die Nitrocellulosemembran aufgebracht und das enthaltene Protein (-Gemisch) durch Trocknen fixiert. Kleinere Mengen (bis zu 3 µl) wurden manuell auf trockene Nitrocellulosemembranen getüpfelt, während für größere Volumina (bis zu 500 µl) das vakuumbetriebene Dot Blotter SRC 96D Minifold-System nach Protokoll des Herstellers genutzt wurde. Die Nitrocellulosemembran wurde hierfür vor dem Transfer mit D-PBS befeuchtet.

## 4.3 Analyse Membran-immobilisierter Proteine und Peptide

Auf Membranen immobilisierte Proteine und Peptide können mit Antikörpern oder anderen Proteinen bzw. Detektionsreagentien, die spezifisch an das gesuchte Molekül binden, detektiert werden. Dieser Nachweis kann direkt erfolgen, das heißt z.B. unter Nutzung eines markierten Primärantikörpers, der gegen das nachzuweisende Protein, Peptid oder Hapten gerichtet ist. Eine höhere Sensitivität kann mit der indirekten Nachweismethode erreicht werden, bei der die Bindung eines unmarkierten Primärantikörpers an das Zielmolekül durch einen (markierten) Sekundärantikörper detektiert wird. Zur Markierung von Antikörpern und anderen Molekülen werden häufig Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, die in Lesegeräten mit Lasern geeigneter Anregungs- und Detektions-Wellenlänge nachgewiesen werden können.

Das in dieser Arbeit verwendete Odyssey Infrared Imaging System kann für zwei unterschiedliche Farbstofftypen genutzt werden, die beide Absorptions- und Emissionsmaxima im langwelligen (Infrarot-) Bereich besitzen. Optimal geeignet für das System sind z.B. die Fluoreszenzfarbstoffe Alexa Fluor 680 (Invitrogen; Absorptionsmaximum: 684 nm, Emmissionsmaximum: 707 nm; Detektion im 700 nm-Kanal) und IRDye 800 (LI-COR Biosciences; Absorptionsmaximum: 778 nm, Emmissionsmaximum: 806 nm; Detektion im 800 nm-Kanal). Die Farbstoffe können getrennt oder auch gleichzeitig nachgewiesen werden, was die Durchführung von ‚Two-Colour-Assays‘ mit dem gleichzeitigen Nachweis unterschiedlicher Protein-Spezies auf einem Blot möglich macht.

#### Häufig genutzte Lösungen:

**Blocking Puffer**

1 % (w/v) Casein  
in D-PBS

**Waschpuffer**

0,1 % (w/v) Tween-20  
in D-PBS

**Inkubationspuffer**

0,1 % (w/v) Tween-20  
in Blocking Puffer

#### **4.3.1 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen**

Nachdem die wie unter Punkt 4.2.4 beschrieben vorbereiteten Blots zweimal für 5-10 min in D-PBS gewaschen wurden, wurden die Membranen zum Blockieren freier Proteinbindungsstellen entweder ÜN bei 4 °C oder für mindestens 2 h bei RT in Blocking Puffer inkubiert. Alle Inkubations- und Waschzyklen wurden auf einem Wippschüttler bei ca. 20 rpm durchgeführt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper bzw. primären Detektionsreagenz (markiert oder unmarkiert) erfolgte in Inkubationspuffer ÜN bei 4 °C oder bei RT für 2 h. Anschließend wurden die Membranen 6x für 5-10 min in Waschpuffer gewaschen. Unmarkierte Primärreagenzien wurden durch einen nachfolgenden Inkubationsschritt mit dem Sekundärantikörper in Inkubationspuffer (1 h bei RT) detektiert, woraufhin die Membranen wiederum 6x 5-10 min in Waschpuffer gewaschen wurden. Die Membranen wurden danach 2x 5-10 min in D-PBS gewaschen, um das im Waschpuffer enthaltene Detergenz zu entfernen. Der Bindungsnachweis erfolgte bei fluoreszenzmarkierten Antikörpern/Proteinen mit Hilfe des Odyssey Infrared Imaging Systems. Die immunologische Detektion Meerrettich-Peroxidase (HRP)-markierten Streptavidins wurde mit dem Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrat Kit nach Anweisung des Herstellers durchgeführt und mit dem ChemiDoc 2000 System ausgewertet.

### Antikörper-Verdünnungen für Immunoblots

Antikörper	Abkürzung	Verdünnung/Konzentration
Kaninchen anti-6xHIS Epitope Tag (IRDye 800-markiert)	$\alpha$ -His <sub>6</sub> -800	0,2 $\mu$ g/ml
Kaninchen anti-AIDA C-Terminus, Serum	$\alpha$ -AIDA	1:50.000
Maus anti-human PrP <sup>c</sup> , Klon 6H4	6H4	0,1 $\mu$ g/ml
Maus anti-Flag M2	$\alpha$ -Flag	0,1 $\mu$ g/ml
Ziege anti-Maus IgG (Alexa Fluor 680-markiert)	g $\alpha$ m-680	0,2 $\mu$ g/ml
Ziege anti-Kaninchen IgG (IRDye 800-markiert)	g $\alpha$ r-800	0,2 $\mu$ g/ml
Streptavidin (Alexa Fluor 680-markiert)	SA-680	0,1 $\mu$ g/ml
Streptavidin (Meerrettichperoxidase (HRP)-markiert)	SA-HRP	1,0 $\mu$ g/ml

### 4.3.2 Festphasenassays mit Peptiden

#### 4.3.2.1 Design der Peptidbibliotheken

Auf Cellulosemembranen immobilisierte Peptidbibliotheken können zur Kartierung und zur genaueren Analyse linearer Proteinbindungsstellen genutzt werden. Haupt-Verwendungszweck im vorliegenden Projekt war die Identifizierung und Charakterisierung von peptidischen Prionprotein-Liganden. Für Kartierungen von PrP-bindenden Proteinen wurden die Aminosäuresequenzen der zu untersuchenden Ligandenproteine im Vorschub von ein bis fünf Aminosäuren als 16-mer Peptide dargestellt. Eine genauere Analyse von gefundenen Bindemotiven erfolgte durch das Einführen N- und C-terminaler Deletionen in der Aminosäuresequenz, sowie durch die Durchführung sogenannter ‚Alanin-Scans‘, bei denen jede Aminosäure des zu untersuchenden Peptids konsekutiv gegen Alanin substituiert wird. Auf jedem Filter bzw. Filteranteil wurden mindestens 10 Zufallspeptide gleicher Länge mitsynthetisiert, die zur Definition eines ‚Cut-Offs‘ verwendet werden konnten (s. Abschnitt 4.3.2.3). Die Zufallspeptide wurden mit der im Internet frei zugänglichen Programmkollektion ‚The Sequence Manipulation Suite‘ [153] generiert.

#### 4.3.2.2 Proteinbindung an Peptidbibliotheken

Die festphasengebundenen Peptidbibliotheken, die wie unter Punkt 4.1 beschrieben synthetisiert und bei -20 °C trocken gelagert worden waren, wurden auf Raumtemperatur erwärmt, und für 10 min in 100 % Ethanol inkubiert. Nach Rehydratisieren durch zweimalige Inkubation in D-PBS für 10 min wurden die Filter dem sogenannten ‚Fake-Stripping‘ zugeführt. Dieses Verfahren dient dazu, die im Spot-Areal hochkonzentriert vorliegenden Peptide, die eventuell durch intra- und intermolekulare Wechselwirkungen nur zum Teil zur Verfügung stehen für die Wechselwirkung mit ihrem Liganden, zu entfalten und so besser zugänglich zu machen.

Die Cellulosemembranen wurden für 2x 5 min im Ultraschallbad mit DMF behandelt, anschließend für 2x 5 min mit A. bidest. gewaschen (Wippschüttler) und danach für 2x 10 min im Ultraschallbad mit Strip-Puffer inkubiert. Im Anschluß an das Fake-Stripping wurden die Filter 4x 5-10 min in D-PBS äquiliert und bei RT für mindestens 3 h in Blocking Puffer inkubiert. Die Behandlung mit fluoreszenzmarkierten Nachweisreagenzien erfolgte ÜN bei 4 °C in Inkubationspuffer. Vor der Analyse im Odyssey Infrared Imager wurden die Membranen 6x 5-10 min in Waschpuffer und 2x 5-10 min in D-PBS gewaschen. Für die Analyse von Peptidbibliotheken wurde ausschließlich das direkte Nachweisverfahren mit fluoreszenzmarkierten Proteinen angewandt.

##### Strip-Puffer

8 M Harnstoff  
1 % (w/v) SDS  
0,5 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol  
mit Essigsäure auf pH 6,0 - 7,0 eingestellt

Der Harnstoff wurde als 10 M Stammlösung angesetzt, mit dem Mixed Bed Ionenaustauscher Amberlite MB-6113 deionisiert, filtriert und bis zur Verwendung bei -20 °C eingefroren.

#### 4.3.2.3 Quantifizierung der Signalintensitäten

Die Signalintensitäten der einzelnen Peptidspots wurden mit Hilfe der Odyssey Application Software ausgewertet, wobei um jeden Peptidspot zur Definition des zu analysierenden Areals ein kreisförmiger Umriss gelegt wurde. Eine außerhalb der Spot-Areale liegende Region der Cellulosemembran diente zur Bestimmung der Hintergrund-Fluoreszenz. Die gemessene Fluoreszenz-Intensität wird von der Software als ‚integrated intensity‘ angegeben, was definiert ist als ‚counts pro mm<sup>2</sup>‘. Dieser Wert ist sowohl von der Größe des Umrisses als auch von der Auflösung, mit der die Membran eingelesen wurde, unabhängig und ist proportional zu der Menge des an die Membran gebundenen fluoreszierenden Proteins. Bis auf die Größe des Hintergrundareals wurden die Umrissgrößen und -formen jedoch innerhalb eines Experimentes konstant gehalten. Von dem erhaltenen Wert für die

‚integrated intensity‘ jedes Peptidspots wurde der Wert der Hintergrundfluoreszenz abgezogen; diese Werte werden im Folgenden als ‚Rohdaten‘ oder ‚Roh-Messwert‘ bezeichnet werden.

Von den Roh-Messwerten wurde bei den Experimenten zur Kartierung linearer Bindestellen ein ‚Cut-Off‘ subtrahiert, der anhand der zusammen mit den Peptidbibliotheken synthetisierten und mitdetektierten Zufallspeptide nach der von Frey *et al.* entwickelten Methode [154] für eine Konfidenz von 99 % bestimmt wurde. Peptide, die nach Abzug des Cut-Offs ein Signal lieferten, hatten damit eine 99 %ige Wahrscheinlichkeit, keine falsch-positiven Bindestellen darzustellen. Bei Mitführung von z.B. zehn Zufallspeptiden ergibt sich der Cut-Off (CO) zu:

$$\text{CO} = \text{MW} + (\text{STABW} \times 2,959)$$

mit	CO	Cut-Off
	MW	Mittelwert der Roh-Messwerte der Zufallspeptide
	STABW	Standardabweichung der Roh-Messwerte der Zufallspeptide

#### 4.4 Molekularbiologische Arbeiten

Für den theoretischen Hintergrund und eine genaue Beschreibung der angewandten molekularbiologischen Techniken wird auf die Literatur [155] verwiesen. Die Bezeichnung ‚H<sub>2</sub>O‘ in Pipettierschemata kennzeichnet die Verwendung von sterilem A. bidest.

##### 4.4.1 Präparation und Reinigung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA aus *E. coli*-Übernachtskulturen (2,5 ml) wurde mit Hilfe des Qiaprep Spin Miniprep Kit nach Anweisung des Herstellers isoliert. Das Verfahren beruht auf einer alkalischen Lyse der Bakterien und der Säulenreinigung der Plasmid-DNA über eine Silicagel-Membran, die die Plasmide in einem Hochsalz-Puffer selektiv adsorbiert. Nach der Isolierung wurde die Plasmid-DNA für die Insertion von Fremd-DNA durch Restriktion und Ligation, für Sequenzierungen oder für die Transformation in andere *E. coli*-Wirtsstämme genutzt.

#### 4.4.2 Ethanol-Präzipitation von DNA

Ethanol-Präzipitationen wurden zur Konzentrierung und weiteren Reinigung von Plasmid-DNA vor Sequenzierungen durchgeführt. Ein Mikrogramm der gelösten DNA wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen eiskaltem 100 % (v/v) Ethanol versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die DNA wurde durch Zentrifugation (20 min, 16.000 x g, 4 °C) sedimentiert, zweimal mit eiskaltem 70 % Ethanol (v/v) gewaschen und nach Abnehmen des Überstandes an der Luft getrocknet.

#### 4.4.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA in Lösungen erfolgte entweder durch Ultraviolet-Absorptionsspektrometrie oder durch Gelelektrophorese und nachfolgenden Vergleich der Fluoreszenzintensität der zu untersuchenden Probe mit derjenigen einer Probe mit bekannter Konzentration.

Für die Messung im Biophotometer (Eppendorf) wurde die DNA in H<sub>2</sub>O verdünnt, in eine für UV-Licht durchlässige Küvette (UVette; Mindestmenge: 50 µl) überführt und bei 280 nm analysiert. Da die Absorption der ultravioletten Strahlung proportional zum DNA-Gehalt einer Lösung ist, konnte so die Konzentration berechnet werden.

#### 4.4.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Das PCR-Verfahren wurde zur Amplifikation von Insert-DNA-Sequenzen und zur Überprüfung des Erfolgs von Ligationen und Transformationen genutzt. Als ‚Template‘ diente murine cDNA, isolierte Plasmid-DNA oder Plasmid-DNA aus bakteriellem Lysat („colony PCR“). Während für PCR-Reaktionen zur Kontrolle von Klonierungen die normale *Taq* Polymerase verwendet wurde, wurde für präparative Amplifikationen von Insert-DNA AccuSure DNA-Polymerase genutzt. Diese Polymerase wird im Gegensatz zur *Taq* Polymerase erst durch Hitze aktiviert („Hot Start Polymerase“) und besitzt eine 3'→5' Exonuklease („proof-reading“) Aktivität. Die Konzentration von Mg<sup>2+</sup>-Ionen im Ansatz betrug standardmäßig 2 mM (im Polymerase-Puffer enthalten) und wurde bei Bedarf durch Supplementation von MgCl<sub>2</sub> erhöht. Die Amplifikation erfolgte im Mastercycler 5330plus mit einem auf die Primer, die Länge des Amplifikats und auf die verwendete Polymerase abgestimmten Programm. Der Elongations-Schritt wurde bei Verwendung der AccuSure DNA-Polymerase bei 70 °C (2 min pro Kilobase des Amplifikats) durchgeführt; bei Verwendung der *Taq* Polymerase bei 72 °C (1 min pro Kilobase des Amplifikats). Der initiale Denaturierungs-Schritt bei 95 °C dauerte für die AccuSure DNA-Polymerase 10 min, bei der *Taq* Polymerase 2 min.

**PCR-Ansatz**

	<b>Kontroll-PCR (20 µl)</b>	<b>präparative PCR (50 µl)</b>
10x Polymerase-Puffer	2 µl ( <i>Taq</i> )	5 µl (AccuSure)
4 mM dNTP's	1 µl	1 µl
20 µM Primer 1	0,4 µl	1 µl
20 µM Primer 2	0,4 µl	1 µl
DNA-Polymerase	0,25 U ( <i>Taq</i> DNA Pol.)	1 U (AccuSure DNA Pol.)
Template-DNA	nach Bedarf	nach Bedarf
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl	ad 50 µl

**4.4.5 Agarose-Gelelektrophorese**

Diese Technik dient der analytischen oder präparativen Trennung von DNA-Molekülen in Agarosegelen anhand ihrer Größe. Aufgrund ihrer negativen Ladung wandern Nukleinsäuren im elektrischen Feld in Richtung Anode, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit von der Größe der DNA-Fragmente und der Porengröße (Agarosekonzentration) des Gels abhängig ist. Je nach Länge der zu analysierenden DNA-Fragmente wurden 0,8 bis 1,5 %ige, ethidiumbromidhaltige Agarosegele hergestellt (0,5 µg/ml Ethidiumbromid). Sowohl für die Zubereitung des Gels als auch als Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer verwendet. Die zu untersuchenden Proben wurden mit DNA-Auftragspuffer versetzt und zusammen mit einem Molekulargewichts-Standard (2-Log DNA Ladder) in separate Taschen des Gels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 mA. Die Auswertung und Dokumentation der Gele wurde mit Hilfe eines UV-Transilluminators (312 nm) mit angeschlossener Video-Dokumentationseinheit durchgeführt. Präparative Gele wurden zur Isolierung linearisierter (hydrolysierter) Plasmid-DNA und zur Isolierung von PCR-Produkten, die für Klonierungen bestimmt waren, genutzt. Die gewünschte DNA-Bande wurde hierbei unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten; die DNA wurde anschließend wie unter Punkt 4.4.7 beschrieben gereinigt.

**10x TAE-Puffer**

48,4 g Tris-Base  
 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)  
 11,42 ml Eisessig  
 ad 1l A. bidest

**10x DNA-Auftragspuffer**

50 % (v/v) Glycerol  
 20 mM EDTA (pH 8,0)  
 0,25 % (w/v) Bromphenolblau



#### 4.4.6 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Gereinigte Plasmid-DNA (~ 1 µg) oder isolierte Amplifikate aus PCR-Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit Restriktionsendonukleasen (5 Units) behandelt und dadurch spezifisch hydrolysiert. Die Ansätze wurden nach Herstellerangabe mit dem für das jeweilige Restriktionsenzym geeigneten Puffer versetzt und für mindestens zwei Stunden bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Die Enzyme NdeI, XbaI und XmaI wurden anschließend durch eine 20minütige Inkubation bei 65 °C inaktiviert. Nicht Hitze-inaktivierbare Restriktionsenzyme wurden durch Reinigung der DNA entfernt. Sollte die DNA mit mehr als einer Restriktionsendonuklease geschnitten werden, wurde ein Puffer gewählt, in dem alle verwendeten Enzyme zu mindestens 50 % aktiv waren.

#### 4.4.7 Reinigung von DNA

Die Reinigung von DNA-Fragmenten wurde mit dem Nucleospin Extract Kit nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Dieses Kit ermöglicht die Reinigung von DNA sowohl aus der Lösung als auch aus Agarosegelen. Enzyme, Salze und niedermolekulare DNA-Fragmente wie Oligonukleotide oder nichtinkorporierte dNTP's werden dabei von der DNA abgetrennt. Die DNA wurde mit 30 µl des im Kit enthaltenen Elutionspuffers (5 mM Tris-HCl, pH 8,5) eluiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein solcher Reinigungsschritt zur Reinigung von DNA aus Restriktionsansätzen oder aus Agarosegelen durchgeführt.

#### 4.4.8 Herstellung doppelsträngiger DNA-Fragmente

Die kodierenden Sequenzen peptidischer PrP-Liganden wurden durch komplementäre Oligonukleotide dargestellt, die durch Aneinanderlagerung („Annealing“) zu doppelsträngigen DNA-Molekülen zusammengefügt wurden. Die Oligonukleotide wurden so konzipiert, daß durch das Annealing ein DNA-Molekül mit einzelsträngigen Überhängen am 3' und 5' Ende entstand. Diese Überhänge waren komplementär zu den durch Restriktion des Vektors mit XmaI und KpnI entstehenden ‚kohäsiven Enden‘, so daß die Moleküle ohne vorherige Restriktion des Inserts in den linearisierten Vektor pMK90 ligiert werden konnten.

Je 100 pmol der beiden komplementären Oligonukleotide wurden in einem Mikroreaktionsgefäß zusammengegeben und mit 2,5 mM Tris-HCl (pH 8,5) auf ein Gesamtvolumen von 50 µl gebracht. Das Reaktionsgefäß wurde in ein Becherglas mit ca. 400 ml Wasser überführt. Das Wasser wurde für zwei Minuten auf 95 °C erhitzt; anschließend wurde das Becherglas in einen Kühlraum (4 °C) überführt und bis zum Erreichen der Umgebungstemperatur dort belassen. Die so hergestellten doppelsträngigen DNA-Moleküle konnten direkt in Ligationsreaktionen eingesetzt werden.

#### 4.4.9 Ligation

10-50 ng Plasmid-DNA, die mit vorher mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen linearisiert und anschließend gereinigt worden war, wurde mit einem Überschuss an Insert-DNA versetzt und mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 17,3 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 2 µl 10x Ligasepuffer und 0,7 µl T4 DNA-Ligase (400 U/µl) wurden die Ansätze ÜN bei 16 °C inkubiert und anschließend bis zur Transformation in chemisch kompetente *E. coli* auf Eis aufbewahrt.

#### 4.4.10 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde von der Firma MWG Biotech durchgeführt. Für jede Sequenzier-Reaktion wurde 1 µg gereinigte Plasmid-DNA durch Ethanol-Präzipitation gefällt und luftgetrocknet verschickt. Zur Sequenzierung von pMK90-Derivaten wurden die Primer pMK-3367F und pMK-3777R verwendet. Insertionen in das Plasmid pET-15b wurden durch Sequenzierung mit den universellen T7-Primern überprüft.

### 4.5 Allgemeine Arbeiten mit Bakterien

#### 4.5.1 Kultivierung von Bakterien

Alle verwendeten *E. coli*-Stämme wurden in autoklaviertem LB-Flüssigmedium oder auf LB-Agarplatten kultiviert. Für mit pMK90 oder pET-15b transformierte Bakterien wurde den Medien 100 µg/ml Ampicillin zugegeben.

##### LB-Medium

10 g Trypton  
5 g Hefe-Extrakt  
10 g NaCl  
A. bidest ad 1l (pH 7,3)

##### LB-Agar

LB-Medium  
15g/l Agar-Agar

##### Ampicillin-Stammlösung

100 mg/ml in A. bidest.  
sterilfiltriert, portioniert und  
bei -20 °C gelagert

Für **Übernachtkulturen** wurde die gewünschte Menge Flüssigmedium (meist 2,5 ml) in Einweg-Kulturröhrchen vorgelegt und mit einer Einzelkolonie von einer bewachsenen LB-Agar-Platte oder aus eingefrorenen Stammkulturen inokuliert. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 220 rpm ÜN im Haubeninkubator geschüttelt.

Für **Hauptkulturen** wurde frisches, auf 37 °C vorgewärmtes Flüssigmedium in einem Erlenmeyerkolben 1:100 mit einer Übernachtskultur beimpft und bis zur gewünschten OD<sub>600</sub> (optische Dichte bei 600 nm) bei 37 °C und 220 rpm inkubiert.

#### 4.5.2 Stammhaltung von Bakterien

Zur längerfristigen Aufbewahrung von Bakterienstämmen wurden Stammkulturen angelegt. Hierfür wurden 1 ml einer exponentiell wachsenden Bakterienkultur mit 1 ml Einfriermedium (LB-Flüssigmedium 1:1 versetzt mit Glycerol; sterilfiltriert) gemischt, zu 1 ml in beschriftete Schraubdeckelröhrchen portioniert und bei -80 °C gelagert.

#### 4.5.3 Bestimmung der optischen Dichte ( $OD_{600}$ )

Die Bestimmung der optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) von Bakterienkulturen erfolgte in Einweg-Halbmikroküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm bei einer Wellenlänge von 600 nm im Biophotometer. Zur Bestimmung des Referenz-Wertes wurde das entsprechende Kultivierungsmedium genutzt.

#### 4.5.4 Lysieren von Bakterien im analytischen Maßstab

Zur Herstellung kleiner Mengen bakterieller Lysate für die Verwendung in Dot Blots und Western Blots wurde das BugBuster Protein Extraction Reagent nach Protokoll des Herstellers genutzt. Um die genomische DNA abzubauen und dadurch die Viskosität der Lysate zu reduzieren, wurden pro Milliliter des Reagenz 25 Units Benzonase Nuclease zugegeben. Das Gemisch wurde zusätzlich mit 1x Proteaseinhibitor-Lösung supplementiert, um die Degradation von Proteinen zu minimieren. Die Ernte der Bakterien erfolgte durch Zentrifugation bei 10.000 x g für 10 min in gewogenen Mikroreaktionsgefäßen. Anschließend wurde die Feuchtmasse bestimmt und das Bakteriensediment in 5 ml des supplementierten Reagenz („BugBuster Reagenz“) pro Gramm resuspendiert. Die Bakterien wurden für 10-20 min auf einem Wippschüttler (25 rpm) lysiert.

#### BugBuster Reagenz

1x BugBuster Protein Extraction Reagent  
1x Proteaseinhibitor-Lösung  
25 U/ml Benzonase Nuclease

#### 4.5.5 Differentielle Fraktionierung von *E. coli*

Durch die Technik der differentiellen Fraktionierung können Proteine aus unterschiedlichen zellulären Kompartimenten voneinander abgetrennt werden. Im vorliegenden Projekt wurde ein Protokoll zur Anreicherung von Proteinen der äußeren Membran des gramnegativen Bakteriums *E. coli* [135] in modifizierter Form verwendet.

Eine 100 ml Hauptkultur wurde 1:100 aus einer Übernachtskultur inokuliert und bis zum Erreichen einer  $OD_{600}$  von 0,8 kultiviert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation bei 3000 x g und 4 °C für 15 min. Die Bakterien wurden 1x in 20 ml Puffer 1 (0,2 M Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl) gewaschen und anschließend in 15 ml Puffer 2 (50 mM Tris-HCl (pH 8,5), 2 mM EDTA) resuspendiert. Nach Hinzufügen von 25 Units Benzonase Nuclease wurden die Zellen in einer 20K French Pressure Cell lysiert (1000 psi, 3 Durchgänge). Nichtlysierte Zellen und große Zelltrümmer wurden bei 5000 x g und 4 °C für 10 min abgetrennt. Aus dem Überstand wurden durch Ultrazentrifugation (Ultrazentrifuge L7-65, Rotor SW-40-Ti; 1 h bei 160.000 x g, 4 °C) die Membranfraktionen isoliert. Der Überstand mit löslichen peri- und cytoplasmatischen Proteinen wurde abgenommen und aufbewahrt. Das Sediment, das die äußere bakterielle Membran und die Cytoplasmamembran enthielt, wurde in 6 ml Puffer 3 (12,5 mM Tris-HCl (pH 7,6), 1 % (w/v) Na-Laurylsarcosinat) aufgenommen und bei RT für 30 min auf einem Schüttler (30 rpm) inkubiert. Durch eine erneute Ultrazentrifugation (s.o.) wurden die äußeren Membranen angereichert. Das Sediment wurde in 600 µl L-PBS aufgenommen.

## 4.6 Gentechnische Veränderung von *E. coli*

### 4.6.1 Herstellung chemisch kompetenter *E.coli*

Das Protokoll zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* wurde nach Hanahan *et al.* [156] modifiziert. Zur Kultivierung der Zellen (*E. coli* C600, *E. coli* BL21 oder *E. coli* BL21(DE3)) im Schüttelinkubator wurde SOB-Medium genutzt. Aus einer 2,5 ml Übernachtskultur wurden 20 ml Hauptkultur beimpft und bei 37 °C inkubiert. Bei Erreichen einer  $OD_{600}$  von 0,5 – 0,6 wurde die Kultur mit frischem, vorgewärmtem Medium auf ein Gesamtvolumen von 200 ml aufgefüllt und weiter inkubiert. Bei einer  $OD_{600}$  von 0,6 wurde das Kulturgefäß für 15 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension in vier vorgekühlte 50 ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt und bei 1500 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Bakterien-Sedimente auf Eis in je 5 ml vorgekühltem TBF I vorsichtig resuspendiert, in ein gemeinsames 50 ml-Reaktionsgefäß überführt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden erneut sedimentiert (15 min, 1500 g, 4°C), der Überstand wurde entfernt und die Bakterien in 5 ml gekühltem TBF II aufgenommen. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Suspension kompetenter Zellen in vorgekühlte 2 ml Mikroreaktionsgefäße portioniert und bis zum späteren Gebrauch bei –80 °C eingefroren.

**SOB-Medium**

2 %	Trypton
0,5 %	Hefe-Extrakt
10 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
10 mM	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
10 mM	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O

Die Zugabe von MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O und MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O erfolgte nach dem Autoklavieren aus sterilfiltrierten Stammlösungen (1 M).

**TBF I**

100 mM	KCl
30 mM	Kalium-Acetat
10 mM	CaCl <sub>2</sub>
50 mM	MnCl <sub>2</sub>
15 % (w/v)	Glycerol
pH 5,8	

**TBF II**

10 mM	KCl
10 mM	MOPS
75 mM	CaCl <sub>2</sub>
15 % (w/v)	Glycerol
pH 7,0	

TBF I und TBF II wurden sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

**4.6.2 Transformation chemisch kompetenter *E.coli***

50 µl Portionen chemisch kompetenter *E.coli* wurden auf Eis aufgetaut und mit je circa 50 ng isolierter Plasmid-DNA bzw. mit 8 µl eines Ligationsansatzes versetzt. Die Ansätze wurden für 30 min auf Eis inkubiert, anschließend für 30 sec bei 42 °C (Hitzeschock) inkubiert und wieder für zwei Minuten auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 500 µl SOC-Medium wurden die Transformationsansätze für 1 h bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Anschließend wurden 50-200 µl auf Ampicillin-haltigen Selektivnährböden ausgestrichen und ÜN im Brutschrank kultiviert.

**SOC-Medium**

SOB-Medium x 20 mM Glucose

Die Glucose wurde aus einer sterilfiltrierten 1 M Stammlösung zugesetzt. Das SOC-Medium wurde portioniert und bei -20 °C gelagert.

### 4.6.3 Selektion von Transformanden

Die Identifikation von Transformanden, die das gewünschte Plasmid inklusive des ligierten Inserts trugen, erfolgte durch ‚colony-PCR‘. Hierfür wurden Einzelkolonien in je 20 µl sterilem Puffer (2,5 mM Tris-HCl (pH 8,5)) resuspendiert und 2 µl der Suspension als Template in einer PCR eingesetzt. Das verwendete Oligonukleotidpaar war entweder spezifisch für den verwendeten Vektor (pMK90 oder pET-15b), so daß eine erfolgreiche Ligation durch die Fragmentgröße verifiziert werden konnte, oder umfasste zusätzlich zu einem vektorspezifischen Primer ein an das ligierte Insert bindendes Oligonukleotid. Vor der Verwendung eines gentechnisch veränderten Bakterienklons für weitere Versuche (Proteinexpression bzw. PrP-Bindungsstudien) wurde die korrekte Insertion des eingefügten DNA-Fragments in das Leseraster und die Abwesenheit von Mutationen durch Sequenzierung bestätigt.

## 4.7 Produktion rekombinanter Prionprotein-Fragmente

Nach dem im Folgenden vorgestellten Protokoll wurden die rekombinanten Proteine PrP90-231 und PrP101-231 in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert, gereinigt und renaturiert. Die bakterielle Expression der Proteine, die einen N-terminalen Hexahistidin-Tag enthielten, erfolgte in Form unlöslicher Einschlusskörperchen, die durch Lyse der Bakterien freigesetzt wurden. Das rekombinante Protein wurde durch Denaturieren in Harnstoff (8 M) gelöst und über His6-Affinitätschromatographie in Gegenwart von Harnstoff von verunreinigenden *E. coli*-Proteinen abgetrennt [157].

#### 1x TBS (Tris-buffered Saline)

50 mM Tris-Base  
10 mM NaCl  
pH auf 7,8 eingestellt

#### Solubilisierungspuffer

50 mM Tris-Base  
8 M Urea  
1 mM DTT  
pH auf 8,0 eingestellt

#### NTA-Waschpuffer

8 M Urea  
300 mM NaCl  
50 mM Tris  
10 mM Imidazol  
pH auf 8,0 eingestellt

#### NTA-Elutionspuffer

8 M Urea  
50 mM Tris  
300 mM Imidazol  
pH auf 8,0 eingestellt

#### 4.7.1 Heterologe Expression von murinen PrP-Fragmenten in *E. coli*

100 ml mit Ampicillin supplementierten LB-Mediums wurden mit einer Stammkultur von *E. coli* BL21(DE3), die mit den Expressionsvektoren pET-15b-(PrP90-231) oder pET-15b-(PrP101-231) transformiert waren, beimpft. Die Vorkultur wurde über Tag 7-8 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. 2x 1 l frisches, vorgewärmtes Medium wurden mit je 10 ml der Vorkultur inokuliert und die so verbreiterte Kultur wurde ÜN bei 37 °C und 130 rpm weiter inkubiert. Die Bakterien wurden sedimentiert (Sorvall RC 5C Plus, 2600 x g, 10 min, RT), der Kultur-Überstand wurde verworfen und die Bakterien in der gleichen Menge (2 l) frischen Mediums resuspendiert. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C und 130 rpm wurde die Expression des rekombinanten Proteins durch Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration) zum Kulturmedium induziert und die Expressionskulturen für weitere 5 h bei 37 °C geschüttelt. Die Ernte der Bakterien erfolgte durch Zentrifugation bei 4 °C (Sorvall RC 5C Plus, 2600 x g, 10 min). Der Kultur-Überstand wurde entfernt und verworfen. Die sedimentierten Bakterien, die das rekombinante Protein in Form unlöslicher Einschlusskörperchen enthielten, wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### 4.7.2 Isolierung von PrP-haltigen Einschlusskörperchen

Das Bakteriensediment wurden aufgetaut und in 100 ml TBS (1/20 Kulturvolumen) resuspendiert. Anschließend wurden 2 ml Triton X-100, 4 ml 0,5 M EDTA, 53,33 ml 3 M NaCl und 4 mg Lysozym zugegeben und der Ansatz auf 200 ml (1/10 Kulturvolumen) mit TBS aufgefüllt. Die Suspension wurde für 10 min bei 37 °C und für 20 min bei RT und 100 rpm inkubiert. Anschließend wurden der Suspension lysierter Bakterien 8 ml 0,5 M MgCl<sub>2</sub> und 40 µl (25 U/µl) Benzonase Nuclease zugefügt, um durch Degradation der DNA die Viskosität der Lösung zu reduzieren. Nach einer ca. 20minütigen Inkubation bei 100 rpm und RT wurden die freigesetzten PrP-haltigen Einschlusskörperchen durch Zentrifugation bei 4 °C (Sorvall RC 5C Plus, 16.300 x g, 30 min) geerntet und zur Lagerung bei -20 °C eingefroren.

#### 4.7.3 Denaturieren der Einschlusskörperchen

Die Einschlusskörperchen wurden aufgetaut, ad 200 ml (1/10 Kulturvolumen) in Solubilisierungspuffer aufgenommen und für ca. 45 min bei RT und 100 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Durch Zentrifugation (Sorvall RC 5C Plus, 16.300 x g, 30 min, 4 °C) wurden unlösliche Bestandteile abgetrennt. Der Überstand, der das gelöste, denaturierte Prionprotein enthielt, wurde abgenommen und für die affinitätschromatographische Reinigung des rekombinanten Proteins verwendet.

#### 4.7.4 Affinitätschromatographische Reinigung über Ni-NTA-Agarose

40 ml einer 50 %igen (w/v) Ni-NTA Agarose wurden durch Zentrifugation für 2 min bei 500 x g sedimentiert. Der Überstand wurde entfernt und die Ni-NTA Agarose in der denaturierten Protein-Lösung resuspendiert. Die Ansätze wurden für 30 min bei RT inkubiert und währenddessen mehrfach manuell geschwenkt. Nach erneuter Zentrifugation (2 min, 500 x g, RT) wurde der Überstand abgenommen und bei 4 °C bis zur späteren Analyse aufbewahrt. Die mit rekombinatem Protein beladene Ni-NTA Agarose wurde in circa 200 ml NTA-Waschpuffer resuspendiert und in eine Standard-Chromatographie-Säule ( $\varnothing = 2,2$  cm; Polystyrol) überführt, wo das Material nach Sedimentation und Ausbildung eines Säulenbetts mit weiteren 100 ml NTA-Waschpuffer gewaschen wurde. Die Elution des gebundenen Prionproteins erfolgte in mehreren Fraktionen mit insgesamt 48 ml NTA-Elutionspuffer. Die gesamte Prozedur der Proteinreinigung erfolgte unter denaturierenden Bedingungen.

Von den Wasch- und Elutions-Fractionen wurden Proben entnommen, mit SDS-PAGE-Ladepuffer versetzt und vor der Weiterverarbeitung der Eluate durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert. Die Proteinkonzentration der Eluat-Fractionen wurde mit dem Micro BCA Assay bestimmt.

#### 4.7.5 Renaturieren der rekombinanten Proteine

PrP-haltige Elutionsfraktionen wurden vereinigt und mit Elutionspuffer auf eine Konzentration von 1 mg/ml verdünnt. Die denaturierte Proteinlösung wurde in Gegenwart von 1  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>  $\ddot{U}$ N ( $\geq 16$  h) bei 4 °C geschwenkt. Anschließend wurde die Lösung unter Rühren zügig 1:10 in vorgekühltem Dialysepuffer (3 % (w/v) NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,3) verdünnt und bei 4 °C dialysiert (MWCO 3500). Falls konzentriertere Prionprotein-Chargen erzeugt werden sollten, wurden die Dialyseschläuche anschließend in eine Schale mit PEG 20.000 (Polyethylenglycol, M ~ 16.000 - 24.000 Da) gelegt, komplett mit PEG 20.000 bedeckt und bis zur gewünschten Rest-Flüssigkeitsmenge bei 4 °C inkubiert. Aufgrund seiner hygroskopischen Eigenschaften zieht das PEG Flüssigkeit aus dem Dialyseschlauch heraus, wobei die Proteinkonzentration steigt.

Die Proteinlösung wurde in 50 ml-Reaktionsgefäße überführt und für 20 min bei 4 °C und 3.500 x g zentrifugiert, um Präzipitate abzutrennen. Der lösliche Überstand, der das renaturierte und korrekt gefaltete Protein enthielt, wurde portioniert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Zu verwendende Portionen wurden nach dem Auftauen bei 4 °C und 16.000 x g für 15 min zentrifugiert, um durch das Einfrieren entstandene Präzipitate zu entfernen. Die Konzentrationsbestimmung für jede Proteincharge erfolgte ebenfalls anhand von aufgetautem und zentrifugiertem Material.



## 4.8 Markierung von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen

Proteine können durch die kovalente Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen direkt markiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden hierfür NHS- (N-Hydroxy-Succinimidyl-) Ester von Fluorophoren genutzt, die eine Acylierung von freien Aminogruppen eines Proteins bewirken. Als Reaktionspartner stehen hierbei z.B. die Aminofunktion von Lysin-Seitenketten und die der N-terminalen Aminosäure zur Verfügung. Alle Experimente fanden soweit wie möglich unter Lichtausschluss statt, um das Ausbleichen der Fluorophore zu vermeiden.

### 4.8.1 Kopplungsreaktion

Die zu markierenden Proteine wurden in der höchsten zur Verfügung stehenden Konzentration eingesetzt, um eine möglichst effiziente Kopplung zu gewährleisten. Als Kopplungspuffer wurde Bicarbonatpuffer (3 % (w/v)  $\text{NaHCO}_3$  (pH 8,3)) genutzt. Sofern die Proteine nicht bereits in diesem Puffer vorlagen, wurde ein Pufferaustausch durch Dialyse gegen Bicarbonatpuffer durchgeführt. Die Farbstoff-NHS-Ester wurden direkt vor dem Ansetzen der Reaktion auf RT angewärmt und zu 20 mg/ml in amin- und wasserfreiem DMF (N,N'-Dimethylformamid) aufgenommen.

Der in DMF gelöste NHS-Ester des Fluorophors wurde im gewünschten molaren Verhältnis zum Protein zugegeben, die Lösung wurde sofort gemischt und für 2 h bei RT auf einem Überkopf-Schüttler im Dunklen inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Glycin in einem 100-fachen molaren Überschuss relativ zum Farbstoff und weitere Inkubation des Ansatzes ÜN bei 4 °C auf einem Überkopf-Schüttler im Dunklen terminiert.

### 4.8.2 Weiterverarbeitung der Kopplungsansätze

Durch Zentrifugation der Reaktionsansätze (16.000 x g, 20 min, 4 °C) wurden Präzipitate entfernt; die Überstände wurden in Dialysierkapseln überführt.

Fluoreszenzmarkiertes Prionprotein wurde zunächst gegen Phosphatpuffer (50 mM Na-Phosphat, 50 mM NaCl, pH 8,0) dialysiert (MWCO 3500) und unter Verwendung des Ni-NTA Säulenmaterials unter nativen Bedingungen nach Protokoll des Herstellers affinitätschromatographisch gereinigt. Anschließend erfolgte ein weiterer Dialyseschritt gegen Phosphatpuffer (s.o.). Die Markierungs-Reaktionsansätze von bovinem Serumalbumin (BSA10, British BioCell International) und dem monoklonalen Maus anti-FLAG M2 IgG wurden gegen Bicarbonatpuffer dialysiert (MWCO 12.000-15.000). Nach Zentrifugation bei 4 °C und 16.000 x g für 20 min wurden die Präparationen fluorophormarkierten Proteins portioniert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Konzentration der markierten Proteinchargen wurde mit dem Micro BCA Assay bestimmt.

### 4.8.3 Analyse des Derivatisierungsgrades

Der Derivatisierungsgrad eines fluoreszenzmarkierten Proteins gibt Aufschluß darüber, wieviel Mol Farbstoff pro Mol Protein kovalent gekoppelt wurden. In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine Abschätzung der Farbstoffbeladung durch Absorptions-Spektrometrie. Die Absorption von 80 µl einer verdünnten Lösung des markierten Proteins (je ca. 0,1 mg/ml) wurde im Spektralphotometer bei 200-700 nm analysiert. Hierfür wurde eine Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet. Bei einem Lichtweg von 1 cm errechnet sich der Derivatisierungsgrad (DOL) nach:

$$DOL = \frac{A_{\max} / \epsilon_{\max}}{A_{\text{prot}} / \epsilon_{\text{prot}}}$$

$A_{\max}$	Absorption des Farbstoffes bei seinem Absorptionsmaximum
$\epsilon_{\max}$	Extinktionskoeffizient des Farbstoffes ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) bei seinem Absorptionsmaximum
$A_{\text{Prot}}$	Absorption des Proteins bei 280 nm
$\epsilon_{\text{Prot}}$	Extinktionskoeffizient des Proteins ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) bei 280 nm

Da nicht nur Proteine, sondern auch die für die Kopplung verwendeten Fluorophore eine (geringe) Absorption bei 280 nm aufweisen, wird  $A_{\text{Prot}}$  über einen Farbstoff-spezifischen Korrekturfaktor (CF) aus der Absorption bei 280 nm berechnet:

$$\text{Da } A_{\text{Prot}} = A_{280} - A_{\max} \times CF$$

$A_{280}$	Gesamt-Absorption bei 280 nm
CF	Farbstoff-spezifischer Korrekturfaktor (gemäß Herstellerangabe)

ergibt sich:

$$DOL = \frac{A_{\max} \times \epsilon_{\text{prot}}}{(A_{280} - A_{\max} \times CF) \times \epsilon_{\max}}$$

Der Extinktionskoeffizient des rekombinanten PrP90-231 ( $\epsilon_{\text{PrP}} = 25580 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) und der von BSA ( $\epsilon_{\text{BSA}} = 46050 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) wurde nach der Methode von Gill *et al.* berechnet [158]. Die Farbstoff-spezifischen Werte  $A_{\max}$  und  $\epsilon_{\max}$  sowie der Extinktionskoeffizient von IgG ( $\epsilon_{\text{IgG}} = 210000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) waren den Angaben der Hersteller zu entnehmen.

## 4.9 Bindungsstudien mit Bakterien

Die Fähigkeit von gentechnisch veränderten Bakterien, fluorophormarkiertes PrP90-231 über einen AIDA-vermittelt auf ihrer Oberfläche exponierten PrP-Liganden zu adsorbieren, wurde durch ‚Pull-Down-Assays‘ mit nachfolgender fluoreszenzoptischer Analyse der Bakterien untersucht. Als Positivkontrolle dienten Bakterien, die -ebenfalls AIDA-vermittelt- das Flag-Epitop exponierten und so mit dem monoklonalen Maus anti-Flag M2 Antikörper ( $\alpha$ -Flag) spezifisch nachgewiesen werden konnten. Nicht transformierte Bakterien (Wildtyp) bzw. *E. coli*, die den pMK90-kodierten Autotransporter ohne Insertionen exprimierten, wurden als Negativkontrollen verwendet.

### 4.9.1 Pull-Down Assay

Hauptkulturen (10 ml) wurden bis zum Erreichen einer  $OD_{600}$  von ca. 0,6 bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Kulturen wurden für circa 10 min auf Eis gekühlt, um ein weiteres Wachstum zu unterbinden. Alle folgenden Behandlungen erfolgten ebenfalls auf Eis oder bei 4 °C. Die Bakterien wurden 2x in sterilem SIF-Puffer gewaschen (3000 x g, 5 min, 4 °C) und auf eine  $OD_{600}$  von 10 eingestellt. Von den Suspensionen wurden anschließend je zwei Portionen von 50  $\mu$ l abgenommen, in ein frisches 2 ml-Rundboden-Mikroreaktionsgefäß überführt und mit 250  $\mu$ l SIF/1 % (w/v) Casein versetzt. Nach 1 h Inkubation der aufrecht stehenden Reaktionsgefäße bei 4 °C und 30 rpm wurde zu jeweils einem der zwei identischen Ansätze der zu untersuchende Ligand (markiertes PrP90-231 bzw.  $\alpha$ -Flag mAb, s.u.) zugegeben; die Ansätze wurden dann für eine weitere Stunde bei 4 °C im Dunklen inkubiert. Durch mehrere Wasch-Schritte wurde nicht gebundenes Protein abgetrennt. Die Bakterien wurden im Anschluss unter Nutzung unterschiedlicher Detektionsmethoden auf die Menge an adsorbiertem Material hin untersucht (s.u.).

#### 4.9.1.1 Bindungsanalyse im Dot Blot

Sollte der Bindungsnachweis durch Dot Blots erfolgen, wurde im Pull-Down Assay (s.o.) 0,5  $\mu$ g Alexa Fluor 680-markiertes PrP90-231 verwendet (PrP-680). Für die Positivkontrolle wurde 0,5  $\mu$ g unmarkierter anti-Flag Antikörper ( $\alpha$ -Flag) eingesetzt.

Die Bakteriensuspensionen wurden nach der einstündigen Inkubation mit dem jeweiligen Liganden in SIF-Puffer gewaschen. Hierfür wurden die Bakterien 6x bei 3000 x g und 4 °C für 5 min sedimentiert und in je 500  $\mu$ l frischem Puffer resuspendiert. Nach dem letzten Wasch-Schritt wurde der Überstand quantitativ entfernt, die Bakterien in 50  $\mu$ l BugBuster Reagenz aufgenommen und für 20 min bei RT und 30 rpm auf einem Wippschüttler lysiert. Von jedem Lysat wurden je 2  $\mu$ l in Quadruplikaten auf eine Nitrocellulosemembran getüpfelt.

Die Membranen wurden getrocknet. Für die PrP-Bindungsstudien mit direkt markiertem Prionprotein wurden die Membranen kurz mit PBS befeuchtet und im Odyssey Infrared Imager ausgewertet. Für den Nachweis der  $\alpha$ -Flag Bindung wurde der Blot nach dem Blockieren unspezifischer Bindungsstellen in 1 % (w/v) Casein in D-PBS (2 h) für 1 h mit 0,2  $\mu\text{g/ml}$   $\gamma\text{m-680}$  inkubiert. Nach dem Waschen des Blots (6x 5-10 min in D-PBS/0,1 % (w/v) Tween-20 und 2x 5-10 min in D-PBS) konnte die Auswertung ebenfalls im Odyssey Infrared Imager erfolgen. Die Signalintensitäten der Dots wurden quantifiziert und als Mittelwert der Quadruplikate ausgedrückt.

#### **4.9.1.2 Durchflusszytometrische Analyse der PrP-Bindung an Bakterien**

Sollte die Analyse der PrP-Adsorption durch Bakterien im Durchflusszytometer (FACSCalibur) erfolgen, wurden im Pull-Down Assay 0,5  $\mu\text{g}$  des 5-/6-Carboxyfluorescein-markierten PrP90-231 (PrP-Fam) verwendet. Zum Nachweis des AIDA-vermittelt exponierten Flag-Peptids dienten 0,5  $\mu\text{g}$  des 5-/6-Carboxyfluorescein-markierten  $\alpha$ -Flag mAb ( $\alpha$ -Flag-Fam).

Die Bakterien wurden 2x mit SIF-Puffer gewaschen und anschließend in 800  $\mu\text{l}$  sterilfiltriertem SIF aufgenommen. 50  $\mu\text{l}$  hiervon wurden zu 1 ml sterilfiltriertem SIF gegeben und die Bakteriensuspensionen wurden durchflusszytometrisch analysiert. Es wurden je 10.000 ‚Ereignisse‘ bei einer Flußrate von ca. 500 Ereignissen pro Sekunde ausgewertet. Die Analyse der Bakterien erfolgte bezüglich ihrer Eigenschaften im FSC-Modus (forward-scatter, Vorwärts-Streulicht) als Maß für die Partikelgröße und im FL1-Modus (Messung der Fluoreszenzintensität bei 530 nm, Detektion von Carboxyfluorescein) als Maß für die Ligandenbindung. Die Einstellungen des FACSCalibur (Kompensation, Verstärkung und Schwellenwerte) wurden dabei für alle Experiment konstant gehalten. Die Aquisition der Daten erfolgte mit der Cell Quest Pro Software. Zur Auswertung wurde die frei zugängliche WinMDI Software (Version 2.8) genutzt.

#### **4.10 Analyse der Verdauungsstabilität von PrP-Liganden**

Die Sensitivität von isoliert vorliegenden peptidischen PrP-Liganden gegenüber intestinalen Proteasen wurde durch Inkubation der gelösten Peptide in Enzympräparationen und nachfolgende Degradationsanalyse im ELISA-Format bestimmt. Die Stabilität eines Liganden im AIDA-Kontext wurde durch die Behandlung der modifizierten Bakterien mit Proteasen untersucht.

#### 4.10.1 Untersuchung der Proteolyse-Sensitivität von Peptiden

Zur Bestimmung der Halbwertszeit von Peptiden in Intestinalflüssigkeiten oder Enzymlösungen wurde ein durch unsere Laborgruppe entwickeltes Verfahren angewandt [159]. Peptide der gewünschten Sequenz werden hierfür zusammen mit einer aminoterminalen 2,4-D-Markierung (2,4-Dichlorphenoxyessigsäure) und einer carboxyterminalen Biotin-Markierung synthetisiert und vom Celluloseträger abgespalten; beide Markierungen sind dabei durch Abstandhalter (Spacer) von der zu analysierenden Peptidsequenz getrennt.

Die Peptide werden in einer nichtbindenden Mikrotiterplatte mit Enzymlösungen in Kontakt gebracht; bei konstant bleibender Peptidmenge wird dabei eine Verdünnungsreihe der Enzymlösung (1:3) angefertigt. Nach 90 min wird die Reaktion durch Zugabe von Proteaseinhibitoren und Inaktivieren der Proteasen durch 20minütiges Erhitzen auf 90 °C gestoppt. Gespaltenes und ungespaltenes Peptid wird dann über die aminoterminalen 2,4-D Markierung selektiv auf einer mit einem anti-2,4-D Antikörper beschichteten Mikrotiterplatte immobilisiert. Nur nichtdegradiertes Peptid behält die C-terminale Biotin-Markierung bei und bindet im nachfolgenden Inkubationsschritt das zugegebene HRP-markierte Streptavidin, das wiederum durch eine Farbreaktion nachgewiesen wird. Durch nicht-lineare Regression der erhaltenen OD-Werte an die im Folgenden dargestellte, aus der Michaelis-Menten-Gleichung abgeleiteten Formel kann die Halbwertszeit (HWZ) eines Peptids in Sekunden errechnet werden [159]:

$$y = (a - b) \times 0,5^{\left(\frac{t \times x}{t_{1/2}}\right)} + b$$

**Konstante:** t = 5400 s (90 min)

**Variablen:** y = OD 450nm

x = Verdünnung der Enzympräparation

**Parameter:** a = ungespaltenes Peptidsubstrat

b = vollständig gespaltenes Peptidsubstrat  
(Hintergrund)

t<sub>1/2</sub> = Halbwertszeit (HWZ)

Um eine möglichst gute Annäherung an die *in vivo*-Situation zu erreichen, wurde statt artifizierender Enzymlösungen eine Dünndarm-Lavage von Balb/c Mäusen verwendet. Der Verdünnungsfaktor der Lavage-Flüssigkeit wurde durch IgA Standardisierung bestimmt (unveröffentlicht; Dr. Steffen Bade, PD. Dr. Andreas Frey), somit konnte durch Extrapolation der Werte die theoretische Halbwertszeit der Peptide im Dünndarmlumen bestimmt werden.

#### 4.10.2 Proteasebehandlung von Bakterien

Zur Untersuchung der Proteasestabilität von AIDA-exponierten PrP-Liganden wurden die gentechnisch modifizierten Bakterien für definierte Zeitspannen in muriner Dünndarm-Lavage inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch oder im Dot Blot auf die verbliebene Bindungsaktivität für spezifische Antikörper bzw. für PrP hin untersucht.

Die Vorbereitung der Bakterien erfolgte wie in Abschnitt 4.9 für die PrP-Bindungsstudien mit Bakterien beschrieben. Der SIF-Puffer zum Waschen der Kulturen und zum Einstellen auf eine OD<sub>600</sub> von 10 wurde mit 1 mM CaCl<sub>2</sub> supplementiert. Vor Reaktionsstart durch Enzymzugabe wurden alle verwendeten Reagenzien und die Bakteriensuspensionen auf 37 °C erwärmt. 250 µl der Bakteriensuspensionen (OD<sub>600</sub>= 10) wurden sedimentiert und im gleichen Volumen der vorgewärmten Lavage-Flüssigkeit aufgenommen. Die Ansätze wurden bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Nach definierten Zeitintervallen (zwischen 0,5 und 20 min) wurden Proben (50 µl) entnommen und zum Terminieren der proteolytischen Reaktionen in 950 µl eisgekühltes SIF-FBS (SIF-Puffer, supplementiert mit 10 % fötalem Rinderserum (FBS)) eingemischt. Die Bakterien wurden anschließend 2x in 500 µl kaltem SIF-FBS gewaschen und sedimentiert. Für die Analyse der PrP-Bindung im Durchflusszytometer wurde die Bakterien in 250 µl SIF/1 % (w/v) Casein aufgenommen und wie unter Punkt 4.9.1.2 beschrieben weiterverarbeitet. Zur Degradations-Analyse im Dot Blot wurden die Bakterien in 50 µl BugBuster Reagenz aufgenommen und für 20 min bei RT und 30 rpm auf einem Wippschüttler lysiert. Je 2 µl der bakteriellen Lysate wurden anschließend in Duplikaten auf eine Nitrocellulosemembran getüpfelt.

Als Negativkontrolle dienten Ansätze, die ohne Enzymzusatz inkubiert wurden bzw. unmodifizierte AIDA-exprimierende *E. coli* für die Kontrolle der spezifischen PrP-Bindung im Pull-Down Assay. Die Kontroll-Ansätze wurden in Bezug auf die Wasch-Schritte identisch behandelt.

#### 4.11 Analyse der PrP-Bindung von Peptiden im ELISA

Die Peptide wurden in mehrfacher Ausfertigung durch Spot-Synthese hergestellt und besaßen eine N-terminale Biotin-Markierung, die zum Nachweis mit HRP-markiertem Streptavidin genutzt werden kann.

Jede zweite Reihe von hochbindenden Mikrotiterplatten wurde mit 75 µl pro Kavität einer Lösung von 10 µg/ml PrP101-231 in L-PBS für ca. 16 h bei 4 °C behandelt. Anschließend wurden alle Kavitäten 3x mit 300 µl D-PBS/0,05 % (w/v) Tween-20 (Waschpuffer) pro Kavität gewaschen und mit 250 µl D-PBS/1 % (w/v) Magermilch (1 % Blotto) pro Kavität abgesättigt. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 6 h bei RT wurde erneut 3x mit 300 µl Waschpuffer pro Kavität gewaschen.

Die Peptide wurden als serielle Verdünnung (1:2) in 75 µl 1 % Blotto/0,005 % (w/v) Tween-20 aufgetragen mit einer Startmenge von ¼ Spot (25 µl der Peptid-Stammlösung) in der ersten Kavität. Hierfür wurden in Spalten 3-11 je Kavität 75 µl 1 % Blotto/0,005 % (w/v) Tween-20 vorgelegt. In Spalte 2 wurden je Kavität 100 µl D-PBS/1,5 % (w/v) Magermilch/0,005 % (w/v) Tween-20 vorgelegt, mit 50 µl der Peptid-Stammlösung versetzt, durchmischt und mit 75 µl bis zur Spalte 10 (1:2) seriell verdünnt. Für jedes Peptid wurden 2 Verdünnungsreihen angefertigt, wobei für jeweils eine Verdünnungsreihe nicht PrP-beschichtete Kavitäten verwendet wurden. Diese Verdünnungsreihe diente zur Bestimmung der unspezifischen und konzentrationsabhängigen Anheftung des Peptids an die Mikrotiterplatte. Die Platten wurden ÜN bei 4 °C für 16 h inkubiert und anschließend 6x mit 300 µl Waschpuffer gewaschen. Nach Inkubation mit 75 µl Streptavidin-HRP pro Kavität (1 µg/ml in 1 % Blotto) für 60 min bei RT wurde wiederum 6x mit Waschpuffer gewaschen und anschließend 75 µl TMB-Substratlösung pro Kavität zugegeben. Nach genau 30 min wurde die Farbentwicklung durch Zugabe von 125 µl 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pro Kavität gestoppt, und die Absorption bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 450 \text{ nm}$  mit dem Versa Max ELISA-Reader gemessen.

#### **TMB-Substratlösung nach Frey *et al.* [160]**

##### **250 mM Kaliumcitratpuffer**

52,5 g Zitronensäure × H<sub>2</sub>O  
ad 1000 ml A. bidest.  
mit KOH auf pH 4,0 eingestellt, sterilfiltriert

##### **50 mM TBABH**

12,9 mg TBABH  
987 µl Dimethylacetamid

##### **Lösung A**

(205 mM Kaliumcitratpuffer, pH 4,0  
× 3,075 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

172,2 ml Kaliumcitratpuffer  
ad 210 ml A. bidest.  
66 µl 30 % (w/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

##### **Lösung B**

(41 mM TMB × 8,2 mM TBABH  
in Dimethylacetamid)

52,2 mg TMB  
4,38 ml Dimethylacetamid  
868 µl 50 mM TBABH

Lösung A wurde bei 4 °C gelagert. Lösung B wurde in Mikroreaktionsgefäßen mit geringem Luftvolumen verschlossen; die Gefäße wurden in Gegenwart von Trockenmittel bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahrt.

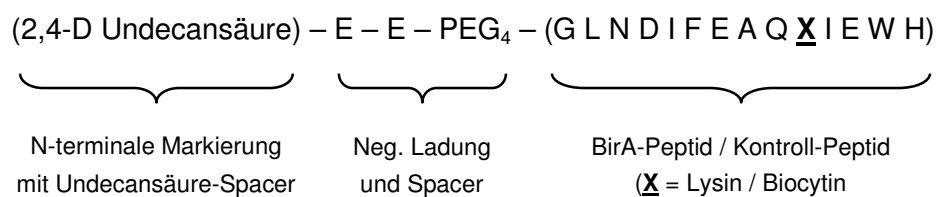
##### Ansetzen der Substratlösung:

Portionen von Lösung A und B wurden auf RT angewärmt. Circa 10 min vor der Verwendung wurden 25 µl Lösung B pro 1 ml Lösung A zugegeben, gemischt und im Dunklen vorgehalten.

## 4.12 Untersuchung der Biotinylierung von Peptiden durch BirA

Es wurden zwei Peptidkonstrukte durch Spot-Synthese hergestellt, die am Aminoterminus das Hapten 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) trugen. 2,4-D wurde zum Immobilisieren der Peptide auf einer Mikrotiterplatte über den anti-2,4-D Antikörper genutzt. Das 14mer BirA-Minimalsubstrat mit der Aminosäuresequenz GLNDIFEAQXIEWH enthält ein Lysin (K), das durch die BirA Biotin Protein Ligase in einer ATP-abhängigen Reaktion zu Biocytin umgesetzt wird [161]. Bei dem zusätzlich synthetisierten Kontroll-Peptid wurde das Lysin durch Biocytin ersetzt.

### Peptidkonstrukt:



Die Peptide wurden vom Celluloseträger abgespalten, gefriergetrocknet und in 100 µl 10 mM Tris (pH 8,0)/0,005 % (w/v) Tween-20 pro Spot aufgenommen; die Menge von insgesamt 10 Spots wurde dabei vereinigt. Alle Proteine, die auf ihre inhibitorische Wirkung hin getestet werden sollten, wurden direkt in 10 mM Tris-Puffer (pH 8,0) gelöst oder vor ihrer Verwendung gegen diesen Puffer dialysiert.

### Verwendete Puffer und Lösungen:

<b>Biomix A (Avidity)</b>	<b>Biomix B (Avidity)</b>	
0,5 M Bicine Buffer	100 mM	ATP
pH 8,3	100 mM	MgOAc
	500 µM	Biotin

### 4.12.1 Durchführung der Konkurrenzexperimente

Für die Durchführung der Konkurrenzexperimente wurde das Enzym BirA (250 Units pro 10 µl-Ansatz) in 10 mM Tris-Puffer (pH 8,0) zusammen mit dem zu testenden Kompetitor in einem 0,5 ml Mikroreaktionsgefäß vorgelegt (4 µl Gesamtvolumen pro Ansatz). PrP90-231 wurde in einer Konzentration von 15 µM (0,28 µg/µl) zugesetzt; die zugegebene Menge der anderen analysierten Proteine (PrP101-231, BSA und Ovalbumin) wurde hieran angepasst und ebenfalls auf 0,28 µg/µl festgelegt. Das Peptidsubstrat wurde zusammen mit Biomix A und Biomix B als ‚Mastermix‘ für alle Ansätze gemeinsam vorbereitet.



Mastermix (Mengen für 1 Ansatz):

BirA-Peptidsubstrat	4 µl
Biomix A	1 µl
Biomix B (1:3,33)	1 µl

Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe von 6 µl Mastermix zu den vorbereiteten, Enzym- und Kompetitorhaltigen Ansätzen und Überführung in einen Heizblock. Die Ansätze wurden bei 30 °C inkubiert; nach 15 min wurden Proben entnommen, die 1:200 in SIF/0,005 % (w/v) Tween-20 verdünnt wurden. Sowohl durch die starke Verdünnung in Natriumchlorid-haltigem Puffer als auch durch den nachfolgenden 20minütigen Inkubationsschritt bei 90 °C wurde die enzymatische Biotinylierung gestoppt und BirA inaktiviert. Die Proben wurden anschließend sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für eine eventuelle längerfristige Aufbewahrung bei -80 °C gelagert. Als Positivkontrolle und zur Definition der maximalen Biotinylierungseffizienz (100 %-Wert) dienten in jedem Experiment zwei mitgeführte nichtkompetitive Ansätze.

**4.12.2 Analyse der Biotinylierungsreaktionen im Immunoassay**

Hochbindende Mikrotiterplatten wurden ÜN bei 4 °C mit 75 µl pro Kavität einer 50 ng/ml Lösung anti-2,4-D Antikörper in L-PBS beschichtet und anschließend mit 3x 300 µl pro Kavität D-PBS/0,05 % (w/v) Tween-20 (Waschpuffer) gewaschen. Unspezifische Protein-Bindungsstellen wurden durch eine mindestens sechstündige Inkubation mit 250 µl pro Kavität D-PBS/1 % (w/v) Casein abgesättigt. Die Platten wurden 3x mit D-PBS gewaschen, wobei der Puffer im letzten Wasch-Schritt nicht abgesaugt wurde, und bis zur Verwendung für maximal eine Woche bei 4°C gelagert. Vor dem Auftragen der Proben wurden die Platten 3x mit Waschpuffer gewaschen. 75 µl der aufgetauten, verdünnten Biotinylierungsansätze wurden in Triplikaten auf die Platte aufgebracht. Nach 2,5 h Inkubation bei RT und 4-maligem Waschen mit Waschpuffer wurden 75 µl pro Kavität einer 1 µg/ml Lösung Streptavidin-HRP in D-PBS/1 % (w/v) Casein aufgetragen und die Platten für 60 min bei RT inkubiert. Der Nachweis von gebundenem Streptavidin-HRP und damit der Nachweis einer erfolgreichen BirA-katalysierten Peptidbiotinylierung erfolgte durch Farbreaktion (30 min) mit dem TMB-Substratsystem (s. Abschnitt 4.11 ), nachdem die Platten weitere 6x mit Waschpuffer gewaschen worden waren. Die Absorption wurde bei 450 nm im Versa Max ELISA-Reader gemessen.

### 4.13 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden in einer sterilen Werkbank durchgeführt. Zellkulturmedien und Waschpuffer wurden vor dem Gebrauch in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die Bezeichnung ‚PBS‘ kennzeichnet die Verwendung von käuflich erworbenem, sterilem Dulbecco's PBS (ohne Ca & Mg).

#### 4.13.1 Kultivierung von Caco-2<sub>BBE1</sub>-Zellen

Die Zell-Linie Caco-2<sub>BBE1</sub> wurde in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen mit 15 ml Medium bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Die adhärent wachsenden Zellen wurden bei Erreichen von 80-90 % Konfluenz passagiert. Hierfür wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden 4 ml Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben und die Kolben zum Benetzen des Zellrasens kurz geschwenkt. Nach ca. 1 min wurden 2 ml der Flüssigkeit abgenommen und die Zellen für weitere 5-10 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit insgesamt 15 ml frischen Mediums abgeschwemmt und in ein steriles Gefäß überführt. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden frische Kulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) mit ca. 1 x 10<sup>6</sup> Zellen beimpft. Für die Verwendung in Bindungsstudien wurden 6-Loch Platten mit ca. 3 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Kavität beimpft. Die Zellzahl-Bestimmung erfolgte mit Hilfe einer modifizierten Neubauer Zählkammer.

#### Caco-2<sub>BBE1</sub> Zellkulturmedium

DMEM (high glucose (4,5 g/l)), ohne L-Glutamin, mit Natriumpyruvat)-Medium wurde in den Originalflaschen mit 2 mM L-Glutamin, 10 % fötalem Kälberserum, 10 µg/ml humanem Transferrin, 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin supplementiert. Das Medium wurde bei 4 °C gelagert.

#### 4.13.2 Bindungsstudien mit Caco-2<sub>BBE1</sub> Zellen

Für Bindungsstudien mit PrP wurden in 6-Loch Platten kultivierte Zellen zwei Wochen nach Erreichen der Konfluenz genutzt. Die Zellen wurden 3x mit 3 ml PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml PBS überschichtet. Nach Zugabe der Kompetitoren (0,2 mM Biocytin, 10 µg/ml PrP90-231 oder 10 µg/ml PrP101-231) und Inkubation im Brutschrank bei 37 °C für 30 min wurde der Überstand abgenommen und erneut 2 ml PBS pro Kavität zugegeben. Nach erneuter Zugabe derselben Kompetitoren wurde 1 µg/ml Alexa Fluor 680-markiertes PrP90-231 und/oder dieselbe molare Menge Alexa Fluor 680-markiertes BSA (3,6 µg/ml) zugesetzt und die Zellen wiederum für 30 min im Brutschrank inkubiert. Der Überstand wurde entfernt, die Zellen 6x mit 4 ml PBS gewaschen und in Lysispuffer geerntet. Hierfür wurde pro Kavität 200 µl eisgekühlter Lysispuffer zugegeben und der Zellrasen mit Hilfe eines Zellschabers vom Plattenboden abgeschabt.

Die Suspension wurde in ein Mikroreaktionsgefäß überführt und jede Kavität mit weiteren 200 µl Lysispuffer nachgespült. Die Suspensionen wurden vereinigt und durch Pipettieren gemischt. Nach 60 min Inkubation auf Eis wurden die Lysate bei 16.000 x g und 4 °C für 20 min zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Gefäß überführt.

**Lysis-Puffer (sterilfiltriert)**

50 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
150 mM	NaCl
0,5 %	Na-Deoxycholat
0,5 %	Triton X-100
1x	Proteaseinhibitor-Lösung

**4.13.2.1 Analyse der Zell-Lysate**

Nach Bestimmung der Gesamt-Proteinkonzentration (Micro BCA Assay) wurden je 50 µg der Lysate auf SDS-Polyacrylamidgele (10 % Polyacrylamid) aufgetragen. Die Gele wurden nach der Elektrophorese im Odyssey Infrared Imager analysiert (Detektion der ‚in-Gel Fluoreszenz‘ des Fluorophor-markierten PrP90-231 bzw. des markierten BSA) und die Fluoreszenz-Intensitäten wurden mit Hilfe der Odyssey Application Software quantifiziert.

Anschließend wurden die Gele zur unspezifischen Anfärbung aller Proteinbanden mit Coomassie Brilliant Blue behandelt und dokumentiert. Von jeder Bahn wurde die Farbintensität zweier Referenzbanden mit Hilfe der Image J-Software quantifiziert. Die Intensität der Referenzbanden in Coomassie-gefärbten Gelen wurde zur Normalisierung der ‚in-Gel Fluoreszenz‘-Signale genutzt.

## 5 Ergebnisse (Teil I)

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung von Bakterien, die, vermittelt durch den AIDA Autotransporter, PrP-Liganden auf ihrer Oberfläche präsentieren und dadurch potentiell als Prion-spezifische Enterosorbenzien verwendet werden könnten.

Hierfür wurden zunächst Prionprotein-Fragmente heterolog in *E. coli* exprimiert, gereinigt und mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Das so hergestellte fluorophorgekoppelte PrP wurde zur Kartierung linearer Bindestellen putativer PrP-Liganden genutzt. Identifizierte Peptidliganden wurden im Anschluss auf ihre PrP-adsorptiven Fähigkeiten im bakteriellen System untersucht.

### 5.1 Herstellung rekombinanter muriner Prionprotein-Fragmente

Die zu entwickelnden bakteriellen Adsorbenzien sollen oral aufgenommene Prionen neutralisieren. Wie in Abschnitt 2.1.2 beschrieben, wird PrP<sup>sc</sup> im Zuge der Gastrointestinalpassage durch partielle Hydrolyse zu einem proteaseresistenten Kernprotein degradiert. Um nur PrP-Binder mit Bindungsloкус in diesem C-terminalen, globulär organisierten Kernbereich zu erfassen, wurden die rekombinanten Prionproteine in aminoterminal deletierter Form exprimiert.

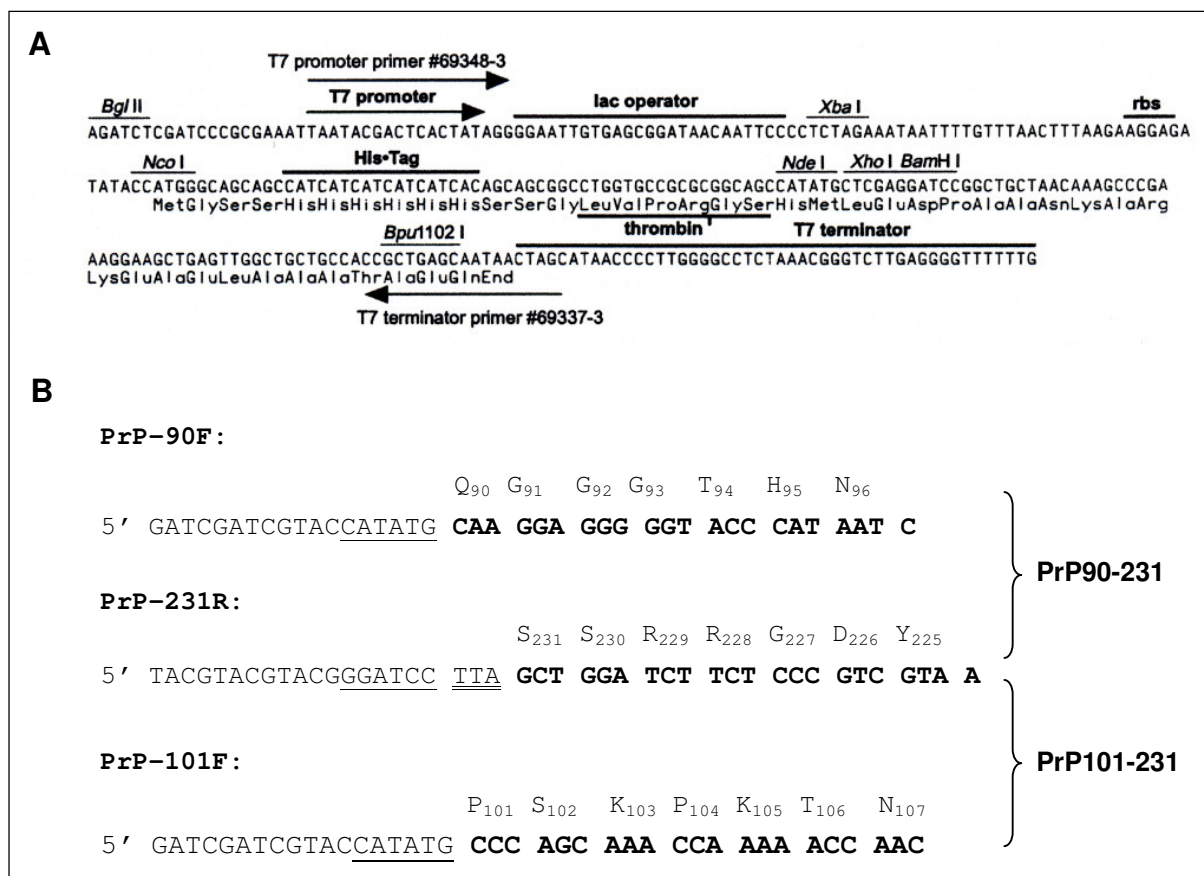
#### 5.1.1 Plasmidkonstrukte und exprimierte Proteine

Der uns von unserem Kooperationspartner Dr. Michael Baier zur Verfügung gestellte Expressionsvektor pET-15b-(PrP90-231) enthält die kodierende Sequenz für die Aminosäuren (aa) 90-231 des murinen Prionproteins (SwissProt Accession No. AAH06703), die über die Restriktionsschnittstellen NdeI (5') und BamHI (3') des Vektors eingefügt worden war. Die kodierende Sequenz einer aminoterminal um weitere 11 aa verkürzten Prionprotein-Deletionsmutante PrP101-231 (aa 101-231) wurde durch PCR mit dem pET-15b-(PrP90-231)-Plasmid als Template amplifiziert. Die hierfür verwendeten Primer sind in Abb. 5.1 dargestellt. Das PCR-Produkt und der Vektor pET-15b wurden mit den Restriktionsendonukleasen NdeI und BamHI hydrolysiert und beide DNA-Fragmente wurden gereinigt. Nach der Ligation des Inserts in den Vektor wurde das Plasmid in chemisch kompetente *E. coli* C600 transformiert. Das Plasmid wurde durch Minipräparation isoliert und die korrekte Insertion des DNA-Fragments in das Leseraster sowie die Abwesenheit von Mutationen wurden durch Sequenzierung bestätigt. Anschließend wurde das pET-15b-(PrP101-231)-Plasmid in den *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE3) transformiert.

Der für die Amplifikation von PrP90-231 und PrP101-231 verwendete ‚reverse Primer‘ PrP-231R enthält ein Stopcodon, so dass die exprimierten Proteine carboxyterminal keine

vektorkodierten Aminosäuren beinhalten. Das Startcodon hingegen wird bei beiden Plasmidkonstrukten von pET-15b bereitgestellt, was zur Expression eines Fusionsproteins mit dem N-terminalen, vektorkodierten Sequenzmotiv MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHM (21 aa) führt. Das Hexahistidin-Motiv („His-Tag“) hierin wurde zur affinitätschromatographischen Reinigung der rekombinanten Prionprotein-Spezies über Ni-NTA-Agarose und zum spezifischen Nachweis der Proteine mit dem  $\alpha$ -His<sub>6</sub>-800 Antikörper genutzt.

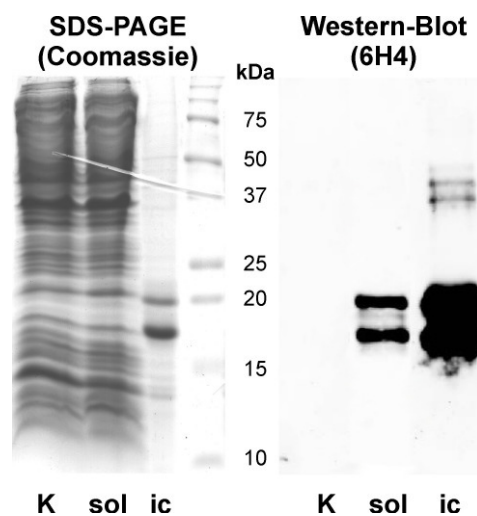
Das rekombinante Protein PrP90-231 umfasst insgesamt 163 aa und besitzt ein berechnetes Molekulargewicht von 18523,6 Dalton. Für die N-terminal deletierte Variante PrP101-231 wurde bei einer Länge von 152 aa ein Molekulargewicht von 17315,3 Dalton errechnet. Die DNA-Sequenzen und die deduzierten Aminosäuresequenzen beider Proteine sind im Anhang (Abschnitt 9.1.1) dargestellt.



**Abbildung 5.1: Konstruktion der Prionprotein-Expressionsplasmide.** A: ‚Multiple Cloning Site‘ des Vektors pET-15b (entnommen aus dem Technical Bulletin TB045, Merck Biosciences/Novagen). B: Primer zur Darstellung von PrP90-231 (aus muriner cDNA) und von PrP101-231 (aus pET-15b-(PrP90-231)). Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind einfach unterstrichen (forward Primer: NdeI, reverse Primer: BamHI), während das artifiziiell eingefügte Stopcodon mit doppelter Linie unterstrichen wurde. Die kodierenden Sequenzen aus PrP wurden fett gedruckt (die deduzierten Aminosäuresequenzen sind oberhalb der Primersequenz dargestellt; die Nummerierung bezieht sich auf SwissProt Accession No. AAH06703).

### 5.1.2 Heterologe Expression der rekombinanten PrP-Spezies

Die Proteine PrP90-231 und PrP101-231 wurden in *E. coli* BL21(DE3) heterolog exprimiert. Beide Proteine konnten in den Bakterienzellen effizient synthetisiert werden; die Akkumulation erfolgte jedoch zum Großteil in Form unlöslicher Einschlusskörperchen (‘inclusion bodies’, ic), während nur ein geringer Anteil in löslicher Form vorlag und in der cytoplasmatischen Fraktion lysierter Zellen nachgewiesen werden konnte. Abbildung 5.2 zeigt die repräsentative Analyse von bakteriellen Lysaten einer PrP90-231 Expressionskultur.

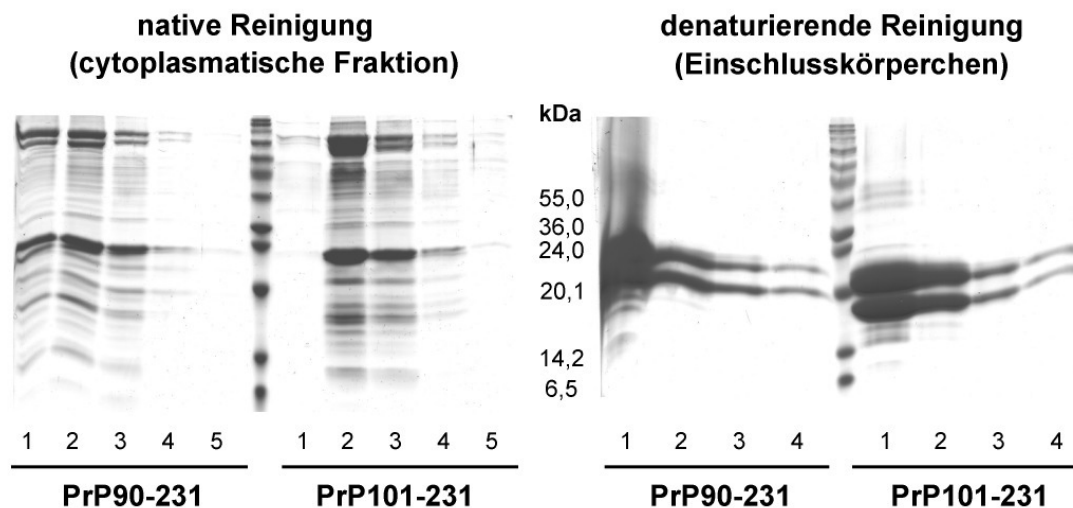


**Abbildung 5.2: Rekombinantes Prionprotein wird in *E.coli* BL21(DE3) effizient exprimiert und in Form unlöslicher Einschlusskörperchen akkumuliert.** Geerntete Zellen einer PrP90-231 Expressionskultur wurden in BugBuster Reagenz (5 ml/g Feuchtwicht) lysiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand, der die löslichen Proteine aus dem Cytoplasma enthielt, abgenommen. Das Sediment wurde zweimal in 1:10 verdünntem BugBuster Reagenz (ohne Benzonase Nuclease) gewaschen und abschließend in demselben Volumen aufgenommen, das auch zur Zell-Lyse verwendet wurde. Der Überstand und die Suspension gewaschener Einschlusskörperchen wurden durch SDS-PAGE mit nachfolgender Coomassie-Färbung und durch Western Blot mit dem PrP-spezifischen Antikörper 6H4 (nachgewiesen mit  $\alpha$ m-680) analysiert; als Kontrolle diente ein Lysat nichtinduzierter Zellen. K: Kontrolle (15  $\mu$ l Lysat); sol: löslicher Überstand des Lysats der Expressionskultur (15  $\mu$ l); ic: resuspendierte Einschlusskörperchen (2  $\mu$ l).

Aufgrund der Anreicherung des rekombinanten Proteins in Einschlusskörperchen konnte bereits durch das zweimalige Waschen des sedimentierten Proteinmaterials der Hauptteil der kontaminierenden *E. coli*-Proteine entfernt werden. Lösliches rekombinantes Protein der cytoplasmatischen Fraktion konnte nur im Western Blot detektiert werden.

### 5.1.3 Reinigung der rekombinanten PrP-Spezies

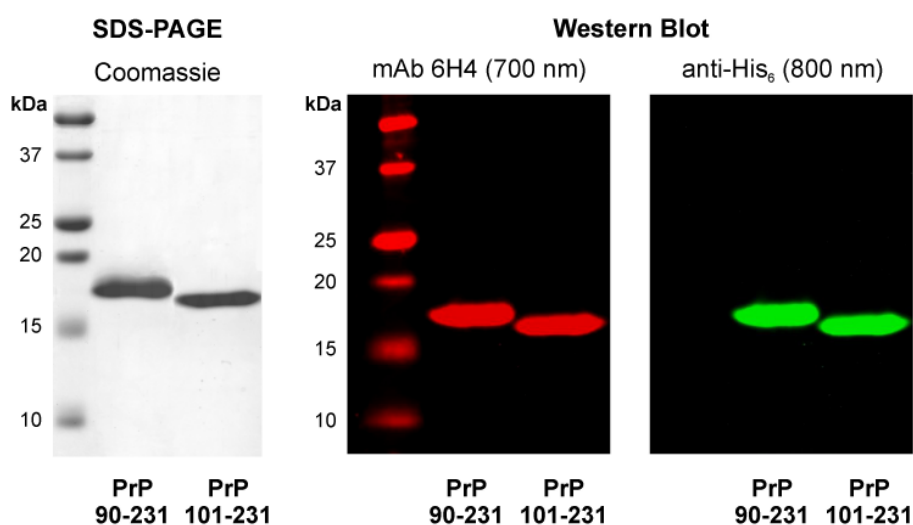
Die rekombinanten Prionprotein-Spezies sollten über ihren N-terminalen Hexahistidin-Tag affinitätschromatographisch gereinigt werden. Die native Reinigung von löslichem PrP aus der cytoplasmatischen Fraktion verlief jedoch sehr ineffizient, während durch Reinigung des Proteinmaterials aus Einschlusskörperchen unter denaturierenden Bedingungen hohe Ausbeuten mit größerer Reinheit erzielt werden konnten (s. Abb. 5.3).



**Abbildung 5.3: Reinigung von PrP90-231 und PrP101-231 über Ni-NTA-Agarose unter nativen und unter denaturierenden Bedingungen.** 300 ml-Expressionskulturen wurden geerntet und die Zellen lysiert. PrP aus dem löslichen Überstand wurde unter nativen Bedingungen nach Herstellerangabe über Ni-NTA-Agarose gereinigt und in fünf 0,5 ml-Fractionen eluiert (links). Das in der unlöslichen Fraktion (Einschlusskörperchen) enthaltene PrP wurde denaturiert, unter denaturierenden Bedingungen gereinigt und in vier 1,5 ml-Fractionen eluiert (rechts). Je 15  $\mu$ l der Eluate wurden durch SDS-PAGE mit nachfolgender Coomassie-Färbung analysiert. Die native Reinigung von PrP90-231 und PrP101-231 verlief ineffizient: die Eluate enthielten nur wenig PrP und viel kontaminierendes *E. coli*-Protein. Die Reinigung von PrP aus Einschlusskörperchen resultierte in höheren Ausbeuten und höheren Eluat-Konzentrationen.

Für die präparative Reinigung rekombinanter PrP-Spezies im großen Maßstab wurden daher die Einschlusskörperchen als Proteinquelle verwendet. Diese wurden nach Lyse der Bakterienzellen und Ernte des unlöslichen Materials durch Zentrifugation in einem harnstoffhaltigen Puffer denaturiert. Das rekombinante Protein wurde unter denaturierenden Bedingungen affinitätschromatographisch gereinigt und anschließend durch Inkubation mit  $\text{Cu}^{2+}$  und Entfernen der denaturierenden Agenzien durch Dialyse gegen Bicarbonatpuffer (3 % (w/v)  $\text{NaHCO}_3$ , pH 8,3) renaturiert und rückgefaltet. Da das aus großen Kulturvolumina unter denaturierenden Bedingungen isolierte Prionprotein nicht frei von unerwünschten

kontaminierenden Proteinspezies war (s. auch Abb. 5.3), wurde nach Renaturierung der Proteine ein weiterer affinitätschromatographischer Reinigungsschritt unter nativen Bedingungen durchgeführt. Hierfür wurde das Material je einer Charge von PrP90-231 bzw. PrP101-231 verwendet. Die Proteine wurden nach Herstellerangaben in imidazolhaltigem Phosphatpuffer eluiert und anschließend gegen Phosphatpuffer (50 mM Na-Phosphat, 50 mM NaCl, pH 8,0) dialysiert. Die Konzentration der gereinigten PrP-Chargen (PrP90-231 und PrP101-231) wurde bestimmt und durch Verdünnung auf den nächstliegenden geraden Wert eingestellt (s. Tabelle 5.1). Die Identität der Proteine und die Reinheit der Präparationen wurde durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung, durch Western Blots mit spezifischen Antikörpern und durch Massenspektrometrie bestätigt.



**Abbildung 5.4: Analyse der PrP-Chargen.** Je 100 pmol PrP90-231 und PrP101-231 wurden einer Elektrophorese in SDS-Polyacrylamidgelen (12,5 % PA) unterzogen. Weder im Coomassie-gefärbten Gel (links) noch durch Detektion mit spezifischen Antikörpern im Western Blot (rechts) konnten kontaminierende Proteine oder PrP-spezifische Degradationsprodukte nachgewiesen werden. Der Western Blot wurde als ‚Two-Color-Assay‘ durchgeführt mit gleichzeitiger Zugabe des PrP-spezifischen Antikörpers 6H4 und des IRDye800-markierten  $\alpha$ -His<sub>6</sub>-800 Antikörpers. Als Sekundärantikörper zur Detektion des mAb 6H4 wurde  $\alpha$ m-680 verwendet. Der Protein-Molekulargewichtsstandard ist nur im 700 nm-Kanal sichtbar.

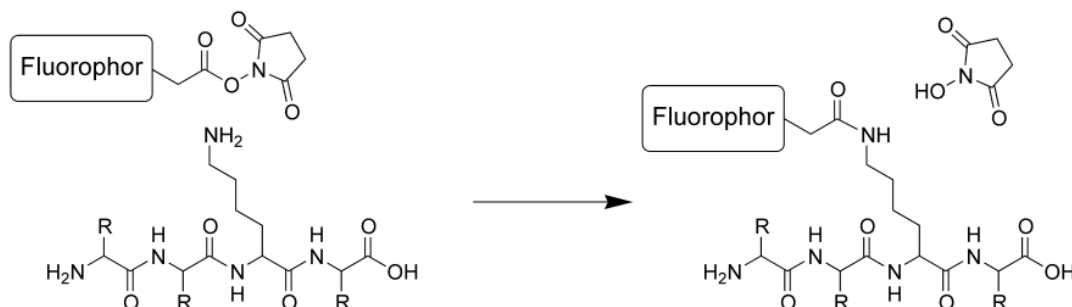
**Tabelle 5.1: Prionprotein-Chargen**

	Länge (aa)	M [g/mol]	c [mg/ml]	c [nmol/ml]
<b>PrP90-231</b>	163	18523,6	2	~ 108
<b>PrP101-231</b>	152	17315,3	1	~ 58



## 5.2 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen

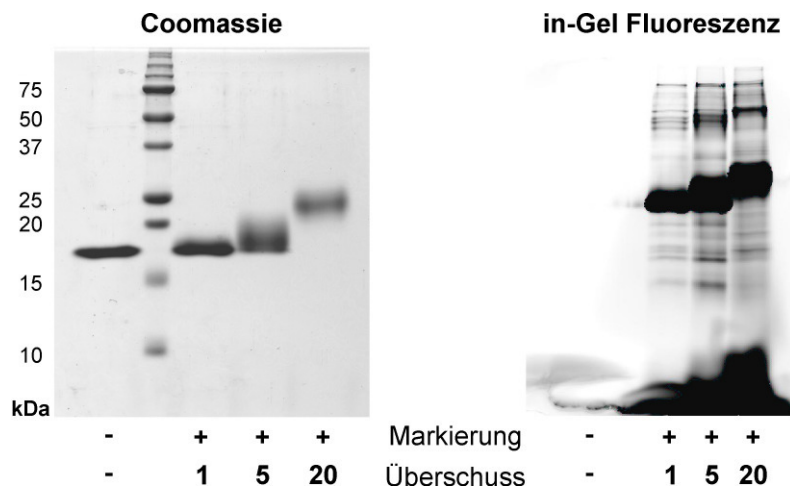
Um sowohl für die Detektion festphasengebundener Proteine und Peptide als auch für Bindungsstudien mit Bakterien ein hintergrundarmes, direktes Nachweissystem zu etablieren, wurden einige der zur Detektion bzw. als Kontrollen genutzten Proteine (PrP90-231 und BSA) und Antikörper ( $\alpha$ -Flag) mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Für im Odyssey Infrared Imager nachzuweisende Proteine wurde der Alexa Fluor 680 NHS Ester zur Kopplung verwendet, während Proteine für die Nutzung in durchflusszytometrischen Anwendungen mit dem 5-/6-Carboxyfluorescein NHS Ester umgesetzt wurden.



**Abbildung 5.5: Kopplung des N-Hydroxy-Succinimidyl-Esters eines Fluorophors an eine freie Aminogruppe eines Proteins.** Die deprotonierte Aminofunktion einer Lysin-Seitenkette reagiert über ihr freies Elektronenpaar mit dem Carbonyl-Kohlenstoff des NHS-Esters.

### 5.2.1 Etablierung der Markierungsreaktionen für PrP90-231

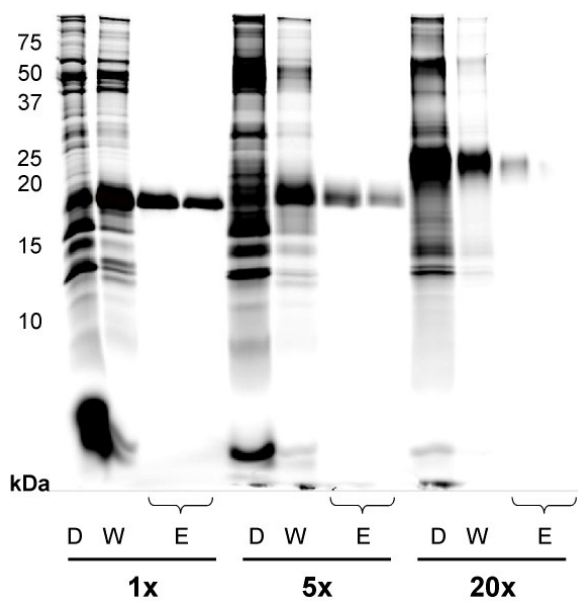
Es wurden unterschiedliche Protein:Fluorophor Verhältnisse (1:1 bis 1:20) getestet, da durch die relativen molaren Mengen die Kopplungseffizienz und damit der Derivatisierungsgrad des Proteins beeinflusst wird. Ziel war die Herstellung eines markierten Prionproteins, dessen Fluorophor-Beladung hoch genug ist, um einen sensitiven Nachweis zu ermöglichen, aber gleichzeitig niedrig genug ist, um die (Bindungs-) Eigenschaften des Proteins unbeeinflusst zu lassen. Abbildung 5.6 zeigt die elektrophoretische Analyse von Kopplungsansätzen mit unterschiedlichen (PrP90-231):(Alexa Fluor 680 NHS Ester) Verhältnissen. Da bei Verwendung von Alexa Fluor 680 sowohl alle Fluorophor-gekoppelten Proteinspezies als auch ungekoppelter und hydrolysierter bzw. Glycin-gekoppelter Farbstoff direkt durch ‚in-Gel Fluoreszenz‘ nachgewiesen werden können, wurde Alexa Fluor 680 zur Etablierung des Kopplungs-Verfahrens genutzt. Für die Markierungs-Reaktionen wurde unter denaturierenden Bedingungen gereinigtes und renaturiertes PrP90-231 ohne die zusätzliche native Reinigung durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie verwendet. Die Konzentration der PrP90-231 Charge, die für die Kopplungen verwendet wurde, betrug 1,2 mg/ml.



**Abbildung 5.6: SDS-PAGE von PrP90-231 Kopplungsansätzen.** PrP90-231 ( $c = 1,2 \text{ mg/ml}$ ) wurde im Verhältnis 1:1, 1:5 und 1:20 mit Alexa Fluor 680 NHS Ester umgesetzt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von Glycin (100-facher Überschuss relativ zum Fluorophor) und Inkubation ÜN gestoppt und die Ansätze zur Entfernung von Präzipitaten zentrifugiert. Von den Überständen wurde je  $1 \mu\text{l}$  durch SDS-PAGE analysiert; als Kontrolle (jeweils links im Gel) wurde  $1 \mu\text{g}$  gereinigtes PrP90-231 verwendet. Rechts ist die Analyse des ungefärbten Gels im Odyssey Infrared Imager gezeigt; die linke Abbildung zeigt die Dokumentation desselben Gels nach Coomassie-Färbung. Aufgrund der hohen Gesamt-Fluoreszenzintensität der Alexa Fluor 680 Kopplungsprodukte ist der Molekulargewichtsstandard bei Detektion der ‚in-Gel Fluoreszenz‘ kaum sichtbar.

Die deutlichen Veränderungen im Molekulargewicht der Haupt-Proteinbande bei Verwendung unterschiedlicher PrP-Fluorophor-Verhältnisse in der Kopplungsreaktion spiegeln den mit dem Farbstoff-Überschuss ansteigenden Derivatisierungsgrad des Proteins wider. Die geringere Farbintensität für Proteine mit höherem Derivatisierungsgrad in der Coomassie-Färbung deutet auf eine geringere Protein-Konzentration in diesen Ansätzen hin. Dies korrelierte mit der Menge an präzipitiertem Material, das durch Zentrifugation der Kopplungsansätze abgetrennt werden konnte: bei Verwendung eines äquimolaren Protein:Fluorophor-Verhältnisses waren kaum Ausfällungen nachweisbar, während der Einsatz höherer Fluorophor-Mengen zu vermehrter Präzipitation des markierten Prionproteins führte. Weiterhin deutet das diffuse Erscheinungsbild der PrP-Bande nach Inkubation mit 5- bzw. 20-fachem Alexa Fluor 680-Überschuss auf das Vorhandensein unterschiedlich stark derivatisierter Proteinspezies in den Präparationen hin. In der Aminosäuresequenz des exprimierten PrP90-231-Fusionsproteins finden sich acht Lysine, so dass das Protein zusammen mit der N-terminalen Aminogruppe über insgesamt neun freie Aminofunktionen verfügt, die -ihre Zugänglichkeit in der Tertiärstruktur des renaturierten Proteins vorausgesetzt- als Reaktionspartner für die Kopplung zur Verfügung stehen.

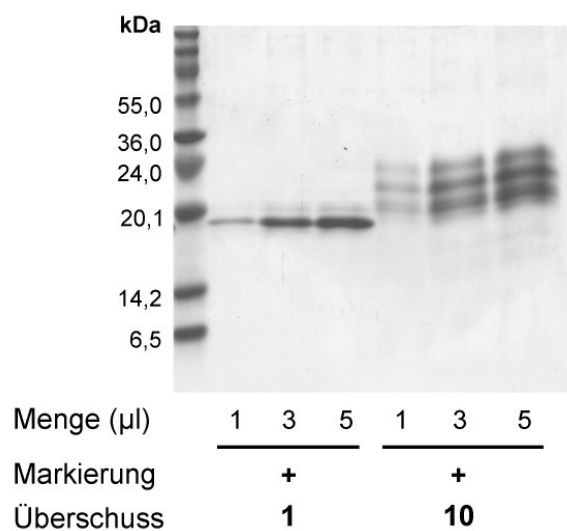
Wie die Analyse der in-Gel-Fluoreszenz in Abb. 5.6 zeigt, enthielten die Präparationen von markiertem PrP90-231 sowohl große Mengen an nicht proteingebundenem Fluorophor als auch fluoreszenzmarkierte Protein-Kontaminationen aus *E. coli*. Um beides vom Alexa Fluor 680-markierten PrP90-231, das im Folgenden als PrP-680 bezeichnet werden wird, abzutrennen, wurden die Präparationen unter nativen Bedingungen affinitätschromatographisch gereinigt. Hierbei wurde die Säulenmatrix in geringem Unterschuss eingesetzt, um die Bindung und Ko-Elution von kontaminierenden Proteinen zu minimieren.



**Abbildung 5.7: Reinigung von PrP-680 über Ni-NTA-Agarose.** Die in Abbildung 5.6 dargestellten Markierungsreaktionen wurden gegen Phosphatpuffer dialysiert und anschließend unter nativen Bedingungen über Ni-NTA-Agarose gereinigt. Proben der Reinigungsfractionen wurden durch SDS-PAGE mit anschließender Detektion der ‚in-Gel Fluoreszenz‘ analysiert. D: Säulendurchlauf (2  $\mu$ l), W: Waschfraktion (2  $\mu$ l), E: Eluate (links: 0,2  $\mu$ l, rechts: 0,1  $\mu$ l)

Sowohl der nichtgekoppelte Farbstoff als auch die kontaminierenden Proteine konnten durch die gezeigte Reinigungsprozedur (Abb. 5.7) effizient abgetrennt werden: durch die hohe Sensitivität der Fluoreszenzdetektion wären selbst kleinste Verunreinigungen sichtbar. In den Waschfraktionen und ebenso im Säulendurchlauf fanden sich relativ große Mengen an PrP-680. Die Ursache hierfür war vermutlich zum einen die -im Verhältnis zum vorhandenen PrP in den Präparationen- geringe Menge an Säulenmatrix, die die Menge an adsorbierbarem PrP-680 limitierte. Zum anderen könnte eine verringerte Zugänglichkeit des His<sub>6</sub>-Tags bei markierten PrP-680 Spezies die Effizienz der Bindung an Ni-NTA beeinträchtigen. Hinweis hierfür ist auch die Tatsache, dass PrP-680 mit einem höheren Derivatisierungsgrad (aus Kopplungsreaktionen mit einem 5- bzw. 20-fachen Überschuss an Fluorophor), offensichtlich nur zu einem geringen Prozentsatz mit ausreichender Affinität an die Säulematrix binden konnte (s. Abb. 5.7) und so zum Großteil bereits in der Waschfraktion eluiert wurde.

Die Umsetzung von PrP90-231 mit dem 5-/6-Carboxyfluorescein (Fam) NHS Ester zeigte ähnliche Resultate bezüglich der Kopplungseffizienz wie die Markierungsreaktionen mit Alexa Fluor 680. Allerdings konnte hier das Vorhandensein und damit die Entfernung von ungekoppeltem Farbstoff und noch vorhandenen Proteinverunreinigungen mangels geeigneter Detektionssysteme nicht dokumentiert werden. Abbildung 5.8 zeigt die elektrophoretische Analyse von zwei Kopplungsansätzen, die mit einem equimolaren Fluorophor:Protein-Verhältnis bzw. einem 10-fachen Überschuss des Fluorophors durchgeführt wurden. Wie aus der Abbildung ersichtlich wird, koppelte auch 5-/6-Carboxyfluorescein effizient an PrP90-231, wobei der Derivatisierungsgrad des Proteins mit dem Farbstoff-Überschuss anstieg. Die Reinigung der stark derivatisierten Protein-Spezies über Ni-NTA verlief jedoch auch in diesem Fall ineffizient (nicht gezeigt).



**Abbildung 5.8: Analyse der Kopplungsreaktionen von mPrP90-231 mit einem 5-/6-Carboxy-fluorescein (Fam) NHS Ester.** 1 µl, 3 µl und 5 µl der beiden Kopplungsansätze (1:1 und 1:10 Verhältnis von PrP90-231 zu Fluorophor) wurden in einer SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert.

### 5.2.2 Fluoreszenzmarkierung von PrP90-231

Für die Herstellung der finalen, fluorophorgekoppelten PrP90-231 Chargen wurde ein äquimolares Protein-zu-Fluorophor-Verhältnis gewählt und größere Mengen rekombinanten Proteins (je 2 mg PrP90-231 in einem Gesamtvolumen von ca. 1,7 ml) umgesetzt. Die Markierungsreaktionen mit Alexa Fluor 680 und 5-/6-Carboxyfluorescein (Fam) wurden gegen Phosphatpuffer dialysiert, unter nativen Bedingungen über Ni-NTA-Agarose gereinigt und anschließend nochmals gegen Phosphatpuffer dialysiert. Die Präparationen wurden durch SDS-PAGE mit Detektion der in-Gel Fluoreszenz (für PrP-680) und durch Coomassie-Färbung der Gele (für PrP-680 und PrP-Fam) analysiert. Das Vorhandensein von Kontaminationen wurde hierdurch soweit wie möglich ausgeschlossen. Die Konzentrationen der Chargen von PrP-680 und PrP-Fam wurden durch multiple Messungen bestimmt (s. Tabelle 5.2).

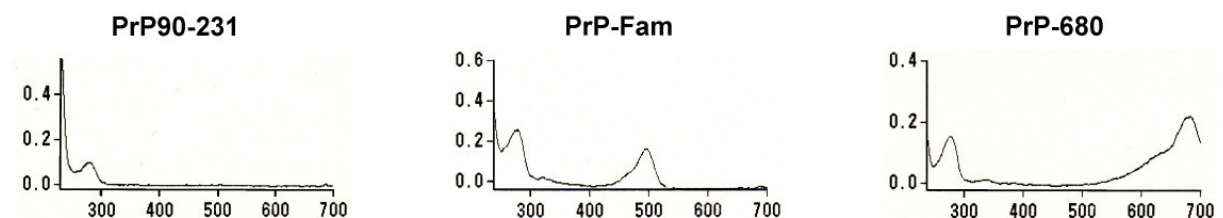
### 5.2.3 Fluoreszenzmarkierung von BSA und $\alpha$ -Flag M2

Alexa Fluor 680-markiertes Bovines Serumalbumin (BSA, British BioCell International) wurde als Negativkontrolle in Kartierungsexperimenten mit Peptidbibliotheken und für Bindungsstudien mit eukaryotischen Caco-2<sub>BBE1</sub> Zellen eingesetzt. BSA wurde daher entsprechend dem für PrP90-231 etablierten Protokoll mit einer äquimolaren Menge des Fluorophors umgesetzt, um so einen vergleichbar hohen Derivatisierungsgrad zu erreichen. Fluoreszenzmarkierter  $\alpha$ -Flag Antikörper wurde zur Etablierung der durchflusszytometrischen Studien mit Bakterien benötigt und wurde daher mit dem im FACSCalibur detektierbaren Fluorophor 5-/6-Carboxyfluorescein gekoppelt. Die Markierungsreaktion erfolgte in diesem Fall gemäß Herstellerangaben unter Nutzung eines 10-fachen molaren Überschusses des Fluorophors relativ zum Antikörper.

Die Reaktionen wurden durch Zugabe eines Überschusses von Glycin abgestoppt und die Ansätze gegen Phosphatpuffer dialysiert. Da beide Proteine ein hohes Molekulargewicht besitzen, konnten die niedermolekularen, nicht proteingebundenen Fluorophor-Kontaminationen durch Dialyse unter Verwendung von Dialysemembranen mit einem MWCO von 12.000 Da entfernt werden. Die Entfernung der Farbstoff-Reste wurde für BSA-680 durch Detektion der in-Gel Fluoreszenz bestätigt (nicht gezeigt).

### 5.2.4 Bestimmung des Derivatisierungsgrades

Der Derivatisierungsgrad (DOL) der hergestellten fluoreszenzmarkierten Proteine PrP-680, PrP-Fam, BSA-680 und  $\alpha$ -Flag-Fam wurde absorptionspektrometrisch bestimmt. Verdünnte Lösungen der Proteine wurden im Spektralphotometer bei 200-700 nm analysiert und die Ergebnisse als Absorptionsspektrum dokumentiert. Aus der Extinktion bei 280 nm und der Extinktion beim Absorptionsmaximum des Fluorophors (497 nm für 5-/6-Carboxyfluorescein bzw. 679 nm für Alexa Fluor 680) ließ sich die Anzahl der gekoppelten Farbstoffmoleküle pro Proteinmolekül errechnen.



**Abbildung 5.9: Absorptionsspektren von PrP90-231, PrP-680 und PrP-Fam.** Die fluorophorgekoppelten PrP90-231 Spezies zeigen neben der (hauptsächlich) durch den Proteinanteil bedingten Absorption bei 280 nm ein zusätzliches, farbstoffspezifisches Absorptionsmaximum.

**Tabelle 5.2: Eigenschaften der fluoreszenzmarkierten Proteine**

Der Derivatisierungsgrad (DOL) ist als gerundeter Mittelwert zweier Messungen angegeben.

	<b>PrP-680</b>	<b>PrP-Fam</b>	<b>BSA-680</b>	<b><math>\alpha</math>-Flag-Fam</b>
<b>c [mg/ml]</b>	0,4	0,8	7,4	0,4
<b>DOL</b>	0,2	0,35	0,4	3,5

### 5.2.5 Bestimmung der Nachweisgrenze für PrP-680

Um die geringste im Odyssey Infrared Imager detektierbare Menge an membrangebundenem PrP-680 zu bestimmen, wurden serielle Verdünnungen (1:2) von PrP-680 angefertigt. Je 2  $\mu$ l der Proteinlösungen wurden auf Nitrocellulose-Membranen immobilisiert und die Membran vor der Analyse mit D-PBS befeuchtet. Die Menge an PrP-680, die in 2  $\mu$ l der höchsten noch fluoreszenzoptisch nachweisbaren Verdünnungsstufe vorlag, wurde als Nachweisgrenze angenommen. Diese wurde für PrP-680 mit einem Derivatisierungsgrad von 0,2 auf 50 pg festgelegt.

### 5.3 Identifizierung peptidischer PrP-Liganden

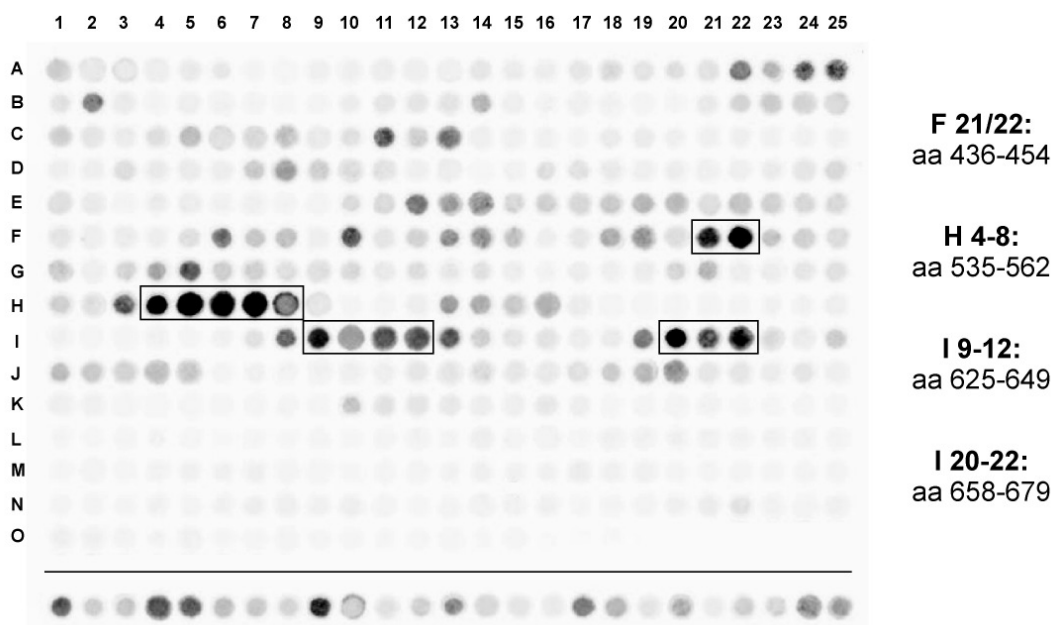
Die in der Einleitung (Abschnitt 2.2.3) vorgestellten fünf potentiellen Prionprotein-Liganden NCAM (Neuronales Zelladhäsionsmolekül), PLG (Plasminogen), der Laminin Rezeptor Precursor LRP, Bcl-2 und Laminin wurden durch die Analyse von Peptidbibliotheken auf das Vorhandensein linearer, peptidischer Bindestellen für PrP90-231 hin untersucht.

Die Aminosäuresequenzen der PrP-Ligandenproteine wurden durch Spot-Synthese im 1-er bis 5-er Versatz in Form festphasengekoppelter Peptidbibliotheken dargestellt. Nach dem Absättigen unspezifischer Proteinbindungsstellen wurden die Bibliotheken ÜN mit 1 ng PrP-680 pro Peptidspot inkubiert. Ungebundenes fluoreszenzmarkiertes Prionprotein wurde durch Waschen der Membranen entfernt und die Signalintensitäten der einzelnen Peptidspots im Odyssey Infrared Imager ausgewertet. Eine genauere Charakterisierung identifizierter PrP-bindender Bereiche erfolgte durch die Analyse des Einflusses von Verkürzungen bzw. Verlängerungen des Sequenzmotivs auf die PrP-680 Beladung und durch die Durchführung von Alanin-Scans. Hierbei wurde jede Aminosäure konsekutiv gegen Alanin substituiert, wobei der Austausch einer für die Ligandenbindung essentiellen oder wichtigen Aminosäure mit einer deutlichen Reduktion der Nachweis-Sensitivität einherging. Die graphischen Darstellungen der Peptidbibliotheken (Abb. 5.10, 5.11 und 5.13-15) wurden mit einer alphanummerischen Spotnotation versehen, auf die im Text Bezug genommen wird. Die Aminosäuresequenzen der PrP-Liganden mit den hervorgehobenen PrP-affinen Bereichen sind im Anhang (Abschnitt 9.1.3) dargestellt.

### 5.3.1 NCAM

Für die Kartierung linearer PrP-Bindestellen des murinen neuronalen Zelladhäsionsmoleküls NCAM wurde die Sequenz der 180 kDa umfassenden Isoform NCAM-180 (SwissProt Accession No. P13595) verwendet. Mit einer Länge von 1115 aa enthält NCAM-180 zusätzlich zu dem potentiell PrP-bindenden extrazellulären Bereich des Moleküls, der in allen der drei bekannten Isoformen (NCAM-180, NCAM-140 und NCAM-120 mit 180, 140 und 120 kDa) vorliegt, auch den kompletten intracytoplasmatischen C-Terminus. Die aminoterminalen 19 Aminosäuren der Sequenz repräsentieren die Signalsequenz, die während des Proteinexports auf die Zelloberfläche abgespalten wird. Der extrazelluläre Anteil des Proteins umfasst den Bereich der Aminosäuren 20-711.

Die Aminosäuresequenz von NCAM-180 wurde in Form von 16-mer Peptiden mit Vorschub um jeweils 3 aa synthetisiert, so dass die Bibliothek aus insgesamt 368 Peptiden bestand. Die Auswertung der Signalintensitäten für die einzelnen Peptide ließ auf das Vorhandensein von 4 linearen Bindestellen (Motive 1-4) für PrP<sup>90-231</sup> innerhalb der NCAM-Sequenz schließen. Umrahmte Peptide in Abbildung 5.10 zeigen Signalintensitäten, die über dem Cut-Off liegen und somit mit 99 %iger Wahrscheinlichkeit spezifisch PrP-680 bindende Peptide darstellen.



**Abbildung 5.10: Kartierung linearer PrP-Bindestellen von murinem NCAM.** Die Aminosäuresequenz von NCAM-180 wurde in Form von 16-mer Peptiden im 3er Versatz synthetisiert (Peptide A1-O18) und die Peptidbibliothek mit 1 ng/spot PrP-680 behandelt. Die Bindung von PrP-680 an die Peptide wurde im Odyssey Infrared Imager bei 700 nm detektiert und anschließend quantifiziert. Der Bereich O19-O25 ist nicht mit Peptiden belegt; die untere Reihe repräsentiert die 25 mitsynthetisierten und mitdetektierten Zufallspeptide, die zur Berechnung des Cut-Offs nach der Methode von Frey *et al.* [154] verwendet wurden.

Das intensivste Signal und damit die stärkste Beladung mit PrP-680 konnte im Bereich der Aminosäuren 538-553 in Motiv 2 (Peptid H5) festgestellt werden. Die Signalstärke im Bindungslocus I9-12 (Motiv 3, aa 625-649) hingegen war nur um Weniges höher als der Cut-Off Wert und betrug maximal 14 % (Peptid I9) des für Peptid H5 erhaltenen Fluoreszenzsignals (Rohwert). Die höchsten für die beiden anderen Bindungsloci gemessenen Werte (32 % bzw. 30 % relativ zu Peptid H5) wurden bei Peptid F22 aus Motiv 1 (aa 439-454) und Peptid I20 aus Motiv 4 (aa 658-673) festgestellt.

Alle gefundenen Peptide mit Affinität zum rekombinanten, murinen PrP90-231 liegen in der extrazellulären Domäne von NCAM und stünden daher bei allen drei NCAM-Isoformen *in vivo* für eine Interaktion mit PrP zur Verfügung. Peptide mit Sequenzen aus dem cytoplasmatischen Carboxyterminus (Peptide J9-O18) fallen dagegen durchweg durch sehr niedrige Signalintensitäten auf, die im Bereich der Hintergrundfluoreszenz der Cellulosemembran liegen. Die Lokalisation der gefundenen PrP-bindenden Bereiche in der NCAM-Sequenz korreliert mit Ergebnissen von Schmitt-Ulms *et al.* [52], die für NCAM-120 drei Areale mit PrP-Affinität beschrieben (aa 420-444, aa 525-564, aa 635-669 von SwissProt Accession No. 13594).

Durch eine genauere Kartierung der PrP-bindenden Sequenzbereiche im 1er Vorschub sowie durch die Analyse von N- und C-terminal verkürzten Peptiden konnten die in Tabelle 5.3 dargestellten Kernmotive herausgearbeitet werden. Aminosäuren, die für die PrP-Bindung eine Rolle spielen, wurden durch ‚Alanin-Scans‘ der Kernmotive identifiziert. Die Sequenz der Kernmotive ist für NCAM-180 und NCAM-120 identisch bis auf Position 549 (K<sub>549</sub> → T<sub>549</sub> für NCAM-120). Diese Aminosäuresubstitution hatte jedoch auf die Bindung von PrP-680 keinen Einfluss.

**Tabelle 5.3: PrP-bindende Kernmotive aus NCAM**

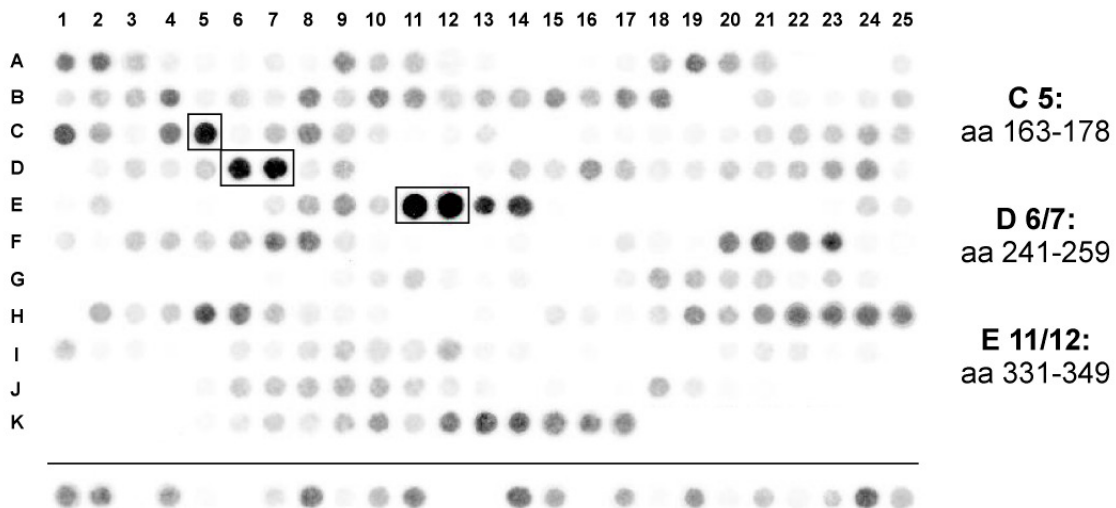
Kernmotiv No.	Sequenz	Kernmotiv (aa)	Schmitt-Ulms <i>et al.</i> (2001)	relative Signalstärke zu Motiv 2 (%)
1	<u>WFR</u> DGQLLPSS <u>N</u> <u>Y</u>	439 – 451	aa 420 - 444	32
2	<u>W</u> KSLGEES <u>W</u> HF(K/T) <u>W</u> YD	538 – 552	aa 525 – 564	100
3	<u>Y</u> LVK <u>Y</u> RALASEW	635 – 646	aa 635 – 669	14
4	LD <u>W</u> NAEYEVY	663 - 674	aa 635 - 669	30

Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf SwissProt Accession No. P13595 (NCAM-180), ist jedoch im betroffenen aminoterminalen Bereichen identisch mit Acc. No. P13594 (NCAM-120). Die von Schmitt-Ulms *et al.* [52] als PrP-bindend beschriebenen Bereiche wurden zum Vergleich mit aufgeführt. Aminosäurereste, die für die PrP-Bindung wichtig bzw. essentiell sind, wurden unterstrichen.



### 5.3.2 Plasminogen (PLG)

Die Aminosäuresequenz des 812 aa umfassenden murinen Plasminogens (PLG, SwissProt Accession No. P20918) wurde durch 16-mer Peptide im 3er Versatz dargestellt; die Bibliothek enthielt insgesamt 267 Peptide. Es wurden drei lineare Bereiche im murinen Plasminogen identifiziert, die als Bindestellen für PrP90-231 fungieren könnten.



**Abbildung 5.11: Kartierung linearer PrP-Bindestellen von murinem Plasminogen.** Die Aminosäuresequenz von murinem PLG wurde in Form von 16-mer Peptiden im 3er Versatz synthetisiert (Peptide A1-K17) und die Peptidbibliothek wie in der Legende von Abb. 5.10 beschrieben behandelt und ausgewertet. Umrahmte Peptide zeigen Signalintensitäten, die den Wert des Cut-Offs übersteigen (K18-K25: unbelegte Areale; untere Reihe: Zufallspeptide).

Die höchste Fluoreszenzintensität wurde bei den Peptiden E11/12 (aa 331-349) gemessen. Das Sequenzmotiv, das diesen beiden 16-mer Peptiden gemein ist ( $W_{334}CYTTDSQLRWEY_{346}$ ) und das durch die Analyse verkürzter Peptide als Kernmotiv dieses PrP-bindenden Bereichs bestätigt werden konnte, ist im Protein am Carboxyterminus der Kringle 3-Domäne (K3, aa 275-352) lokalisiert. Als für die PrP-Bindung wichtige Aminosäuren konnten im Zuge eines ‚Alanin-Scans‘  $W_{334}$ ,  $Y_{336}$ ,  $W_{344}$  und  $Y_{346}$  identifiziert werden. Kringle-Domänen bestehen aus je circa 80 Aminosäuren und besitzen eine durch drei Disulfidbrücken stabilisierte charakteristische Tertiärstruktur; die Aminosäuresequenz ist in bestimmten Bereichen stark konserviert. So repräsentieren die beiden weiteren Bindungsstellen für PrP90-231 in der PLG-Sequenz (Peptid C5 und Peptide D6/7), die eine circa 4-fach niedrigere Signalintensität aufwiesen als die Peptide E11/E12, zu dem obengenannten Kernmotiv aus Kringle 3 homologe Bereiche der Kringle-Domänen 1 und 2 (s. Abb. 5.12). Sie alle beinhalten einen der sechs in Kringle-Domänen hochkonservierten Cysteinreste ( $C_{335}$ ), die für die Ausbildung der Kringle-typischen Tertiärstruktur verantwortlich sind.

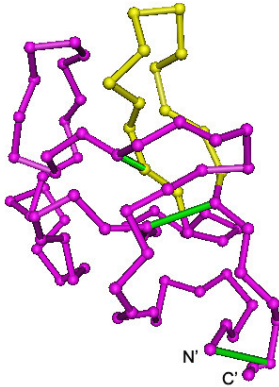
A

```

K1  CKTGIGNGYRGTMSTRKSGVACQKWGATFPHVP-NYSPSTHPNEGLEENYCRNPDNDEQGPWCYTDPDKRYDYCNIPCC
K2  CMYCSGEKYEKGKISKTMGLDCQAWDSQSPHAH-GYIPAKFPSKNLKMNYCRNPDGE-PRPWCFTTDPTKRWEYCDIPRC
K3  CLKGRGENYRGTVSVTVSGKTCQRWSEQTPHRH-NRTPENFPCKNLEENYCRNPDGE-TAPWCYTDSQLRWEYCEIPSC
K4  CYQSDGQSYRGTSSTTITGKKCQSWAAMFPHRH-SKTPENFPDAGLEMNYCRNPDGD-KGPWCYTDPDPSVRWEYCNLKRC
K5  CMYGNPKDYRGKTAVTAAGTFCQGWAAQEPHRHSIFTPQTNPRAGLEKNYCRNPDGDVNGPWCYTTPNPKLYDYCDIPLC
      *   *: *. * . : * : * ** * ** * . * . *: *****.: ***:***.: :*:*: *

```

B



C

```

K1_Motiv  WCYTDPDKRYDY
K2_Motiv  WCFITDPTKRWEY
K3_Motiv  WCYTDSQLRWEY
          **:.***. *.:*

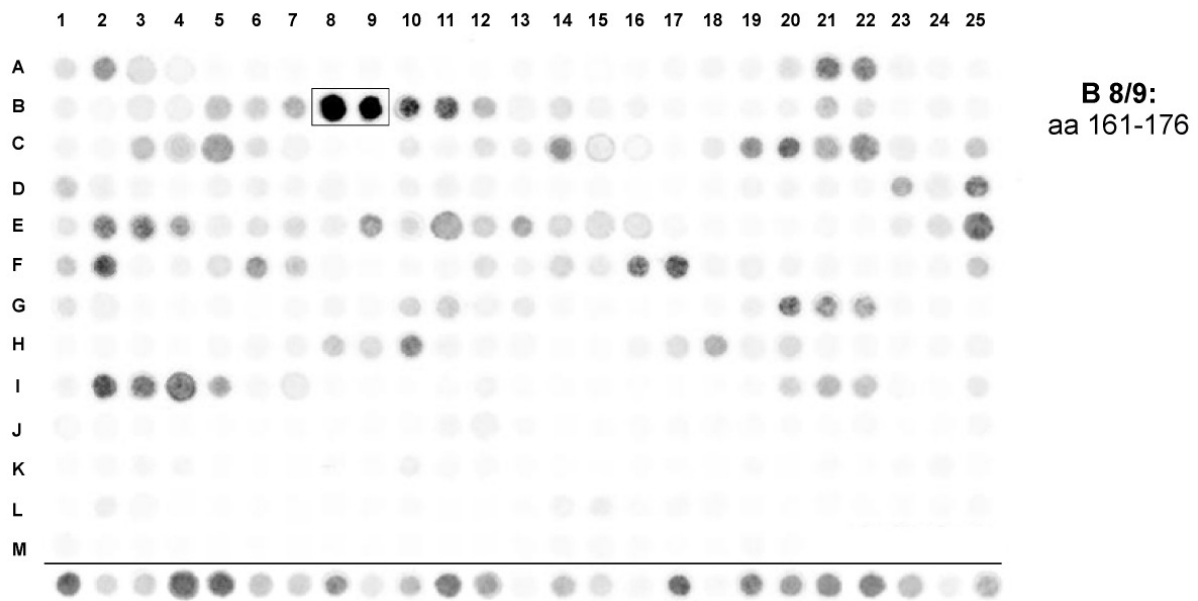
```

**Abbildung 5.12: PrP-bindende Motive der Kringle-Domänen von Plasminogen.** A: Alignment der Aminosäuresequenzen der fünf in murinem Plasminogen enthaltenen Kringle-Domänen K 1-K 5 (K1: aa 103-181; K2: aa 185-262; K3: aa 275-352; K4: aa 377-454; K5: aa 481-560). Das PrP-affine Kernmotiv aus K3, K1 und K2 und die homologen Bereiche aus K4 und K5 wurden grau unterlegt. C: Alignment der PrP-bindenden Sequenzmotive aus K1 (aa 163-175), K2 (aa 244-256) und K3 (aa 334-346). Für die PrP-Bindung wichtige Aminosäuren wurden grau unterlegt. Die in Kringle-Domänen konservierten Cysteinreste sind grün dargestellt. B: Struktur von Kringle-Domänen am Beispiel der Kringle-Domäne 4 aus humanem Plasminogen (PDB Accession No. 1PMK). Der zum PrP-affinen Kernmotiv homologe Bereich wurde gelb und Disulfidbrücken grün dargestellt.

Wie aus Abbildung 5.12 (C) ersichtlich wird, zeigt die Aminosäuresequenz der drei potentiellen Bindungsloci für PrP<sup>90-231</sup> einen hohen Grad an Homologie; weiterhin sind die affinitätsbestimmenden vier Aminosäuren entweder konserviert oder konservativ substituiert. Unklar bleibt, ob im Protein alle drei Motive (und damit die Kringle-Domänen 1-3) an der Bindung von PrP beteiligt sind oder nur das Peptid aus Kringle 3 mit der anscheinend höchsten Affinität. Auch ist nicht auszuschließen, dass weitere strukturspezifische Determinanten von Kringle-Domänen bei der Bindung *in situ* eine Rolle spielen. Die Darstellung der Struktur (Abb. 5.12 B) zeigt, dass das PrP-bindende Motiv als oberflächenexponierter Loop vorliegt, der durch von C<sub>335</sub> und C<sub>347</sub> ausgehende Disulfidbrücken in seiner Position stabilisiert wird. Eine Imitation dieser Loop-Struktur im Zuge des bakteriellen Displays im AIDA-Kontext könnte durch eine interne Disulfidbrücken zwischen C<sub>335</sub> und C<sub>347</sub> möglich sein.

### 5.3.3 Laminin

Aus der großen Vielfalt der bislang identifizierten Laminin-Untereinheiten und ihrer Isoformen wurde nur die bereits als PrP-bindend beschriebene, 1607 aa umfassende  $\gamma_1$ -Kette des murinen Laminins (SwissProt Accession No. P02468) für die Kartierung linearer PrP-Bindestellen ausgewählt und in Form von 16-mer Peptiden im Versatz um je 5 Aminosäuren synthetisiert. Die Peptidbibliothek enthielt so 320 Laminin-spezifische Peptide; zusätzlich wurden 25 Peptide mit zufälliger Sequenz synthetisiert.

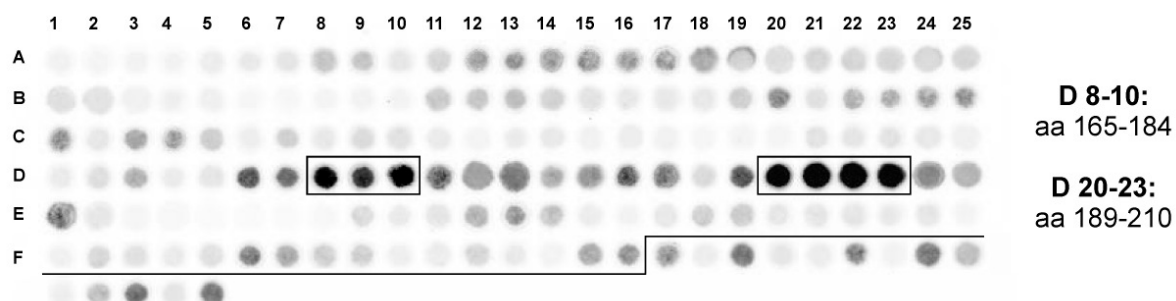


**Abbildung 5.13: Kartierung linearer PrP-Bindestellen der  $\gamma_1$ -Kette des murinen Laminins.** Die Aminosäuresequenz wurde in Form von 16-mer Peptiden im 5er Versatz synthetisiert (Peptide A1-M20) und die Peptidbibliothek wie in der Legende von Abb. 5.10 beschrieben behandelt und ausgewertet. Umrahmte Peptide zeigten Signalintensitäten, die den Wert des Cut-Offs übersteigen (M20-M25: unbelegte Areale; untere Reihe: Zufallspeptide).

Es konnte nur ein lineares Motiv mit PrP-Bindungsaktivität identifiziert werden (s. Abb. 5.13). Der Bereich der Peptide B8/B9 (aa 161-176) enthält das durch Analyse verkürzter Peptide verifizierte Kernmotiv mit der Sequenz EDGPWIPYQYY (aa 166-176). Für das Bibliotheks-Peptid M15 dagegen, welches das von Graner *et al.* [56] über Konkurrenzexperimente deduzierte und als PrP-interagierend postulierte 10-mer Motiv der  $\gamma_1$ -Kette von Laminin (Sequenz RDIAEIIKDA, aa 1575-1584) enthielt, konnte keinerlei Bindung von PrP-680 nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis wurde durch erneute Synthese und Analyse des carboxyterminalen Bereichs der  $\gamma_1$ -Kette im 2er Versatz und durch Analyse verlängerter und verkürzter Konstrukte des angeblich PrP-bindenden Peptids bestätigt.

### 5.3.4 Laminin Rezeptor Precursor (LRP)

Die Peptidbibliothek für die Kartierung linearer PrP-Bindestellen des Laminin Rezeptor Precursors LRP umfasste 141 Peptide (16-mer), die die 295 aa lange Aminosäuresequenz des LRP im 2er-Versatz darstellten.



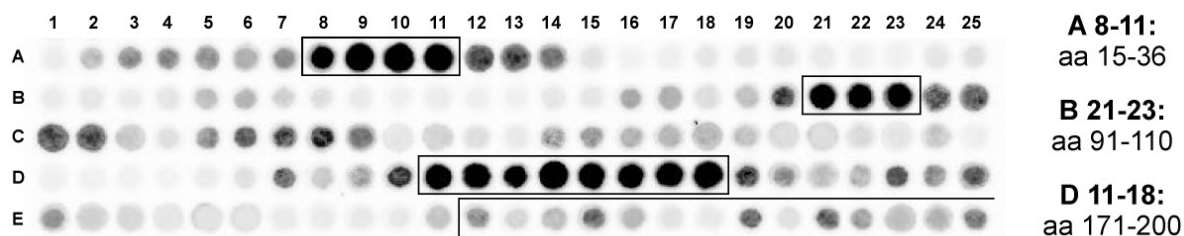
**Abbildung 5.14: Kartierung linearer PrP-Bindestellen des Laminin Rezeptor Precursors LRP.** Die Aminosäuresequenz des humanen LRP (SwissProt Accession No. AAB22299) wurde in Form von 16-mer Peptiden im 2er Versatz synthetisiert (Peptide A1-F16) und die Peptidbibliothek wie in der Legende von Abb. 5.10 beschrieben behandelt und ausgewertet. Umrahmte Peptide zeigten Signalintensitäten, die den Wert des Cut-Offs übersteigen. Zufallspeptide sind durch einen Strich von den Peptiden der LRP-Bibliothek abgegrenzt.

Es wurden zwei lineare Bereiche mit Affinität für PrP identifiziert. Das Motiv 1 (Peptide D8-10) mit nur leicht den Cut-Off übersteigenden Signalintensitäten umfasst die Aminosäuren 165-184 und beinhaltet Anteile des Laminin-bindenden Motivs von LRP (aa 161-180), welches von Hundt *et al.* als Prionprotein-Bindungsdomäne postuliert wurde [162]. Eine Feinkartierung dieses Bereichs bestätigte die Aminosäuren 169-180 (Sequenz: H<sub>169</sub>SVGLMWWMLAR<sub>180</sub>) als Kernmotiv, wobei beide Tryptophan-Reste (W<sub>175</sub> und W<sub>176</sub>) und das terminale Arginin (R<sub>180</sub>) als für die Bindung essentiell notwendig charakterisiert werden konnten.

Der zweite Bindungslocus (aa 189-210, Peptide D20-23 in Abb. 5.14) repräsentiert Peptide mit dem gemeinsamen Kernmotiv W<sub>195</sub>EVMPDLYFY<sub>204</sub>, die nach Behandlung der Bibliothek mit PrP-680 eine fünf- bis sechsfach höhere Fluoreszenzintensität (Rohdaten) aufwiesen als die Peptide des Motivs 1. Dieser Unterschied in der PrP-Beladung konnte auch in einem direkten Vergleich der neu synthetisierten Kernmotive reproduziert werden: die absolute Signalintensität (integrated intensity) des 10-mer Peptids WEVMPDLYFY betrug  $70,8 \pm 4,9$ , während das Signal des 12-mer Kernmotivs 1 (HSVGLMWWMLAR) mit nur  $10,3 \pm 1,5$  deutlich niedriger lag. Auch bei Verlängerung des Motivs 1 auf die komplette, 20 Aminosäuren umfassende Laminin-Bindedomäne des Laminin Rezeptors (Sequenz I<sub>161</sub>PCNNKGAHSVGLMWWMLAR<sub>180</sub>) konnte keine Signalsteigerung beobachtet werden.

### 5.3.5 Bcl-2

Einhundertelf 16-mer Peptide im Versatz um je zwei Aminosäuren repräsentierten die 236 aa umfassende Aminosäuresequenz des murinen Apoptoseregulators Bcl-2 (SwissProt Accession No. P10417).



**Abbildung 5.15: Kartierung linearer PrP-Bindestellen von murinem Bcl-2.** Die Aminosäuresequenz von Bcl-2 wurde in Form von 16-mer Peptiden im 2er Versatz synthetisiert (Peptide A1-E11) und die Peptidbibliothek wie in der Legende von Abb. 5.10 beschrieben behandelt und ausgewertet. Umrahmte Peptide zeigten Signalintensitäten, die den Wert des Cut-Offs übersteigen. Die 14 Zufallspeptide sind durch einen Strich von den Peptiden der Bcl-2-Bibliothek abgegrenzt.

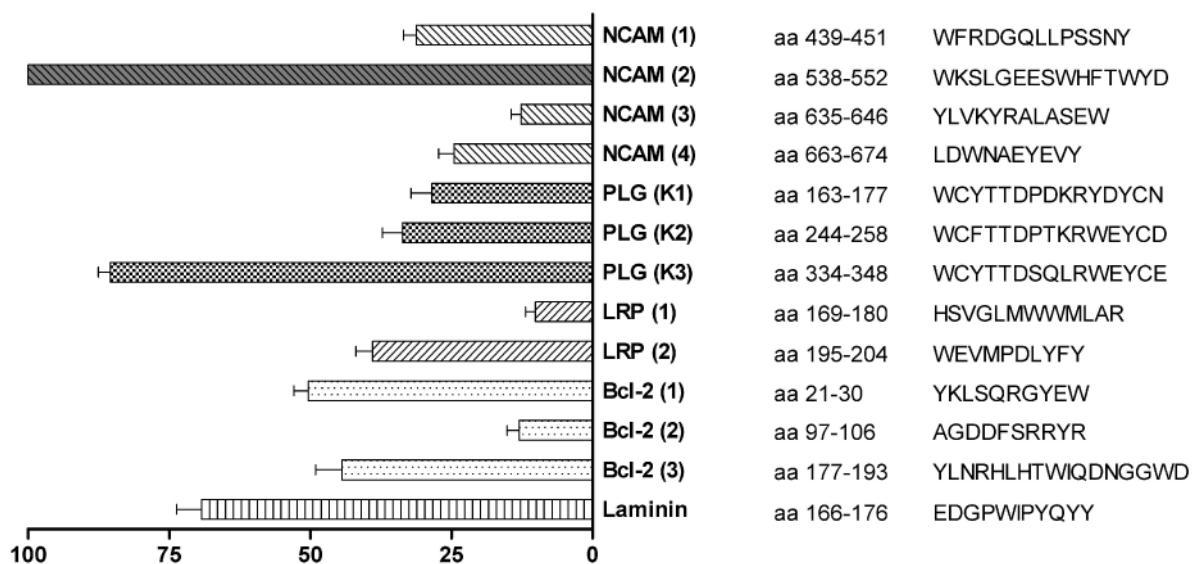
Kurschner und Morgan wiesen durch ‚Phage Display‘-Experimente mit verkürzten Bcl-2 Konstrukten eine Bindung von PrP an die carboxyterminalen Aminosäuren 174-236 von Bcl-2 nach, wobei der minimal für die Bindung notwendige Anteil von Bcl-2 auf den die potentielle Transmembrandomäne enthaltenden Bereich der Aminosäuren 200-236 eingengt wurde [163]. Im hier genutzten *in vitro*-Festphasenassay konnten dagegen drei lineare Bereiche des Moleküls identifiziert werden, an die eine Bindung des fluoreszenzmarkierten Prionproteins stattfand. Eine Korrelation der Ergebnisse beider Kartierungen mit Überschneidung der gefundenen PrP-bindenden Bereiche konnte daher nur für den C-terminalen Anteil von Bcl-2 festgestellt werden (Peptide D11-D18 in Abb. 5.15). Die Feinkartierung dieses Lokus mittels Analyse von 20-mer Peptiden im Versatz und mit Verkürzungen ergab ein Kernmotiv von 17 aa Länge, welches die Aminosäuren 177-193 von Bcl-2 umfasste (Sequenz Y<sub>177</sub>LNRHLHTWIQDNGGWD<sub>193</sub>). Essentiell für die Bindung von PrP-680 waren dabei beide Tryptophane (W<sub>185</sub> und W<sub>192</sub>); wichtige Aminosäuren repräsentierten Y<sub>177</sub>, R<sub>180</sub> und D<sub>193</sub>. Die Fluoreszenzintensitäten der N-terminalen PrP-bindenden Peptide (Peptide A8-11, Kernmotiv: aa 21-30, Sequenz Y<sub>21</sub>KLSQRGYEW<sub>30</sub>) war vergleichbar mit derjenigen von Peptiden aus dem carboxyterminalen Motiv. Die PrP-680-Bindung der Peptide B21-23 (aa 91-110) deren Kernmotiv die aa 97-106 (Sequenz A<sub>97</sub>GDDFSRRYR<sub>106</sub>) repräsentierten, war dagegen deutlich geringer und betrug nur circa 30 % der von Peptiden der anderen Motive erreichten Signalstärken.

## 5.4 Auswahl und weitere Analyse der PrP-Peptidliganden

Für die Entwicklung von PrP-spezifischen Enterosorbentien sollten avide peptidische PrP-Liganden identifiziert werden. Im vorherigen Kapitel wurden in der Literatur als PrP-bindend beschriebene Proteine auf lineare Bereiche mit Affinität zu den Aminosäuren 90-231 des murinen Prionproteins hin untersucht. Mehrere Motive aus verschiedenen Proteinen konnten bestimmt und das für eine jeweils optimale Prionprotein-Bindung notwendige Aminosäuresequenzmotiv extrahiert werden.

### 5.4.1 Vergleich der PrP-Bindungskapazitäten der peptidischen Liganden

Um geeignete Kandidatenpeptide mit hoher PrP-Affinität für den bakteriellen Peptid-Display im AIDA-System auszuwählen, wurde nun die PrP-Bindungskapazität der Kernmotive im Festphasenassay direkt miteinander verglichen. Hierfür wurden die PrP-bindenden Kernmotive durch Spotsynthese hergestellt und die festphasengebundenen Peptide wie für die Kartierungen beschrieben mit PrP-680 behandelt. Die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Peptide wurden quantifiziert und auf einen artifiziell gewählten Wert (integrated intensity = 100) für das Peptid mit der stärksten Bindung von PrP-680 normalisiert.



**Abbildung 5.16: Vergleich der PrP-680 Bindungskapazität der identifizierten peptidischen PrP-Liganden.** Die Peptidbibliotheken der Kernmotive wurden in Triplikaten synthetisiert und wie in der Legende von Abb. 5.10 behandelt und ausgewertet. Die Rohwerte der Fluoreszenzsignale wurden hier auf einen Wert von 100 für das NCAM-Motiv 2 (grau unterlegt) normalisiert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler aus drei Detektionen. Peptidmotive, die dem gleichen Protein entstammen, sind einheitlich schraffiert (X-Achse: integrated intensity, normalisiert).

Die höchsten Signalintensitäten und damit die stärkste Beladung mit fluoreszenzmarkiertem PrP90-231 konnten für das Motiv 2 aus murinem NCAM und das Peptid aus der Kringle-Domäne 3 von murinem Plasminogen nachgewiesen werden. Beide Peptide wurden daher für die Analyse ihrer PrP-absorptiven Fähigkeiten im bakteriellen Display-System ausgewählt. Als zusätzliches Kandidatenpeptid wurde das LRP-Motiv 1 für die AIDA-vermittelte Expression ausgesucht. Die Bindung vom Prionprotein an dieses aus dem Laminin Rezeptor Precursor stammenden Sequenzmotiv wurde in der Literatur mehrfach beschrieben; in den Kartierungsexperimenten konnte jedoch nur eine durch geringe PrP-Bindung implizierte niederaffine Interaktion festgestellt werden. Ein Test im AIDA-System könnte Hinweis darauf geben, ob die geringe Affinität im Festphasenassay mit Peptiden (s. Abb. 5.16) eventuell durch das hier verwendete Assay-Format bedingt war.

#### 5.4.2 Einfluss der Fluorophorkomponente auf die Peptidbindung durch PrP-680

Um auszuschließen, dass die Bindung des rekombinanten PrP90-231 an die Peptide durch den Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 680 bedingt wurde, wurden membrangebundene Peptide mit der Negativkontrolle BSA-680 behandelt. Ein repräsentatives Experiment hierzu ist in Abbildung 5.17 gezeigt. BSA, ein bovines Serumprotein, welches häufig als irrelevantes Protein zur Absättigung unspezifischer Bindestellen in immunologischen Nachweisverfahren Verwendung findet, sollte keine spezifische Bindung an die Peptide zeigen. Die Kopplung des Fluorophors Alexa Fluor 680 an BSA erfolgte analog zu dem für PrP90-231 etablierten Protokoll; die absorptionsspektrometrische Analyse des Derivatisierungsgrades (DOL; s. Abschnitt 5.2.4) ergab ein ähnliches Protein-zu-Farbstoff Verhältnis für PrP-680 (DOL ~ 0,2) und BSA-680 (DOL ~ 0,4)



**Abbildung 5.17: Die Bindung von PrP-680 an Peptidbibliotheken ist PrP-spezifisch** und wird nicht durch die Fluorophormarkierung verursacht. Cellulosemembranen mit Spot-synthetisierten Duplikaten der PrP-bindenden Kernmotive NCAM (2), PLG (K3) und LRP (1) wurden entweder mit 1 ng/Spot PrP-680 oder der 10-fachen molaren Menge an BSA-680 (ca. 127 ng/Spot) inkubiert; die Kontroll-Membran (rechts) blieb unbehandelt.

### 5.4.3 Verifizierung der spezifischen PrP-Bindung im Peptid-ELISA

Die hohe Dichte der Peptide auf der Cellulosemembran könnte durch Aviditätseffekte die Affinität der Bindung von PrP-680 an die festphasengekoppelten Peptiden stärker erscheinen lassen, als sie tatsächlich ist. Um die PrP-Bindungskapazität der Peptide durch ein weiteres Testverfahren zu validieren, wurde daher ein Enzym-gekoppelter Immunoassay (ELISA) etabliert, mit dessen Hilfe in umgekehrter Weise als beim Arbeiten mit Cellulose-gebundenen Peptiden die Bindung löslicher PrP-Ligandenpeptide an immobilisiertes Prionprotein nachgewiesen werden konnte. Die zu analysierenden Peptidsequenzmotive mussten hierfür zum einen vom Celluloseträger abgespalten und in Lösung gebracht werden. Zum anderen mussten sie in einer Form vorliegen, die ihren spezifischen Nachweis im Immunoassay ermöglichte. Daher wurde im letzten Schritt der Peptidsynthese am Aminoterminus der Peptide ein Fmoc-geschütztes Biocytin (Biotinyl-L-Lysin) gekoppelt. Biotin gehört zu den wenigen in der Peptidsynthese einsetzbaren niedermolekularen Markierungsreagenzien; für den spezifischen und direkten Nachweis ist Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppeltes Streptavidin kommerziell erhältlich.

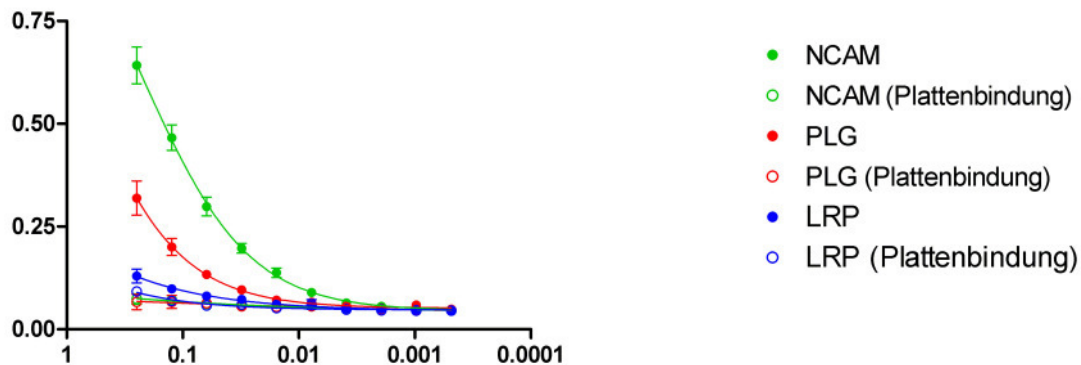
Aus mehreren Gründen gestaltete sich die Entwicklung des Immunoassays jedoch schwierig:

- Es konnte gezeigt werden, dass rekombinantes murines PrP90-231 ein aminoterminales Streptavidin-bindendes Sequenzmotiv enthält (s. Abschnitt 6, Ergebnisse Teil 2). Dies bewirkte eine nicht Peptid-spezifische Anlagerung des Streptavidin-basierten Detektionssystems an das auf der Mikrotiterplatte immobilisierte PrP90-231.
- Viele Peptide besitzen eine Tendenz zur unspezifischen Anheftung an die Mikrotiterplatte. Der Grad der unspezifischen ‚Plattenbindung‘ ist sequenz- und konzentrationsabhängig und kann durch rigides Blockieren unspezifischer Bindungsstellen reduziert, aber oft nicht vollständig eliminiert werden. Für eine genauere Darstellung des Phänomens sei auf die Dissertationschrift von Dr. Hans-Heiner Gorris verwiesen [159].

Das zuerst beschriebene Problem konnte durch Verwendung des aminoterminal deletierten PrP-Konstrukts PrP101-231, das die Aminosäuren 101-231 des murinen Prionproteins umfasst, gelöst werden. Zur genaueren Untersuchung und Lösungsfindung sei auf Teil 2 der Ergebnisse (s. Abschnitt 6) verwiesen. Die Problematik der unspezifischen Bindung der Peptide an die Mikrotiterplatte wurde durch die Optimierung von drei Parametern (Menge an PrP101-231 zur Beschichtung der Platten, Peptidkonzentration, Art und Konzentration des Blocking-Reagenzes) soweit zurückgedrängt, dass für die zu analysierenden Peptidliganden die PrP-Bindung ausgewertet werden konnte.



Der letztendlich verwendete Aufbau des Assays stellte insofern einen Kompromiss dar zwischen der Verhinderung der Peptid-Plattenbindung (durch Einsetzen möglichst geringer Peptidkonzentrationen und Verwendung wirksamer Absättigungsreagenzien) und der Maximierung der Nachweissensitivität der niedrigaffinen Peptid-PrP-Interaktion, die von einer möglichst hohen Peptidkonzentrationen und weniger rigider Absättigungsprotokolle profitierte.



**Abbildung 5.18: Analyse der PrP-Bindung biotinmarkierter Peptide im ELISA.** Gezeigt sind die für die ausgewählten Peptidliganden NCAM (2), PLG (K3) und LRP (1) erhaltenen Ergebnisse bei Verwendung von 1 % Blotto als Absättigungsreagenz. Die Mikrotiterplatten wurden reihenweise abwechselnd mit 10 µg/ml PrP101-231 beschichtet oder nur mit 1 % Blotto abgesättigt. Die nichtbeschichteten Kavitäten dienen zur Bestimmung der unspezifischen Anheftung der Peptide an den Mikrotiterplattenboden. Aufgetragen wurden Mittelwert und Standardfehler der Absorption (OD<sub>450</sub>, Y-Achse) aus zwei Experimenten gegen die Peptidverdunnung (X-Achse: Anteil der Menge eines Spots) als nicht-lineare Regression der Werte an eine 4-Parameter Gleichung. (Gefüllte Kreise: PrP-spezifische Signale bei Peptidverdunnung in PrP101-231-beschichteten Kavitäten; ungefüllte Kreise: unspezifische ‚Plattenbindung‘ der Peptide bei Peptidverdunnung in nicht mit PrP101-231 beschichteten Kavitäten). Ein OD<sub>450</sub>-Wert von ca. 0,06 repräsentiert den Plattenhintergrund.

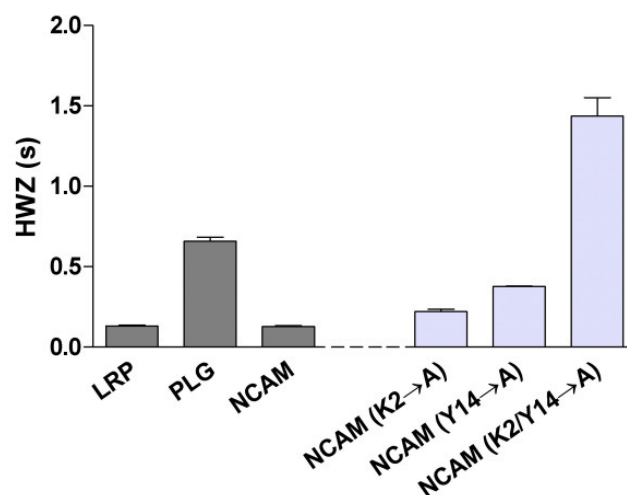
Die aussagekräftigsten Schlüsse konnten aus Experimenten gezogen werden, bei denen im beschriebenen Assay-Aufbau (Abschnitt 4.11) 1 % Blotto als Absättigungsreagenz verwendet wurde (s. Abb. 5.18). Die getesteten Peptide zeigten unter diesen Bedingungen minimale Hintergrundbindung bei maximaler Nachweissensitivität für die PrP101-231-Bindung. Dargestellt wurde hier nur die Untersuchung der Peptidmotive, die für den bakteriellen Display ausgewählt wurden. Die Ergebnisse korrelieren mit den im Peptid-Festphasenassay erhaltenen Daten: Von den drei hier untersuchten Peptiden bewirkte das NCAM-Peptid die höchsten Signalintensitäten im ELISA. Die Bindung des PLG-Peptids konnte ebenfalls nachgewiesen werden, während bei LRP nur sehr schwache PrP101-231-spezifische Signale detektierbar waren.

#### 5.4.4 Verdauungsstabilität der peptidischen PrP-Liganden

Eine stabile Bindung des infektiösen PrP<sup>Sc</sup> durch Peptid-präsentierende Darmbakterien ist nicht nur von der Affinität der Peptide für ihren Bindungspartner abhängig, sondern auch von einer genügend hohen Resistenz der exponierten Domäne gegenüber der Degradation durch intestinale Proteasen. Um die proteolytische Sensitivität der peptidischen PrP-Liganden unabhängig vom proteinösen AIDA-Rückgrat zu evaluieren, wurden die Peptide in einem ELISA-Verfahren auf ihr Verhalten im intestinalen Milieu hin untersucht.

Die Sequenzmotive aus dem Laminin Rezeptor Precursor (LRP-Motiv 1), Plasminogen (PLG-Motiv K3) und NCAM (NCAM-Motiv 2) wurden hierfür mit N- und C-terminaler Markierung durch Spot-Synthese hergestellt und vom Celluloseträger abgespalten. Um eine ladungsabhängige unspezifische Plattenbindung zu unterdrücken, wurden die zu untersuchenden Aminosäuresequenzen in diesem Assayformat um je zwei N- und C-terminal flankierende D-Glutamatreste erweitert. Während das Hinzufügen artifizierender Ladungsträger im Peptid-ELISA zur Analyse der PrP-Bindung die Ergebnisse verfälscht hätte, besitzt das nicht proteinogene D-Glutamat bei der Analyse der Verdaubarkeit keinen störenden Einfluss, da Peptidbindungen zwischen D-Aminosäuren von Darmproteasen nicht hydrolysiert werden können [159].

Die Peptide wurden in Lösung mit einer Verdünnungsreihe einer murinen Intestinallavage inkubiert. Im Immunoassay wurde anschließend für jede Enzymverdünnung der Anteil der ungeschnitten gebliebenen Peptidkonstrukte bestimmt und hieraus die Halbwertszeit des jeweiligen Peptids berechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.19 dargestellt.



**Abbildung 5.19: Halbwertszeiten ausgewählter PrP-Peptidliganden in muriner Intestinallavage.** Die Peptide wurden in einem ELISA-Verfahren auf ihre proteolytische Sensitivität hin untersucht. Dargestellt ist die Halbwertszeit (HWZ) in Intestinallavage (Verdünnungsfaktor 1:20) in Sekunden (s) als Mittelwert und Standardfehler aus drei Experimenten.

Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors der eingesetzten Intestinallavage beträgt die extrapolierte Halbwertszeit der gelösten und nicht im Proteinkontext vorliegenden Peptide in muriner Intestinalflüssigkeit weniger als 10 Millisekunden (ms) für die Motive aus LRP ( $6,6 \pm 0,3$  ms) und NCAM ( $6,4 \pm 0,4$  ms) und liegt für das PLG-Peptid mit  $33,0 \pm 1,3$  ms etwas höher. Um herauszufinden, ob eine distinkte Aminosäure innerhalb der Sequenzen als Hauptziel des proteolytischen Angriffs identifiziert werden kann, wurde für das 15-mer NCAM-Peptid WKSLGEESWHFTWYD eine Substitutionsanalyse durchgeführt. Hierbei konnten drei Aminosäurereste lokalisiert werden, deren Austausch gegen Alanin eine Erhöhung der Verdauungsresistenz des Peptids zu Folge hatte ( $K_2$ ,  $W_9$  und  $Y_{14}$ , s. auch Abb. 5.19 für  $K_2$  und  $Y_{14}$ ). Eine gleichzeitige Substitution der Positionen  $K_2$  und  $Y_{14}$  erhöhte die HWZ des Peptids von  $6,4 \pm 0,4$  ms um den Faktor 11 auf  $72,1 \pm 7,7$  ms.

Auf der Suche nach einem eventuell degradationsresistenten PrP-Ligandenpeptid wurden auch die übrigen identifizierten peptidischen PrP-Binder (s. Abb. 5.16) auf ihre Verdauungsstabilität hin getestet. Es konnte jedoch kein Peptid gefunden werden, dessen berechnete HWZ im murinen Intestinaltrakt über der des PLG-Peptids ( $\sim 30$  ms) lag. Diese Ergebnisse sind jedoch für die *in vivo*-Stabilität der Peptide im AIDA-Kontext nur bedingt aussagekräftig, denn die Degradationsresistenz eines Polypeptids wird in den meisten Fällen durch strukturelle Eigenschaften determiniert, während die hier verwendeten Peptide voraussichtlich in einer maximal entfalteten Konformation vorliegen. Bestes Beispiel für die Abhängigkeit der Verdaubarkeit von der Proteinstruktur ist das partiell proteaseresistente PrP<sup>sc</sup>-Konformer.

## 5.5 Bakterieller Display von PrP-Liganden

Auf die Verifizierung der Prionprotein-Bindung von PrP-Peptidliganden *in vitro* folgte die Überprüfung ihrer adsorptiven Qualitäten im bakteriellen Display-System. Die PrP-affinen Aminosäuresequenzmotive aus NCAM, PLG und LRP wurden daher in einen permissiven Locus des plasmidkodierten, modifizierten AIDA Autotransporters inseriert. Anschließend wurden die *E. coli*-vermittelte Expression der AIDA-Konstrukte, die Integration des Translokator-Anteils von AIDA in die äußere bakterielle Membran und die PrP-Adsorptionskapazität der modifizierten Bakterien analysiert.

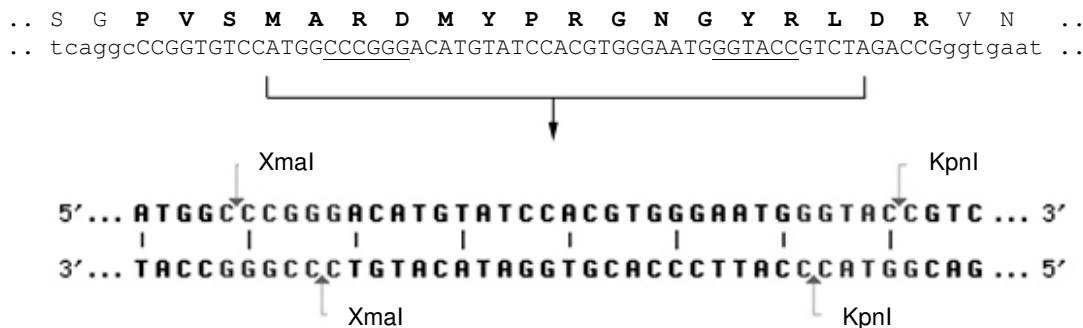
Studien zum bakteriellen Display heterologer Determinanten durch Autotransporter wurden in den letzten Jahren mehrfach beschrieben; der Export von Peptiden oder kleineren Polypeptide konnte hierbei in der Regel problemlos erreicht werden [133, 143]. Im Gegensatz dazu ist die Translokation größerer Protein (-Anteile) mit Disulfidbrücken-stabilisierter Tertiärstruktur zwar möglich [134, 136, 140], aber oft problematisch [132, 164], da die sich während des periplasmatischen Transits bildenden Disulfidbrücken mit dem Export der Passenger-Domäne durch die ‚Translokationspore‘ interferieren können. Die Präsentation der Domäne wird dadurch komplett oder zum Teil verhindert und die genetische Stabilität des Bakterienklons beeinträchtigt.

In der Literatur zur Plasminogen-PrP Interaktion [60, 61, 165, 166] deutet sich jedoch ebenso wie in den durchgeführten Plasminogen-Kartierungsexperimenten (s. Abschnitt 5.3.2) an, dass die Bindung von PrP<sup>90-231</sup> nicht nur von dem identifizierten 13-mer Kernmotiv vermittelt wird. Mit hoher Wahrscheinlichkeit spielen auch strukturspezifische Determinanten der Kringle-Domäne eine Rolle, wobei die Anzahl der an der Interaktion beteiligten Kringle-Domänen unklar ist. Daher wurde analysiert, ob ein AIDA-vermittelter Display von einer oder mehrerer der fünf in Plasminogen enthaltenen Kringle-Domänen möglich ist.

### 5.5.1 Herstellung der AIDA-Konstrukte

Der Aufbau des Plasmids pMK90, welches das Gen für den modifizierten Autotransporter AIDA unter Kontrolle des Wildtypromotors enthält, wurde im methodischen Abschnitt der Arbeit erläutert (s. Abschnitt 3.9). Die DNA-Sequenzen und die deduzierten Aminosäuresequenzen von AIDA und die der modifizierten Konstrukte finden sich im Anhang (9.1.2).

Die kodierenden Sequenzen der im vorhergehenden Abschnitt ausgewählten peptidischen PrP-Liganden (NCAM-Motiv (2), PLG-Motiv (K3), LRP-Motiv (1), im Folgenden vereinfacht als NCAM, PLG und LRP bezeichnet) wurden durch komplementäre Oligonukleotide dargestellt und über die Restriktionsschnittstellen XmaI (5') und KpnI (3') in die ‚Multiple Cloning Site‘ von pMK90 eingefügt.



**Abbildung 5.20: ‚Multiple Cloning Site‘ (MCS) von pMK90.** Oben wurde der Ausschnitt des AIDA Autotransporters dargestellt, der die artifizell eingefügte MCS (fett gedruckt bzw. in Großbuchstaben) enthält. Die Erkennungsstellen der Restriktionsendonukleasen XmaI und KpnI, die zur Insertion der Fremd-DNA verwendet wurden, sind unterstrichen; die deduzierte Aminosäuresequenz wurde mit aufgeführt. Die je zwei N- und C-terminalen Aminosäuren (aa), die nicht der MCS zugeordnet sind, entstammen dem nativen AIDA und repräsentieren die aa 53-54 bzw. 793-794 von SwissProt Accession No. CAA46156. Der dazwischenliegende Bereich der aa 55-792 wurde in pMK90 deletiert und durch die hier dargestellte MCS ersetzt. Eine genauere Darstellung der DNA-Sequenz im Klonierungsbereich ist im unteren Teil der Abbildung zu sehen.

Um eine effiziente Expression der Peptide im AIDA-Kontext zu ermöglichen, wurden nicht die DNA-Sequenzen der eukaryotischen Donorproteine zur Konstruktion der Oligonukleotide verwendet; vielmehr wurden artifizelle kodierende Sequenzen auf Grundlage der ‚Codon Usage‘ des Wirtsorganismus *E. coli* erstellt. In einigen Fällen erforderte die Insertion der kodierenden Sequenzen im Leseraster das Hinzufügen einiger zusätzlicher Basenbaare im Ligationsbereich. Falls hier eine die Aminosäuresequenz (von AIDA oder vom ev. verlängerten Insert) erhaltende Addition nicht möglich war, wurden artifizelle Codons verwendet, die möglichst nicht störende Aminosäuren wie Alanin kodierten (s. Tabelle 5.4).

Tabelle 5.4: AIDA-Konstrukte

Konstrukt (Name)	Sequenz abgeleitet von	Sequenz in AIDA ... MAR – (Insert) - YRL ...	Länge (aa)
<b>AIDA-NCAM</b>	NCAM-Motiv (2)	EWKSLGEE <sup>u</sup> SWHFTWYD <u>A</u>	17
<b>AIDA-PLG</b>	PLG-Motiv (K3)	WCYTTDSQLRWEYCEIP	17
<b>AIDA-mPLG</b>	PLG-Motiv (K3)	WAYTTDSQLRWEYAEIP	17
<b>AIDA-LRP</b>	LRP-Motiv (1)	<u>D</u> IPCNNKGAHSVGLMWWMLAR	21
<b>AIDA-K3</b>	Kringle-Domäne 3	s. Anhang	84
<b>AIDA-Flag</b>	Flag-Tag	DYKDDDDK <u>A</u>	9

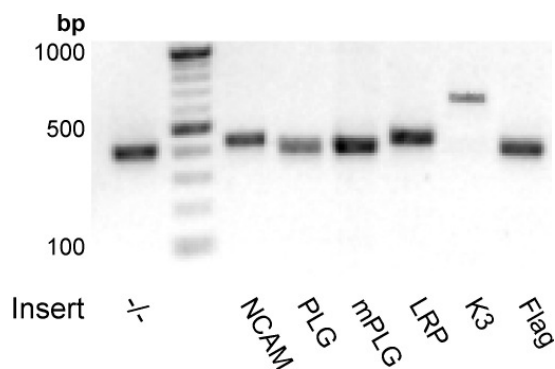
Zusätzliche Aminosäuren, die zum Erhalt des Leserasters eingefügt wurden und weder AIDA- noch Insert-spezifisch sind, wurden unterstrichen. Das aminoternale Glutamat (E) des NCAM-Motivs entstammt der murinen NCAM-Sequenz. Das Plasminogen-Kernmotiv wurde carboxyterminal verlängert und enthält dadurch zwei der in Kringle-Domänen konservierten Cysteine (C).

AIDA-NCAM beinhaltet das peptidische NCAM-Motiv, das in den *in vitro*-Tests die höchste PrP-Bindekapazität zeigte. Das der Kringle-Domäne 3 von murinem Plasminogen entstammende PLG-Peptidmotiv wurde in zwei Varianten kloniert. AIDA-PLG enthielt die Originalsequenz mit zwei Cysteinen: die Cystein-Reste könnten durch Bildung einer internen Disulfidbrücke möglicherweise die Ausbildung einer Loop-Struktur begünstigen, die der *in situ*-Konformation des Peptids im Kontext der Kringle-Domäne entspricht (s. auch Abb. 5.12, Abschnitt 5.3.2). In AIDA-mPLG (m: modifiziert) wurden beide Cystein-Reste durch Alanin substituiert, wodurch zum einen der AIDA-vermittelte Export erleichtert werden könnte. Des weiteren könnte ein Vergleich beider Konstrukte Aufschluss darüber geben, inwieweit die Tertiärstruktur Einfluss auf die PrP-Affinität des Kringle-Peptids besitzt. AIDA-LRP enthält das von Hundt *et al.* [162] postulierte PrP-bindende 20-mer Peptid des Laminin Rezeptor Precursors. Zur Verwendung als Kontrolle in AIDA-Expressionsstudien und in Bindungsstudien mit PrP wurde weiterhin der sogenannte Flag-Tag kloniert; dieses 8-mer Sequenzmotiv kann mit dem monoklonalen anti-Flag M2 Antikörper ( $\alpha$ -Flag) spezifisch detektiert werden.

Zusätzlich zu der Klonierung der peptidischen PrP-Binder konnte die stabile Insertion der polypeptidischen und potentiell Sekundär- und Tertiärstrukturreichen Kringle-Domäne 3 aus murinem Plasminogen erreicht werden. Die DNA-Sequenz wurde hierfür aus muriner Leber-cDNA amplifiziert. Die verwendeten Primer (K3-843F und K3-1097R) enthielten Erkennungsstellen für die Restriktionsendonukleasen XmaI und KpnI, über die das Amplifikat wie die synthetischen DNA-Fragmente in pMK90 ligiert werden konnte. Das K3-Insert

umfasste den Bereich der Basenpaare 843-1097 der für Plasminogen kodierenden Sequenz (GenBank Accession No. BC057186) bzw. die Aminosäuren 271-354 des Proteins (SwissProt Accession No. P20918). Der Versuch der Klonierung und AIDA-vermittelten Expression der kompletten Kringle-Domänen 1-3 schlug jedoch fehl. Zwar konnte die kodierende Sequenz mit Hilfe unterschiedlicher Primerpaare (K123-321F/K3-1097R bzw. K123-261F/K3-1097R) aus cDNA amplifiziert werden; eine stabile Integration des Amplifikats in pMK90 nach Restriktion und Reinigung der Fragmente bzw. eine stabile Transformation der Bakterien mit dem modifizierten Plasmid wurde jedoch nicht erreicht. Der Grund hierfür war wahrscheinlich die Größe und umfangreiche Tertiärstruktur der in *E. coli* konstitutiv exprimierten modifizierten AIDA-Passengerdomäne, die das 256 Aminosäuren umfassende Kringle 1-3 Inserts enthielt.

Nach Insertion der jeweiligen DNA-Fragmente in den linearisierten Vektor pMK90 und Transformation des Plasmids in *E. coli* C600-Zellen wurden positive Transformanden durch ‚colony PCR‘ identifiziert. Vor der weiteren Verwendung eines Klons wurde durch doppelsträngige Sequenzierung mit den pMK90-spezifischen Primern pMK-3367F und pMK3777R die korrekte Insertion im Leseraster und die Abwesenheit von Mutationen verifiziert.



**Abbildung 5.21: Kontroll-PCR der Plasmid-konstrukte.** Die Amplifikation der ‚Multiple Cloning Site‘ von pMK90-Derivaten mit den vektorspezifischen Primern pMK-3367F und pMK3777R zeigt die mit der Insertlänge variierende Größe des PCR-Produkts. Je 8  $\mu$ l eines 20  $\mu$ l Reaktionsansatzes wurden über ein 1,2 %iges Agarosegel aufgetrennt; die DNA-Fragmente wurden im ChemiDoc 2000 System visualisiert.

### 5.5.2 Untersuchungen zur AIDA-vermittelten Expression von PrP-Liganden

Vor der Durchführung von PrP-Bindungsstudien mit den gentechnisch veränderten Bakterien sollte die konstitutive Expression und die Membranintegration des modifizierten, mit heterologen Insertionen versehenen AIDA-Autotransporters in transformierten Bakterien nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde nach einem für die Durchführung der Bindungsstudien geeigneten *E. coli*-Stamm gesucht. Die hergestellten Varianten des Plasmids pMK90, die zunächst in *E. coli* C600 propagiert worden waren, wurden daher zusätzlich in den OmpT-defizienten *E. coli*-Stamm BL21 eingeführt.

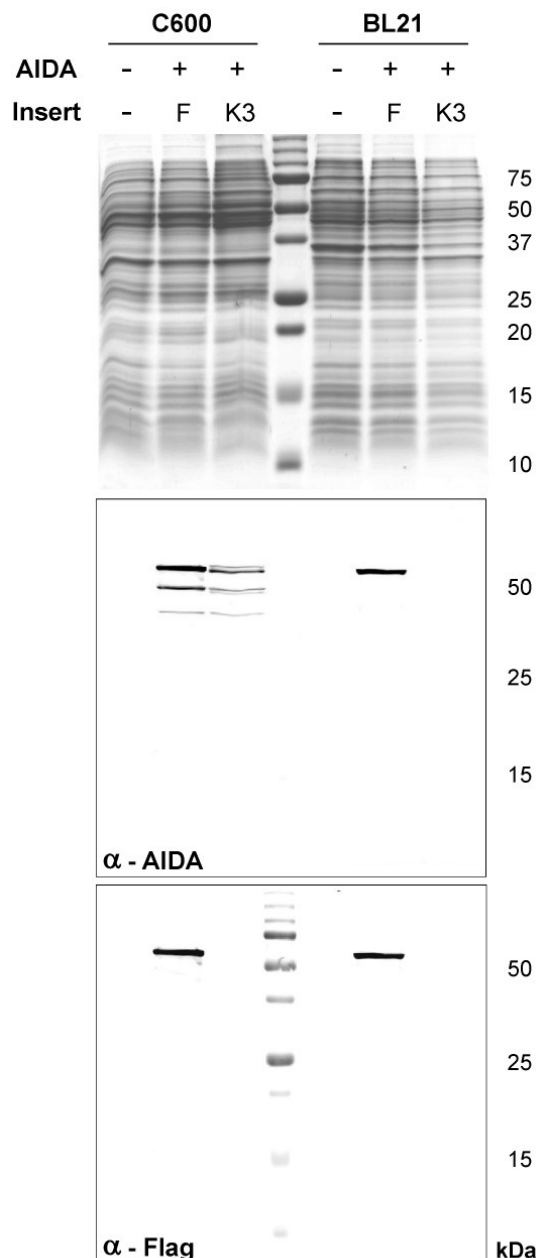
OmpT (‘outer-membrane protease T’) ist eine in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien verankerte Protease, die als bakterieller Virulenzfaktor z.B. antimikrobielle Peptide degradieren [167] oder durch Spaltung das Zymogen Plasminogen aktivieren kann [168]. Bei Vorhandensein einer OmpT-Konsensussequenz können jedoch auch heterolog in *E. coli* exprimierte, sezernierte Proteine angegriffen werden [169, 170]. Eine potentielle Schnittstelle für OmpT wurde auch in der aminoterminalen  $\beta$ 1-Domäne der AIDA<sup>c</sup>-Translokationseinheit identifiziert, die im verwendeten pMK90-kodierten AIDA-Konstrukt enthalten ist [138]. In verschiedenen Studien mit dem AIDA-Autotransporter konnte daher eine partielle OmpT-vermittelte Freisetzung von N-terminal der Schnittstelle eingefügten Passenger-Domänen beobachtet werden [135, 140].

Zur Analyse der Expressionsaktivität und der Sensitivität der unterschiedlichen in dieser Arbeit hergestellten AIDA-Varianten gegenüber OmpT-vermittelter Degradation wurden exponentiell wachsende Hauptkulturen der gentechnisch veränderten Bakterien bei einer OD<sub>600</sub> von circa 0,8 geerntet; die Bakterienzellen wurden lysiert und in Western Blots mit spezifischen Antikörpern untersucht.

Abbildung 5.22 zeigt eine repräsentative Analyse der Expression von AIDA-Flag und AIDA-K3 in den *E. coli*-Stämmen C600 und BL21. Für das AIDA-Flag Konstrukt konnten im Western Blot für beide Wirts-Spezies deutliche AIDA- und Flag-spezifische Signale detektiert werden. Dagegen konnte in *E. coli* BL21 Zellen keine Expression des AIDA-K3 Konstrukts beobachtet werden, während bei Transformation des pMK90-K3-Plasmids in C600-Zellen ein deutliches AIDA-spezifisches Signal in Lysaten detektiert wurde (Abb. 5.22, Mitte). In Ermangelung eines kommerziell erhältlichen Kringle 3-spezifischen Antikörpers konnte der Expressionsnachweis des Konstrukts nur indirekt durch Detektion von AIDA durchgeführt werden.

Die geringere AIDA-spezifische Signalintensität des C600-(AIDA-K3) Lysats relativ zu der des C600-(AIDA-Flag) Lysats, die sich im gezeigten Western Blot andeutet und in weiteren Blotting-Experimenten bestätigt wurde, korreliert mit der Beobachtung einer geringeren Wachstumsgeschwindigkeit der AIDA-K3 exprimierenden *E. coli* C600. Dies spricht für einen durch die Expression der voluminösen K3-Domäne verursachten Wachstumsnachteil, der sich in geringeren Teilungsraten und einer verminderten AIDA-K3 Expression niederschlägt. Alle anderen verwendeten pMK90-Derivate, die ähnlich dem AIDA-Flag Konstrukt nur für kleine Peptid-Insertionen in AIDA kodierten, zeigten sowohl in C600- als auch in BL21-Zellen eine im Vergleich zum nicht modifizierten Autotransporter unveränderte AIDA-Expressionsaktivität. Eine Beeinträchtigung des Bakterienwachstums konnte ebenfalls nicht festgestellt werden.

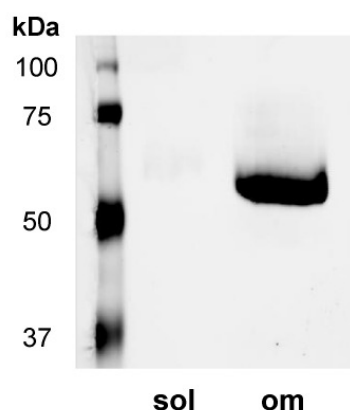




**Abbildung 5.22: Analyse der pMK90-vermittelten Expression von AIDA-Derivaten in *E. coli* C600 und *E. coli* BL21.** Exponentiell wachsende Hauptkulturen wurden geerntet und in D-PBS auf eine  $OD_{600}$  von 10 eingestellt. Aus 250  $\mu$ l der Suspensionen wurden die Bakterien durch Zentrifugation isoliert, im gleichen Volumen BugBuster Reagenz aufgenommen und lysiert. Die Lysate wurden mit 4x SDS PAGE Auftragspuffer versetzt und je 8  $\mu$ l wurden zusammen mit dem vorgefärbten Precision Plus All Blue Protein Standard auf zwei SDS-Polyacrylamid (PA) Gele (10 % PA) geladen. Ein Gel wurde mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt (oben). Der 'Two-color' Western Blot des zweiten Gels ist in den unteren Abbildungen dargestellt. Als Primärantikörper wurden  $\alpha$ -AIDA (nachgewiesen mit  $g\alpha r$ -800) und  $\alpha$ -Flag (nachgewiesen mit  $g\alpha m$ -680) verwendet. Die Auswertung im Odyssey Infrared Imager erfolgte im 800 nm-Kanal für  $\alpha$ -AIDA/ $g\alpha r$ -800 und im 700 nm-Kanal für  $\alpha$ -Flag/ $g\alpha m$ -680 und ist hier im schwarz-weiß-Modus getrennt dargestellt. Der Molekulargewichtsstandard ist hier nur im 700 nm-Kanal sichtbar. Nicht transformierte *E. coli* C600 und *E. coli* BL21-Zellen dienten als Negativ-Kontrolle. (F: AIDA-inserterter Flag-Tag, K3: AIDA-inserierte Kringle-Domäne 3)

Durch Detektion mit dem AIDA-spezifischen Serum war die durch OmpT verursachte partielle Degradation von AIDA in C600-Zellen gut nachweisbar, die bei Expression in BL21-Zellen nicht beobachtet werden konnte (Abb. 5.22, Mitte). Das Flag-spezifische Signal (Abb. 5.22, unten) kolokalisiert bei Lysaten beider Wirtsspezies mit der Proteinbande des nicht degradierten AIDA ( $MW_{AIDA} = \sim 55,8$  kDa), was für eine spezifische Abspaltung des Flag-Passenger-Peptids durch OmpT spricht. Eine Quantifizierung der AIDA-spezifischen Signalintensitäten zeigte jedoch, dass der Großteil des Proteins in intakter Form vorlag; dies konnte für alle heterolog exprimierte AIDA-Konstrukte bestätigt werden (nicht gezeigt). Die Nutzung von *E. coli* C600 statt *E. coli* BL21 für die heterologe Expression von AIDA-Derivaten bewirkte also eine Reduktion der Menge an oberflächenexponiertem Peptid, nicht jedoch die komplette Elimination.

Um zu untersuchen, ob in *E. coli* C600 trotz partieller OmpT-vermittelter Degradation eine korrekte Insertion des AIDA-Autotransporters in die äußere bakterielle Membran und eine Exposition der Passenger-Domäne stattfand, wurden durch differentielle Fraktionierung mit Proteinen der äußeren Membran angereicherte Fraktionen isoliert. Diese Fraktion wurde für alle Bakterien-Konstrukte im Western Blot auf das Vorhandensein von AIDA hin analysiert; für AIDA-Flag wurde der Nachweis zusätzlich mit dem Flag-spezifischen Antikörper durchgeführt (s. Abb. 5.23). Flag- bzw. AIDA-spezifische Signale konnten fast ausschließlich in der Membran-Präparation nachgewiesen werden.

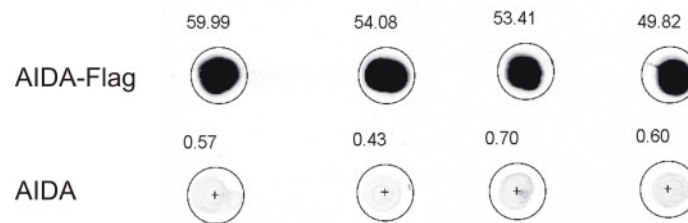


**Abbildung 5.23: Nachweis von AIDA-Flag in der äußeren Membran von *E. coli* C600.** Durch differentielle Fraktionierung wurde eine mit äußeren Membranen angereicherte Fraktion von den löslichen Proteinen des Cyto- und Periplasmas abgetrennt. 4  $\mu$ l der löslichen Fraktion (sol) und der äußeren Membran-Fraktion (om) wurden durch SDS-PAGE (10 % PA) getrennt und die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran überführt. Der Nachweis erfolgte mit  $\alpha$ -Flag/ $\alpha$ m-680.

Da bei Verwendung von *E. coli* C600 als pMK90-Wirt sowohl die Membranintegration des intakten AIDA Autotransporters als auch die Nachweisbarkeit des inserierten Peptids gewährleistet war, in *E. coli* BL21 jedoch nicht alle Konstrukte erfolgreich exprimiert werden konnten, wurde C600 als Wirtstamm für pMK90 in den weiteren Studien ausgewählt.

### 5.5.3 Bindungsstudien mit modifizierten Bakterien

Die Bindungskapazität der modifizierten *E. coli* C600 für murines PrP90-231 wurde in ‚Pull-Down Assays‘ überprüft. Exponentiell wachsende Bakterien aus Hauptkulturen wurden gewaschen und auf eine  $OD_{600}$  von 10 eingestellt. Nach Blockieren unspezifischer Proteinbindestellen wurden die Suspensionen mit PrP-680 versetzt, nach einer Inkubationszeit von 60 min gewaschen und in Dot Blots auf gebundenes, fluoreszierendes PrP-680 hin analysiert. AIDA-Flag exprimierende *E. coli* C600 dienten als Kontrolle; ein repräsentativer Dot Blot hierzu ist in Abbildung 5.24 gezeigt.

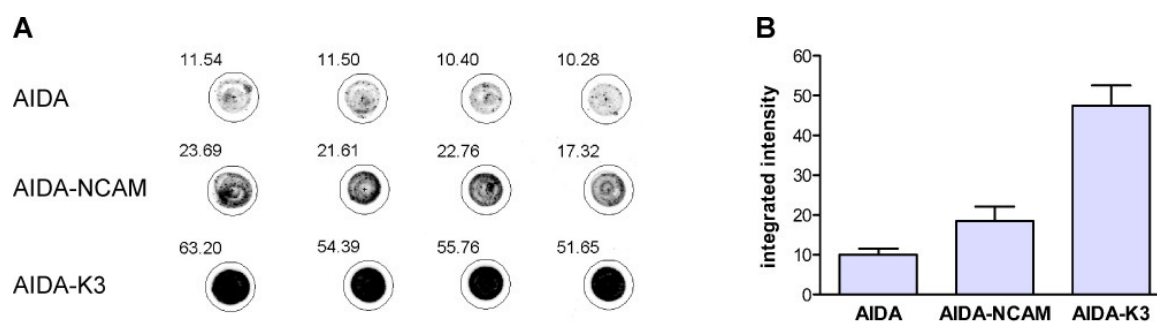


**Abbildung 5.24: Dot Blot Analyse eines Pull-Down Assays mit AIDA-Flag exprimierenden *E. coli* C600.** 50  $\mu$ l der Bakteriensuspensionen ( $OD_{600} = 10$ ) wurden mit 0,5  $\mu$ g  $\alpha$ -Flag inkubiert, anschließend gewaschen und in 50  $\mu$ l BugBuster Reagenz lysiert. Je 2  $\mu$ l der Lysate wurden in Quadruplikaten auf eine Nitrocellulosemembran getüpfelt und gebundener  $\alpha$ -Flag Primärantikörper wurde mit  $\gamma$ m-680 detektiert. Der Blot wurde im Odyssey Infrared Imager bei 700 nm ausgewertet und die Fluoreszenzintensitäten der mit den lysierten Bakterien behandelten Membranareale quantifiziert. Die erhaltenen Signalintensitäten sind über den jeweiligen Membranarealen angegeben. Bakterien, die den AIDA Autotransporter ohne Insertion exprimierten, wurden als Negativkontrolle verwendet.

Das Kontrollexperiment aus Abbildung 5.24 demonstriert das Vorhandensein, die Nachweisbarkeit und die Zugänglichkeit des Flag-Peptids auf der Oberfläche intakter Bakterien in Lösung. Trotz des indirekten Nachweisverfahrens mit Bindungsnachweis durch einen Sekundärantikörper ist die Hintergrundfluoreszenz bei C600-Zellen, die AIDA ohne die Flag-Tag Insertion exprimierten, vernachlässigbar.

Um die Menge an gebundenem Prionprotein in PrP-Bindungsstudien direkt mit dem Fluoreszenzsignal korrelieren zu können, wurden die Experimente zur Evaluierung der PrP-Bindungskapazität von modifizierten Bakterien mit fluorophorgekoppeltem Prionprotein (PrP-680) durchgeführt. Für die *E. coli* C600-Konstrukte AIDA-PLG, AIDA-mPLG und AIDA-LRP konnte keine Bindung von PrP-680 nachgewiesen werden. *E. coli*-C600, die AIDA-NCAM oder AIDA-K3 exprimierten, zeigten jedoch eine spezifische Adsorption des fluoreszenzmarkierten PrP90-231. Eine repräsentative Studie ist in Abbildung 5.25 gezeigt.

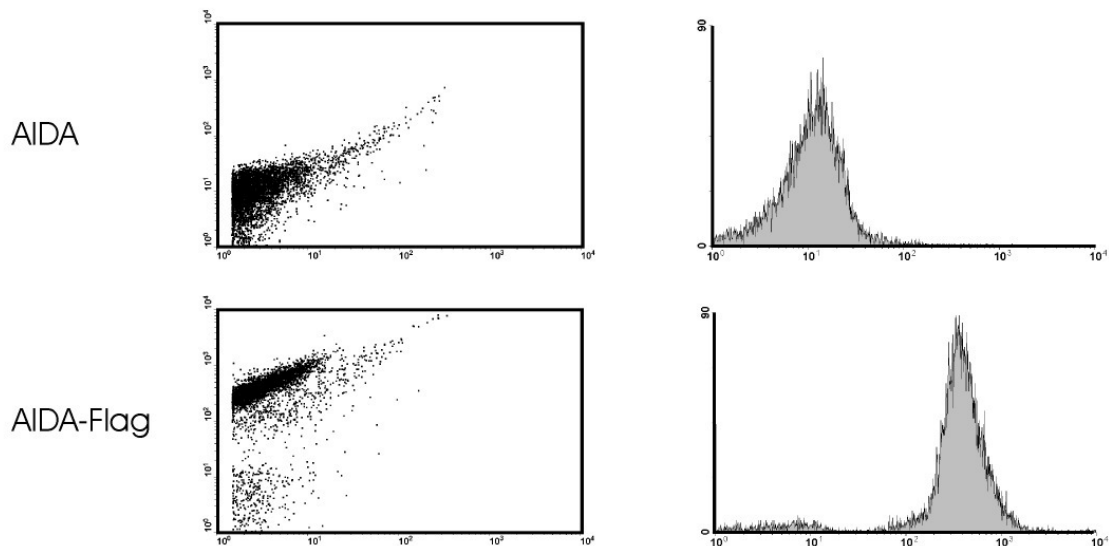
Die im Dot Blot detektierten Signalintensitäten für Bakterien, die die Konstrukte AIDA-NCAM und AIDA-K3 exprimierten, waren signifikant höher als die der Kontrolle (One-way Anova mit Bonferroni's Multiple Comparison Test,  $P < 0,001$ ). Da die Höhe des Fluoreszenzsignals als Maß für die PrP-Beladung der Bakterien angenommen werden kann, folgte daraus für AIDA-NCAM exprimierende *E. coli* C600 eine Verdopplung, für C600-(AIDA-K3) sogar eine ungefähr 5-fache Steigerung der PrP-Bindung relativ zu Bakterien, die das insertlose AIDA exprimierten.



**Abbildung 5.25: Dot Blot Analyse und Quantifizierung der PrP-680-Bindung an modifizierte Bakterien im ‚Pull-Down Assay‘.** 50  $\mu$ l der Bakteriensuspensionen ( $OD_{600} = 10$ ) wurden mit 0,5  $\mu$ g PrP-680 inkubiert, anschließend gewaschen und in 50  $\mu$ l BugBuster Reagenz lysiert. 2  $\mu$ l der Lysate wurden in Quadruplikaten auf eine Nitrocellulosemembran getüpfelt; die Membran wurde befeuchtet und im Odyssey Infrared Imager bei 700 nm ausgelesen. A: Auswertung eines repräsentativen Einzelerperiments im Dot Blot.. Die Quantifizierung der Signalintensitäten der einzelnen Dots erfolgte mit Hilfe der Odyssey Application Software und wurde über den jeweiligen Membranarealen angegeben. B: relative Quantifizierung der PrP-Bindungskapazität von *E. coli* C600, die AIDA-NCAM bzw. AIDA-K3 exprimierten. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus drei Experimenten; die Normalisierung aller Signalintensitäten erfolgte auf einen Wert von 10 für die Negativkontrolle AIDA.

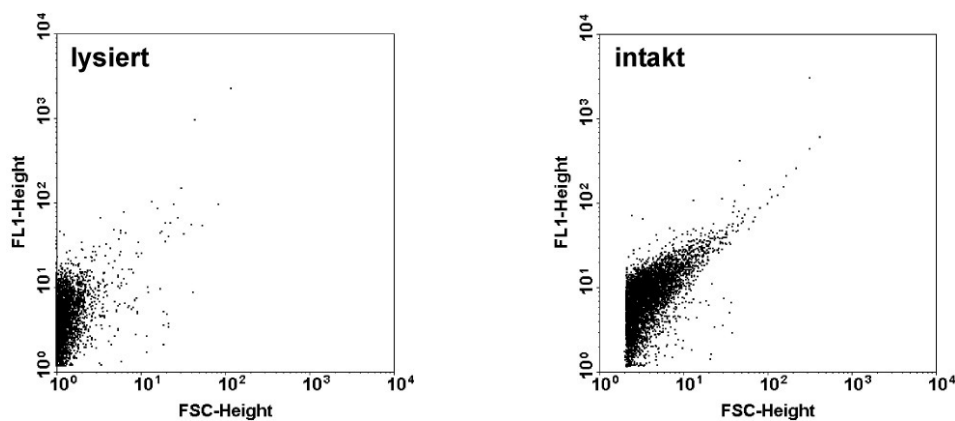
Die Detektion der Gesamtfluoreszenz eines bakteriellen Lysats durch Dot Blots ist jedoch fehleranfällig: Ungenauigkeiten bei der Einstellung der optischen Dichte oder der Verlust bakteriellen Materials während der Wasch-Schritte können im Nachhinein nicht kontrolliert oder korrigiert werden. Daher wurde mit der durchflusszytometrischen Messmethode ein Verfahren etabliert, das eine Analyse der Bakteriensuspensionen auf Einzelzellniveau ermöglichte und so zur Verifizierung der oben dargestellten Ergebnisse herangezogen werden konnte.

Für die immunzytometrischen Studien wurde 5-/6-Carboxyfluorescein-markiertes PrP (PrP-Fam) bzw. 5-/6-Carboxyfluorescein-markierter  $\alpha$ -Flag Antikörper ( $\alpha$ -Flag-Fam) verwendet. Sowohl im Dotplot (Abb. 5.26 links) als auch in der Häufigkeitsverteilung (Abb. 5.26 rechts) ist die Zunahme der Fluoreszenzintensität für AIDA-Flag exprimierende Bakterien deutlich erkennbar. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Experimente im 2-dimensionalen Dotplot, in dem zusätzlich zur Fluoreszenzintensität (FL1-Height) die Vorwärts-Lichtstreuung (FSC-Height) als zweiter Parameter und Maß für die Partikelgröße dargestellt wurde, ermöglichte darüber hinaus die Kontrolle der Unversehrtheit der Bakterienzellen. Abbildung 5.27 zeigt die vergleichende durchflusszytometrische Analyse intakter und lysierter *E. coli*-C600 Zellen. Die Tatsache, dass eine spezifische Bindung des  $\alpha$ -Flag Antikörpers an intakte Bakterienzellen erfolgte, stellt einen weiteren Hinweis auf die Exposition des Liganden auf der Zelloberfläche dar.



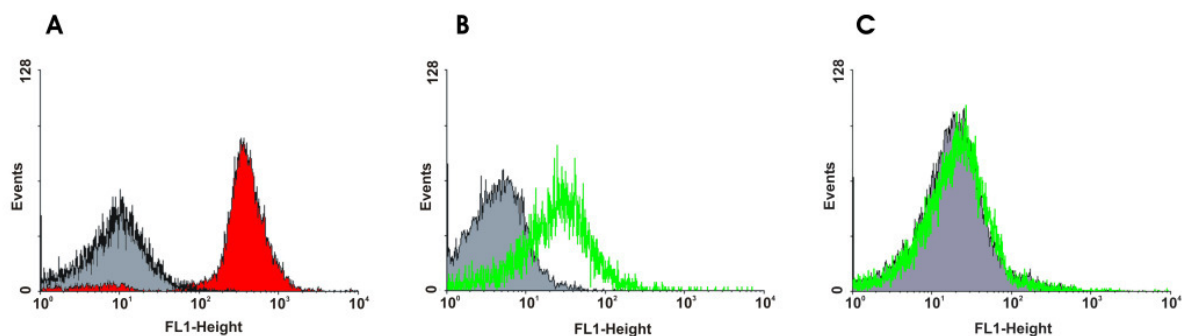
**Abbildung 5.26: Immunzytometrischer Nachweis des FLAG-Peptids auf der bakteriellen Oberfläche.**

Je 50  $\mu\text{l}$  der Bakteriensuspensionen (C600-AIDA bzw. C600-(AIDA-Flag);  $\text{OD}_{600} = 10$ ) wurden mit 0,5  $\mu\text{g}$   $\alpha$ -Flag-Fam inkubiert und gewaschen. Je 10.000 ‚Ereignisse‘ bzw. ‚Events‘ (Zellzahl) wurden im FACSCalibur analysiert. Links sind Dotplots für je 5.000 Ereignisse (x-Achse: FSC-Height (forward scatter/Vorwärts-Streulicht); y-Achse: FL1-Height (Fluoreszenzintensität)), rechts die dazugehörigen Histogramme für je 10.000 Ereignisse (x-Achse: FL1-Height; y-Achse: ‚Events‘/Zellzahl) dargestellt.



**Abbildung 5.27: Durchflusszytometrische Analyse intakter und lysierter *E. coli* C600-Zellen.** Die Suspension nicht transformierter Bakterien wurde in D-PBS auf eine  $\text{OD}_{600}$  von 10 eingestellt. Für die Erzeugung lysierter Bakterien wurden 50  $\mu\text{l}$  abgenommen, sedimentiert und für 5 min in 50  $\mu\text{l}$  BugBuster Reagenz inkubiert. Je 50  $\mu\text{l}$  der intakten, unbehandelten Bakterien und des Lysis-Ansatzes wurden in je 1 ml D-PBS suspendiert und je 5.000 Ereignisse wurden im FACSCalibur analysiert. Links: lysierte Zellen bewirken aufgrund der geringeren Partikelgröße eine geringere Lichtstreuung im FSC-Modus. Rechts: Analyse intakter *E. coli* C600 (bei einem Threshold (Schwellenwert) von 100 für FSC-Height). Um eventuell vorhandene Zelltrümmer nicht in die Auswertung mit einzubeziehen, wurde für die zytometrischen Analysen von Bakterien der Schwellenwert für die FSC-Detektion auf 100 festgesetzt.

Abbildung 5.28 zeigt die repräsentative Auswertung einer Prionprotein-Bindungsstudie im FACSCalibur Durchflusszytometer. Die in den Dot Blots festgestellte Verdopplung der PrP-Bindungskapazität für das AIDA-NCAM Konstrukt konnte nicht reproduziert werden; auch für die anderen bakteriellen Konstrukte, die peptidische PrP-Liganden (AIDA-PLG, AIDA-mPLG, AIDA-LRP) exprimierten, konnte in diesem Assayformat keine PrP-Bindung nachgewiesen werden. Die Expression von AIDA-K3 jedoch bewirkte eine deutliche Erhöhung der Fluoreszenzintensität relativ zu Bakterien, die das insertlose AIDA exprimierten.



**Abbildung 5.28: Durchflusszytometrische Analyse der PrP-Fam Bindung an modifizierte *E. coli*.**

50  $\mu$ l Bakteriensuspension ( $OD_{600} = 10$ ) wurden mit 0,5  $\mu$ g  $\alpha$ -Flag-Fam (A) oder 0,5  $\mu$ g PrP-Fam (B, C) inkubiert und gewaschen. Je 10.000 Ereignisse wurden im FACSCalibur analysiert und zur Auswertung als Häufigkeitsverteilung (x-Achse: Fluoreszenzintensität; y-Achse: Ereignisse/Events) dargestellt. Als Referenz (grau unterlegt) wurden in allen Fällen gleich behandelte AIDA-exprimierende *E. coli* C600 verwendet. (A: C600-(AIDA-Flag), rot unterlegt; B: C600-(AIDA-K3), grün; C: C600-(AIDA-NCAM), grün).

Die Rechtsverschiebung der Kurve im Histogramm, die gleichbedeutend ist mit einer Fluoreszenz-Zunahme der detektierten Bakterien, war bei PrP-Fam behandelten AIDA-K3 exponierenden Bakterien reproduzierbar geringer als bei  $\alpha$ -Flag-Fam behandelten C600-(AIDA-Flag). Dies deutet zwar auf den ersten Blick auf eine niedrigere Affinität der Interaktion des Prionproteins mit AIDA-K3 exprimierenden *E. coli* im Vergleich zu der des anti-Flag Antikörpers mit AIDA-Flag exprimierenden *E. coli* hin. Eine geringere Fluoreszenzintensität korreliert jedoch nicht zwangsläufig mit einer geringeren Bindungsaffinität der Bakterien zu ihrem Liganden, sondern steht auch in Zusammenhang mit dem Derivatisierungsgrad (Fluorophorbeladung) des zur Detektion verwendeten Proteins. Dieser war für das Prionprotein deutlich geringer als für  $\alpha$ -Flag-Fam (s. Abschnitt 5.2.4). Auch die geringere Exporteffizienz der Kringle 3-Domäne könnte hier eine Rolle spielen, da sie die Menge an zur Verfügung stehenden Bindungspartnern limitiert.

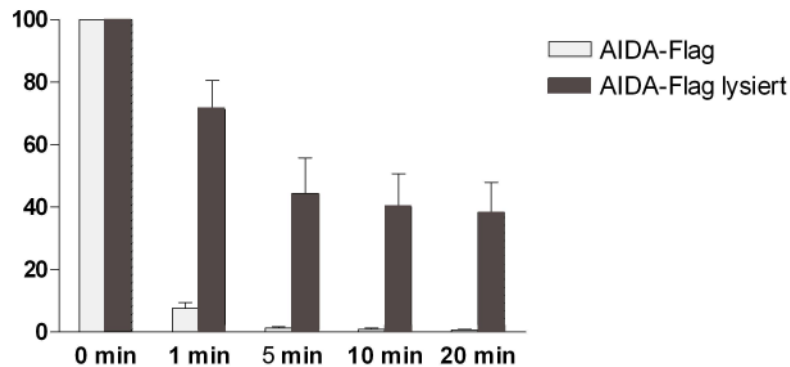
## 5.6 Stabilität von C600-(AIDA-K3) im Dünndarmlumen

Im vorherigen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass Kringle 3-exponierende *Escherichia coli*-Zellen effiziente PrP-Binder darstellen. Als zusätzliches Kriterium für eine wirksame PrP-Adsorption durch bakterielle Enterosorbentien und damit eine zuverlässige Elimination infektiöser Prionen im Gastrointestinaltrakt muss aber der exponierte PrP-Binder fest auf der bakteriellen Oberfläche verankert bleiben und den proteolytischen Enzymen des Darms widerstehen. Um die Persistenz der PrP-adsorptiven Eigenschaften von C600-(AIDA-K3) im intestinalen Milieu zu untersuchen, wurden intakte Bakterienzellen mit Dünndarmproteasen behandelt und im Anschluss auf ihre Rest-Bindungsaktivität für PrP90-231 hin untersucht. Um eine möglichst gute Annäherung an die *in vivo*-Verhältnisse zu erreichen, wurde für die Analysen statt artifiziell zusammengesetzter Enzymlösungen eine murine Dünndarmlavage (Verdünnungsfaktor 1:20) verwendet.

### 5.6.1 Sensitivität des E. coli-exponierten Flag-Peptids gegenüber intestinalen Proteasen

Zur Etablierung des bakteriellen Proteolyse-Assays wurden *E. coli* genutzt, die das Reporterepitop Flag exponierten. C600-(AIDA-Flag) wurden im exponentiellen Wachstumsstadium geerntet und gewaschen; das Bakteriensediment wurde in einer OD<sub>600</sub> von 10 in muriner Dünndarmlavage aufgenommen und bei 37 °C und 300 rpm inkubiert. Zusätzlich wurde eine Präparation partiell lysierter C600-(AIDA-Flag) eingesetzt; diese Zellen wurden vor dem Aufnehmen in der Lavage-Flüssigkeit durch dreimaliges Erhitzen auf 90 °C und anschließendes Einfrieren denaturiert. In definierten Zeitintervallen wurden dem Proteolyse-Ansatz Proben entnommen, der Verdau wurde gestoppt und die Bakterien wurden im Dot Blot auf die Detektierbarkeit des Flag-Peptids hin untersucht (s. Abbildung 5.29).

Die Nachweisbarkeit des AIDA-vermittelt exponierten Flag-Peptid auf intakten Bakterien war bereits nach einer 1-minütigen Inkubation in muriner Dünndarmlavage drastisch reduziert ( $7,7 \pm 1,9$  % Rest-Signalintensität relativ zu unverdauten C600-(AIDA-Flag)) und nach 5 min vollständig eliminiert. Die deutlich langsamer verlaufende Reduktion des Flag-spezifischen Signals beim Verdau des C600-(AIDA-Flag)-Lysats kann als ein Hinweis auf die Intaktheit der Bakterien im nicht vorbehandelten Ansatz gewertet werden: Durch das extrazelluläre Vorliegen alternativer Substratproteine („Opferproteine“), die durch Ruptur der Bakterienzellwand aus dem Zellinneren in das umgebende Medium austreten konnten, wurde das Flag-Peptid weniger schnell abgebaut. Das Experiment kann daher auch als weiterer Hinweis für die Oberflächenexposition des heterologen Passengers angeführt werden.



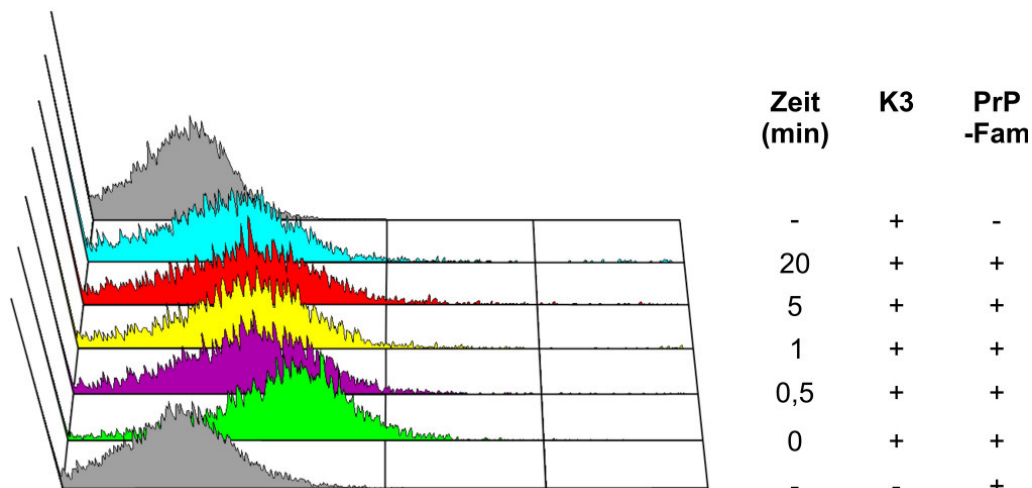
**Abbildung 5.29: Nachweisbarkeit des Flag-Peptids nach Inkubation von C600-(AIDA-Flag) in muriner Dünndarmlavage.** Nach 1, 5, 10 und 20 min Inkubation in muriner Dünndarmlavage wurden den Proteolyseansätzen lysierter und intakter C600-(AIDA-Flag) Proben (50  $\mu$ l) entnommen. Der Verdau wurde gestoppt, die intakten Bakterien bzw. Bakterientrümmern gewaschen und je beide Ansätze in je 50  $\mu$ l BugBuster Reagenz vollständig lysiert. Als Kontrolle (Wert für 0 min) dienten unverdaute Zellen, die in Bezug auf die Wasch-Schritte und die Zell-Lyse identisch behandelt worden waren. Je 2  $\mu$ l der Lysate wurden in Duplikaten auf einer Nitrocellulosemembran immobilisiert und durch Inkubation mit  $\alpha$ -Flag/ $\gamma$ m-680 auf die Detektierbarkeit des Flag-Peptids hin untersucht. Die Signalintensitäten wurden quantifiziert und auf einen Wert von 100 % für das jeweilige unverdaute bakterielle Konstrukt normalisiert. Die Werte repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler aus zwei Experimenten. Y-Achse: Signalintensität relativ zum unverdauten bakteriellen Konstrukt in %.

Eine Analyse der proteolytischen Sensitivität des *E. coli*-exponierten Flag-Peptids durch an den Bakterienverdau angeschlossenen Pull-Down Assay mit  $\alpha$ -Flag-Fam und nachfolgender Analyse im FACSCalibur zeigte übereinstimmend mit der Auswertung im Dot Blot (Abb. 5.29) eine rasante Degradation des Flag-Peptids auf der bakteriellen Oberfläche. Immunzytometrisch konnte bereits nach 30-sekündiger Inkubation in muriner Dünndarmlavage kein Signal mehr gemessen werden (nicht gezeigt).

### 5.6.2 Einfluss intestinaler Proteasen auf die PrP-Bindungskapazität von C600-(AIDA-K3)

C600-(AIDA-K3) wurden ähnlich der im vorhergehenden Abschnitt für C600-(AIDA-Flag) vorgestellten experimentellen Vorgehensweise auf die proteolytische Sensitivität der Kringle 3-Domäne hin analysiert. C600-(AIDA-K3) wurden für unterschiedliche Zeitspannen der Intestinallavage ausgesetzt; anschließend wurde durch Pull-Down Assays mit PrP-Fam und anschließende durchflusszytometrische Analyse die verbliebene PrP-Bindungskapazität der Bakterien bestimmt. Abbildung 5.30 zeigt die graphische Darstellung eines repräsentativen Experiments. Die Auswertung im FSC (Vorwärts-Streulicht)-Modus ergab keinen Hinweis auf eine eventuelle Zerstörung der zellulären Integrität durch die Enzymbehandlung.





**Abbildung 5.30: Immunzytometrische Messung der PrP-Bindungskapazität von C600-(AIDA-K3) nach Inkubation in muriner Dünndarmlavage.** Nach 30 s, 1 min, 5 min und 20 min wurden dem Proteolyse-Ansatz Proben entnommen und die Bakterien auf ihre Fähigkeit zur PrP-Fam-Bindung hin untersucht. Zur Kontrolle (grau unterlegt) der spezifischen Bindung im Pull-Down Assay dienten mit PrP-Fam behandelte *E. coli* C600-AIDA (unten) bzw. nicht mit PrP-Fam behandelte *E. coli* C600-(AIDA-K3) (oben). C600-(AIDA-K3), die statt in Intestinallavage in SIF-Puffer inkubiert worden waren, wurden für die Bestimmung der Bindungskapazität unverdauter Zellen verwendet (Wert für 0 min, grün). Y-Achse: Ereignisse/Zellzahl; X-Achse: FL1-Height (Fluoreszenzintensität, Bindung von PrP-Fam).

Während bei C600-(AIDA-Flag) bereits nach einer halbminütigen Inkubation in der Proteaselösung durchflusszytometrisch keine Flag-spezifischen Signale mehr nachweisbar waren, erfolgte der enzymatische Abbau der Kringle-Domäne offensichtlich deutlich langsamer: Selbst nach einer Inkubationsdauer von 20 min wurde die PrP-Bindung nur um die Hälfte reduziert.

Die halbmaximale PrP-Fam Adsorption (halbmaximales Fluoreszenzsignal relativ zu unverdauten C600-(AIDA-K3)) bei einer Inkubationsdauer von 20 min lässt unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (1:20) der Intestinallavage auf eine Halbwertszeit von circa einer Minute im unverdünnten Dünndarm-Sekret schließen. Das reale Ausmaß der Stabilität der PrP-Bindung von C600-(AIDA-K3) *in vivo* ist hierdurch jedoch nicht genau bestimmbar, da im Dünndarm weitere, nur schwer quantifizierbare Faktoren eine Rolle spielen. Hierzu gehört zum einen die Frage der Zugänglichkeit der Bindedomäne für Proteasen im Mikrohabitat des Bakteriums, das Vorhandensein konkurrierender Nahrungsproteine und die permanente Neuexpression von AIDA-K3, die für den Ersatz degradierter PrP-Bindedomänen sorgt.

## 6 Ergebnisse (Teil II)

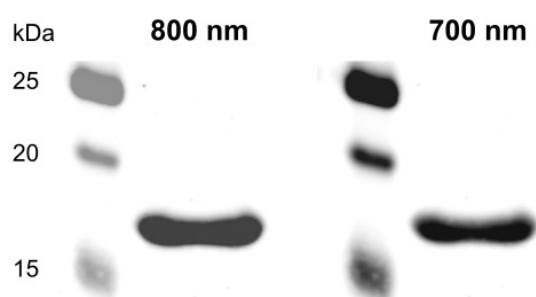
Im Zuge der Entwicklung des Enzymgekoppelten Immunoassays zur Bindungsanalyse biotinmarkierter Peptide an immobilisiertes Prionprotein 90-231 (s. Abschnitt 5.4.3) konnte eine starke und reproduzierbar auftretende Bindung des Streptavidin-basierten Detektionssystems an das zur Beschichtung der Mikrotiterplatten eingesetzte PrP90-231 festgestellt werden. Motivation zur genaueren Analyse dieser Interaktion war zum einen die Chance der Identifizierung eines neuen, peptidischen PrP-Bindemotivs mit eventueller Eignung für die Nutzung im bakteriellen Display-System; zum Zweiten die Chance einer Eliminierung der Bindung, was für die Funktionalität des ELISA essentiell war. Weiterhin war die potentielle biologische Relevanz der Interaktion des N-terminal verkürzten PrP90-231 mit dem biotinbindenden Protein Streptavidin von Interesse.

Teile der hier dargestellten Ergebnisse wurden unter dem Titel *„Prion protein 90-231 contains a streptavidin-binding motif“* in der Zeitschrift *„Biochemical and Biophysical Research Communication“* publiziert [157].

### 6.1 Nachweis der Interaktion von Streptavidin mit PrP90-231

Zum direkten Nachweis der Streptavidin-Bindung an PrP90-231 unabhängig vom ELISA-Format wurden Western-Blots mit gereinigtem PrP90-231 durchgeführt. Hierfür wurde das rekombinante murine PrP90-231 nach Separation durch SDS-PAGE auf Nitrocellulosemembranen transferiert und die Membranen entweder mit 1 µg/ml Meerrettich-Peroxidase (HRP)-markiertem Streptavidin (SA-HRP) oder mit 0,2 µg/ml Alexa Fluor 680-markiertem Streptavidin (SA-680) behandelt. Der Nachweis von gebundenem SA-HRP erfolgte mit Hilfe eines Chemilumineszenz-Substrats und Signaldetektion im ChemiDoc 2000 System, während die Bindung von SA-680 im Odyssey Infrared Imaging System analysiert wurde. Als Kontrollen wurden der direkt markierte  $\alpha$ -His<sub>6</sub>-800 Antikörper und der PrP-spezifische Antikörper 6H4 verwendet. PrP-spezifische Signale konnten sowohl bei mit SA-HRP behandelten Blots als auch bei Nutzung des fluoreszenzmarkierten SA-680 detektiert werden. Dies zeigte, dass die Bindung an PrP90-231 Streptavidin-spezifisch ist und nicht durch die Meerrettich-Peroxidase verursacht wurde. Ein Vergleich der Nachweissensitivität in Dot Blots mit Immobilisierung serieller PrP90-231 Verdünnungen zeigte ein PrP-Detektionslimit von 0,1 pmol (~ 2 ng) PrP90-231 bei indirekter Detektion mit dem monoklonalen anti-PrP Antikörper 6H4 und  $\alpha$ m-680, während die Detektionsgrenze bei Nutzung des direkten Nachweisverfahrens mit  $\alpha$ -His<sub>6</sub>-800 deutlich höher lag (12,5 pmol (~ 230 ng) PrP90-231). Die in analoger Weise durchgeführte Analyse der PrP90-231

Nachweisgrenze für fluoreszenzmarkiertes Streptavidin ergab, dass wie beim Nachweis mit  $\alpha$ -His<sub>6</sub>-800 noch mit 12,5 pmol immobilisierten Prionproteins eine Interaktion detektiert werden konnte. Aufgrund des identischen Nachweisverfahrens für SA-680 und  $\alpha$ -His<sub>6</sub>-800 mit direkter Detektion im Odyssey Infrared Imager wurde im Folgenden  $\alpha$ -His<sub>6</sub>-800 (statt des 6H4/g $\alpha$ m-680-Systems) als Positivkontrolle verwendet. Dies hatte den zusätzlichen Vorteil, dass beide Nachweisreagentien im selben Inkubationsschritt in gleicher Konzentration zu einem Blot zugegeben werden konnten; der Nachweis erfolgte durch ‚Two-color‘-Detektion bei 700 und 800 nm. Ein repräsentativer Western Blot ist in Abbildung 6.1 dargestellt.



**Abbildung 6.1: Nachweis der Streptavidin-Bindung an immobilisiertes PrP90-231 im Western Blot.** 0,4 nmol PrP90-231 wurden nach SDS-PAGE auf eine Nitrocellulosemembran überführt und in einem ‚Two-color‘ Experiment mit je 0,2  $\mu$ g/ml SA-680 und  $\alpha$ -His<sub>6</sub>-800 behandelt.

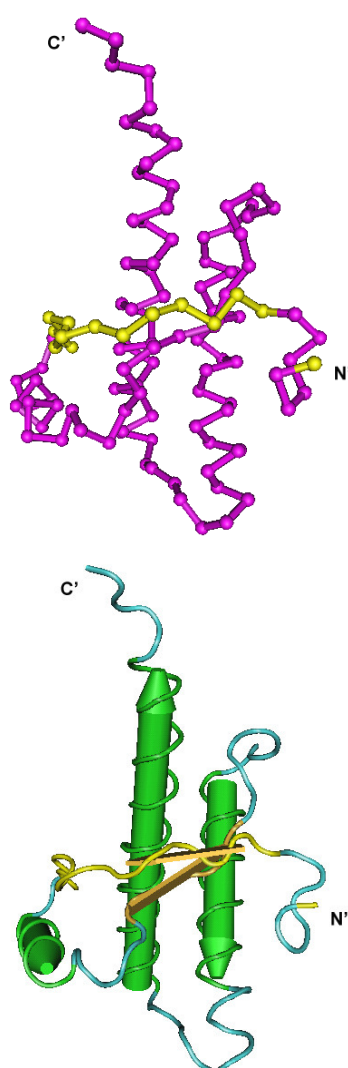
## 6.2 Kartierung und Analyse linearer Bindestellen

Eine Kartierung linearer Bindestellen wurde für beide Proteine (Prionprotein und Streptavidin) vorgenommen. Hierfür wurden die Aminosäuren 23-231 der Sequenz des murinen Prionproteins (SwissProt Accession No. P04925) und die Aminosäuren 25-183 des Streptavidin Precursors (SwissProt Accession No. P22629) im Versatz um je eine Aminosäure als 16-mer Peptidbibliothek dargestellt und in Duplikaten synthetisiert. Die Identifikation PrP-bindender Peptide innerhalb der Streptavidin-Bibliothek erfolgte wie für die Kartierung der PrP-Ligandenproteine (Abschnitt 5.3) beschrieben. Lineare Bindestellen für Streptavidin innerhalb des murinen Prionproteins wurden durch Analyse der PrP-Peptidbibliotheken, die mit 0,1  $\mu$ g/ml SA-680 behandelt wurden, identifiziert. Bereiche mit PrP- bzw. Streptavidin-Affinität wurden im Anschluss durch Analyse verkürzter Peptide und durch ‚Alanin-Scans‘ auf die affinitätsbestimmenden Kernbereiche und die für die Bindung essentiellen Aminosäuren hin untersucht.

Auf Seiten des Prionproteins konnte eine lineare Hauptbindestelle für Streptavidin am Aminoterminus des rekombinanten PrP90-231 identifiziert werden, deren Kernmotiv die Aminosäuren 94-100 des Proteins umfasste. Eine schwache Bindung von SA-680 mit einer im Vergleich zum Hauptmotiv 15-fach reduzierten Signalintensität wurde weiterhin im Bereich der Aminosäuren 127-140 detektiert. Eine ebenfalls schwächere Bindungsaktivität

von Streptavidin wurde in der sogenannten Octarepeat Region von PrP festgestellt; das prominenteste Signal konnte dabei den Aminosäuren 64-77 zugeordnet werden. Der Bereich der Octarepeats, dem Funktionen bei der PrP-vermittelten Chelatierung von Kupfer-Ionen zugeschrieben werden, erstreckt sich im ‚full-length‘ Prionprotein über die Aminosäuren 51-90 des unstrukturierten N-Terminus. Da dieser Anteil in der von uns verwendeten aminoterminal verkürzten Form PrP90-231 jedoch nicht enthalten war, konnte eine Rolle der Octarepeat Region bei der Interaktion von PrP90-231 und Streptavidin ausgeschlossen werden.

Innerhalb der Streptavidin-Sequenz konnte ein linearer Bereich mit Affinität für PrP90-231 gefunden werden. Das Kernmotiv wurde auf die Aminosäuren 99-108 des Streptavidin Precursors eingeeengt; es enthält einen der vier Tryptophan-Reste ( $W_{103}$ ), die bei der Biotin-Bindung in der Biotin-Bindetasche von Streptavidin eine Rolle spielen. Die Ergebnisse der Kartierungen wurden in Abbildung 6.2 zusammengefasst.



	Sequenz	Aminosäuren
<b>PrP90-231</b>	<u>THNQWNK</u>	94-100
	<u>YMLGSAMSRPMIHF</u>	127-140
<b>Streptavidin</b>	<u>WTVAWKNNYR</u>	99-108

#### Abbildung 6.2: Ergebnisse der Kartierung linearer Bindestellen.

Die Kernmotive der linearen Bindestellen von PrP90-231 für Streptavidin und von Streptavidin für PrP90-231 wurden tabellarisch dargestellt (oben). Für die Bindung essentiell notwendige Aminosäuren wurden unterstrichen. Die Nummerierung bezieht sich auf SwissProt Accession Nos. P04925 (murines Prionprotein) bzw. P22629 (Streptavidin Precursor).

Links: NMR-Struktur von murinem PrP (aa 121-231, PDB Accession No. 1XYX) in unterschiedlichen Darstellungsarten. Die Aminosäuren 23-120 aus dem flexiblen N-Terminus von PrP, der auch das Streptavidin-bindenden Hauptmotiv aus PrP90-231 enthält (aa 94-100), kann durch NMR nicht dargestellt werden. Das Kernmotiv 2 aus PrP90-231 (aa 127-140) wurde gelb hervorgehoben; es enthält Anteile der  $\beta$ -Faltblatt Region.

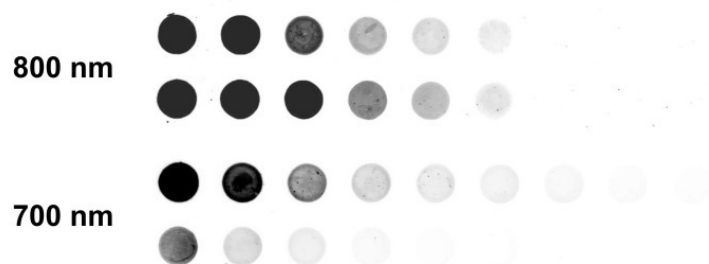
Die für die Streptavidin-Bindung essentiellen Aminosäuren W<sub>98</sub> und K<sub>100</sub> des streptavidinbindenden Hauptmotivs aus PrP90-231 sind in der Prionprotein-Sequenz von Säugetieren konserviert. Im Hinblick auf eine potentielle biologische Relevanz der PrP90-231-Streptavidin Interaktion wurde eine Peptidbibliothek analysiert, die Homologe der linearen Streptavidin-Hauptbindestelle von murinem PrP umfasste. Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine Substitution nichtessentieller Aminosäuren, wie sie z.B. im humanen PrP vorkommt (N<sub>99</sub> → S<sub>99</sub>), die Streptavidin-Bindung nicht beeinträchtigte.

Ein Vergleich der PrP-Bindungskapazität des linearen Motivs aus Streptavidin mit den in Abschnitt 5.4.1 beschriebenen PrP-Ligandenpeptiden im Peptidsynthese-Festphasenassay ergab eine PrP-Bindungskapazität von  $31,3 \pm 5,1$  % relativ zu dem Peptid NCAM (2), welches die höchsten Signalintensitäten aller identifizierten Ligandenpeptide aufwies (s. Abb. 5.16). Das aus Streptavidin stammende Sequenzmotiv wurde daher nicht für den AIDA-vermittelten bakteriellen Display von PrP-Liganden in Betracht gezogen.

### 6.3 Analyse der Streptavidin-Bindung durch die Deletionsmutante PrP101-231

Im nächsten Schritt sollte herausgefunden werden, ob die Aminosäuren 94-100 des murinen PrP90-231, die in peptidischer Form im Festphasenassay eine starke PrP-Bindung zeigten, auch *in situ* die Bindung von Streptavidin an das rekombinante Protein vermitteln. Hierfür wurde die aminoterminal verkürzte PrP-Variante PrP101-231, der das potentiell Streptavidinbindende Sequenzmotiv fehlte, kloniert und nach dem für PrP90-231 etablierten Protokoll bakteriell exprimiert und affinitätschromatographisch gereinigt.

In separaten Dot Blots wurden 150 pmol beider Prionprotein-Spezies immobilisiert und durch Inkubation mit 0,2 µg/ml SA-680 auf ihre jeweilige Bindungskapazität für Streptavidin hin untersucht. Die Signalintensitäten wurden auf den Mittelwert der bei Detektion von PrP90-231 erhaltenen Werte normalisiert und als prozentuale Bindung ausgedrückt. Die Deletion der Aminosäuren 90-100 von PrP resultierte in einer signifikanten Reduktion der SA-680 Bindung auf  $19,0 \pm 2,1$  % ( $P < 0,0001$ ; unpaired, one-tailed T-Test). Abbildung 6.3 illustriert das Ergebnis: In einem Dot Blot wurden serielle Verdünnungen (1:2) von PrP90-231 und PrP101-231 mit einer Startmenge von je 400 pmol aufgetragen. Der Blot wurde simultan mit je 0,2 µg/ml SA-680 und  $\alpha$ -His<sub>6</sub>-800 inkubiert und wie auch in Abbildung 6.1 beschrieben durch ‚Two-color‘-Detektion bei 700 und 800 nm ausgewertet.



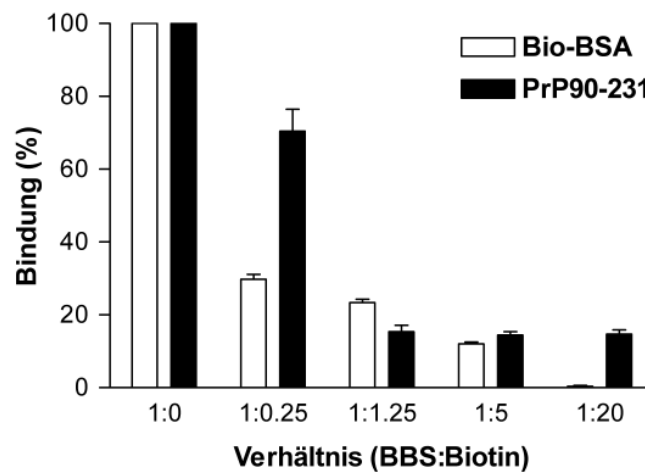
**Abbildung 6.3:** ‚Two-color‘ Detektion serieller Verdünnungen von PrP90-231 und PrP101-231 mit SA-680 und  $\alpha$ -His<sub>6</sub>-800. Das Ergebnis wurde im Schwarzweiß-Modus für die Detektion im 800 nm-Kanal (Nachweis von  $\alpha$ -His<sub>6</sub>-800, oben) und die Detektion bei 700 nm (Nachweis von SA-680, unten) dargestellt. Obwohl gleiche Mengen beider Proteinspezies immobilisiert wurden, ist das Streptavidin-spezifische Signal für PrP101-231 deutlich reduziert. (Obere Reihen beider Darstellungen: PrP90-231; untere Reihen: PrP101-231).

#### 6.4 Konkurrenz der Bindung von PrP90-231 an Streptavidin durch Biotin

Die verbreitete Nutzung von Streptavidin als Nachweisreagenz in biochemischen Experimenten beruht auf seiner spezifischen und hochaffinen Bindung von Biotin. Die vier Biotin-Bindetaschen eines homotetrameren Streptavidin-Moleküls werden jedoch von Aminosäuren gebildet, die in der Primärstruktur der Untereinheiten weit voneinander entfernt liegen und erst durch die Ausbildung der Streptavidin-spezifischen Tertiär- und Quartärstruktur in räumliche Nähe zueinander geraten. Insofern stellt die Biotin-Bindetasche von Streptavidin eine konformationelle Determinante dar, deren eventueller Beitrag zur Bindung von PrP90-231 *in situ* bei der Analyse von Streptavidin-Peptidbibliotheken nicht berücksichtigt werden konnte.

Um herauszufinden, ob eine Interaktion von PrP90-231 mit der Biotin-Bindetasche von Streptavidin stattfindet, wurden Konkurrenzexperimente mit (+)-Biotin-(PEO)<sub>4</sub>-Propionsäure durchgeführt. Dieses Biotinderivat besitzt eine im Vergleich zu Biotin deutlich verbesserte Löslichkeit in den für die Experimente genutzten wässrigen Puffern. Für die Durchführung der Konkurrenzexperimente wurden 50 pmol SA-680 (200 pmol Biotin-Bindungsstellen des Tetramers) für 15 min mit unterschiedlichen molaren Verhältnissen des Kompetitors vorinkubiert. Das hierdurch ganz oder zum Teil mit Biotin abgesättigte Streptavidin wurde anschließend zur Detektion einer äquimolaren Menge (50 pmol) des auf einer Nitrocellulosemembran immobilisierten Analyten genutzt. Als Analyt wurden PrP90-231 und PrP101-231 verwendet; als Kontrolle wurde biotinyliertes BSA (Bio-BSA) eingesetzt.

Der kompetitive Effekt des zur Absättigung von SA-680 genutzten Biotinderivats ist am Beispiel der Kontrolle (Bio-BSA) deutlich sichtbar: Das Streptavidin-spezifische Signal nimmt mit dem Grad der Absättigung der Biotin-Bindestellen kontinuierlich ab und ist bei einem 20-fachen Überschuss des Kompetitors relativ zu den Biotinbindestellen von Streptavidin nicht mehr nachweisbar.



**Abbildung 6.4: Konkurrenz der Streptavidin-Bindung an PrP90-231 durch Biotin.** Die Biotin-Bindetaschen von SA-680 wurden vor der Zugabe zum immobilisierten Analyten (biotinyliertes BSA (Bio-BSA) bzw. PrP90-231) mit verschiedenen Verhältnissen von (+)-Biotin-(PEO)<sub>4</sub>-Propionsäure (Biotin) abgesättigt. Die molaren Verhältnisse von SA-680 zum Kompetitor Biotin sind auf der X-Achse angegeben und wurden relativ zu den vier in einem Streptavidin-Molekül vorhandenen Biotin-Bindestellen (BBS) berechnet. Die Streptavidin-Bindungsaktivität in Prozent (Y-Achse) wurde relativ zu dem jeweiligen nichtkompetitiven Ansatz berechnet; dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler von drei Experimenten.

Die Konkurrenz der PrP90-231-Bindung durch Biotin resultierte zwar nicht in einer kompletten Eliminierung der Bindungsaktivität, aber in einem signifikanten Signalarückgang auf  $14,1 \pm 2,0$  % bei einem BBS-Biotin-Verhältnis von 1:20 ( $P < 0,001$ ; One-way ANOVA mit Bonferroni's Multiple Comparison Test). Diese ~14 % Restbindung von Biotin-gesättigtem Streptavidin konnten auch durch Zusetzen größerer Mengen des Kompetitors nicht weiter reduziert werden. Im Falle der niedrigaffinen Interaktion von Streptavidin mit PrP101-231 konnte eine spezifische Abrogation der Bindungsaktivität durch Biotinkompetition nicht nachgewiesen werden.

## 6.5 Untersuchungen zur putativen Biotin-Imitation durch PrP90-231 *in vivo*

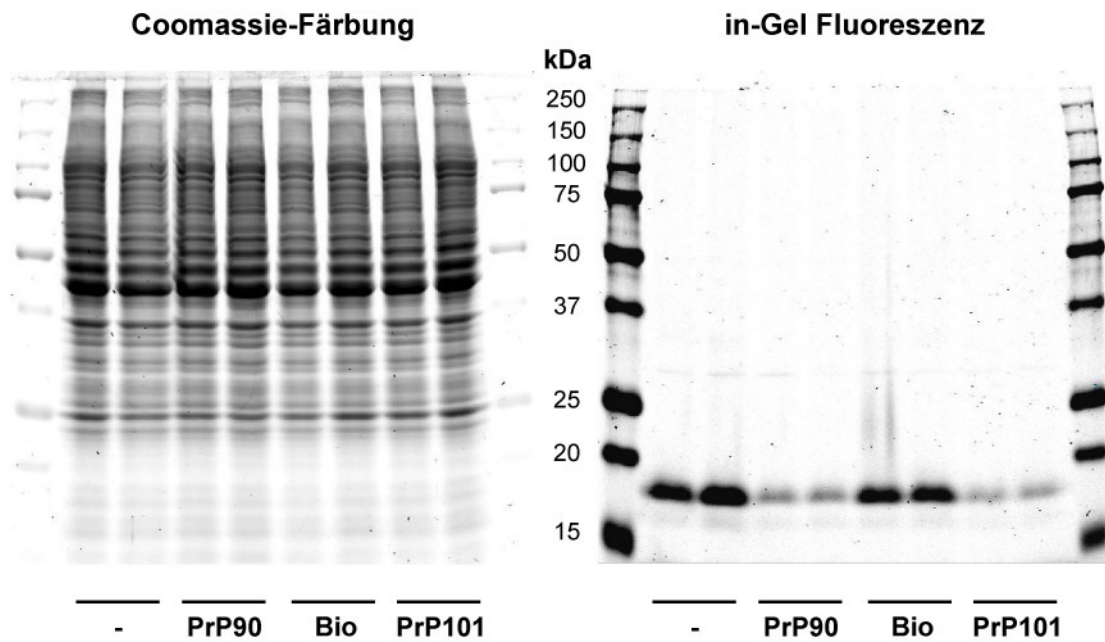
Die bisher vorgestellten Experimente implizieren, dass die N-terminalen 10 Aminosäuren von murinem rekombinantem PrP90-231 eine Bindung von Streptavidin über dessen Biotinbindetasche vermitteln. Eine mögliche Konsequenz hieraus ist, dass aminoterminal deletiertes Prionprotein (PrP90-231) nicht nur für das bakterielle Protein Streptavidin ein Biotin-Imitat darstellen könnte, sondern auch für eukaryotische Proteine, die biotinbindende Eigenschaften und eine Funktion bei der Aufnahme oder dem Metabolismus von Biotin besitzen. Aminoterminal verkürzte PrP-Spezies kommen *in vivo* auf Zelloberflächen und in endozytotischen Kompartimenten vor (s. Abschnitt 2.2.1). Sie entstehen weiterhin durch die partielle Proteolyse des infektiösen PrP<sup>Sc</sup> während der Gastrointestinalpassage (s. Abschnitt 2.1.2). Da die Enterozyten des Dünndarms für Biotin als essentielles Vitamin aktive Transportsysteme besitzen, könnte Biotin-Mimikri durch Prionen eine Invasion des Erregers ermöglichen oder fördern. Die potentiell biotinmimetischen Eigenschaften von PrP90-231 *in vivo* wurden stichprobenartig durch zwei unterschiedliche experimentelle Ansätze untersucht.

### 6.5.1 Kompetitionsanalyse der Bindung von PrP90-231 an Caco-2<sub>BBE1</sub>-Zellen durch Biotin

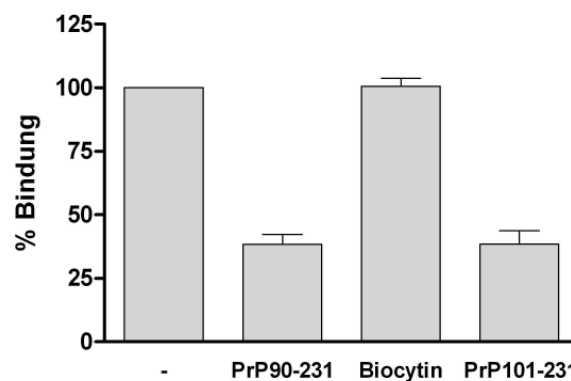
Die adhärent wachsenden Caco-2<sub>BBE1</sub>-Zellen wurden als Dünndarmepithel-Modellsystem verwendet. Bei Erreichen der Konfluenz (stationäre Phase) differenzieren die Zellen spontan und bilden dabei morphologische, strukturelle und funktionelle Differenzierungsmerkmale reifer Enterozyten aus. Es konnte gezeigt werden, dass sie für Biotin-Aufnahmestudien besonders geeignet sind [171] und den Biotin-Transporter SMVT (Sodium Dependend Multivitamin Transporter) exprimieren [172]. Um zu untersuchen, ob Biotinimitation eine Rolle bei der PrP90-231 Bindung an bzw. Internalisierung durch intestinale Epithelzellen spielt, wurde die Kompetitierbarkeit der Bindung von PrP90-231 an Caco-2<sub>BBE1</sub>-Zellen durch Biotin untersucht.

Alle Experimente wurden mit in 6-Loch Platten kultivierten Caco-2<sub>BBE1</sub>-Zellen zwei Wochen nach Erreichen der Konfluenz durchgeführt. Die Zellen wurden nach Zusatz der Kompetitoren für 30 min im Brutschrank inkubiert, anschließend für weitere 30 min mit fluoreszenzmarkiertem PrP90-231 (PrP-680) behandelt und gewaschen. Die Zellen wurden vom Plattenboden abgelöst, lysiert und durch SDS-PAGE mit nachfolgender Quantifizierung der ‚in-Gel-Fluoreszenz‘ auf die in den Lysaten enthaltene Menge von PrP-680 hin untersucht. Die PrP-680 spezifischen Signalintensitäten wurden anschließend durch Quantifizierung zweier Referenzbanden des Coomassie-gefärbten Gels normalisiert.





**Abbildung 6.5: Studie zur Kompetierbarkeit der Bindung von PrP-680 an Caco-2<sub>BB<sup>e1</sup></sub>-Zellen.** Gezeigt ist die repräsentative Auswertung einer Studie zur kompetitiven Wirkung von PrP90-231 (PrP90), Biocytin (Bio) und PrP101-231 (PrP101) auf die Bindung von PrP-680 an Caco-2<sub>BB<sup>e1</sup></sub>-Zellen. Die drei kompetitiven Ansätze und der nichtkompetitive Kontrollansatz wurden jeweils als Duplikat durchgeführt. Je 50 µg der Zell-Lysate wurden durch SDS-PAGE analysiert; nach Detektion der ‚in-Gel-Fluoreszenz‘ (rechts) wurde das Gel mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt und dokumentiert (links).



**Abbildung 6.6: Quantifizierung der Konkurrenzexperimente mit Caco-2<sub>BB<sup>e1</sup></sub>-Zellen.** Es wurden drei unabhängige Experimente, in denen die kompetitive Wirkung von PrP90-231, Biocytin und PrP101-231 auf die Bindung von PrP-680 an Caco-2<sub>BB<sup>e1</sup></sub>-Zellen jeweils in Duplikaten bestimmt wurde, quantitativ ausgewertet. Aufgetragen wurden Mittelwert und Standardfehler der prozentualen PrP-680 Bindung relativ zum nichtkompetitiven Ansatz.

Die Kompetitor-vermittelte Inhibition der Bindung und/oder Internalisierung von PrP-680 durch Caco-2<sub>BB<sub>e</sub>1</sub>-Zellen wurde durch den Vergleich der erhaltenen PrP-680 spezifischen Signale kompetitiver Ansätze mit der Signalintensität nichtkompetitiver Ansätze ausgewertet und als prozentuale Bindungsaktivität ausgedrückt. Durch Vorinkubation der Zell-Monolayer mit Biocytin konnte keine Reduktion der Bindung von PrP-680 erreicht werden (s. Abb. 6.5 und 6.6), während eine signifikante Signalreduktion auf  $38,4 \pm 4,0$  % durch Konkurrenz mit unmarkiertem PrP90-231 und auf  $38,5 \pm 3,1$  % durch Konkurrenz mit der Deletionsmutante PrP101-231 beobachtet werden konnte ( $P < 0,001$ ; One-way ANOVA mit Bonferroni's Multiple Comparison Test). In Kontrollexperimenten, bei denen eine gleiche molare Menge Alexa Fluor 680-markiertes BSA-680 statt oder zusätzlich zu PrP-680 zu den Caco-2<sub>BB<sub>e</sub>1</sub>-Zellen zugegeben wurde, konnte bei Detektion der ‚in-Gel Fluoreszenz‘ kein BSA-680 spezifisches Signal nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

### 6.5.2 Einfluss von PrP90-231 auf BirA-katalysierte Biotinylierungsreaktionen

Das *E. coli*-Enzym BirA wurde als Modellsystem verwendet, um eine eventuelle Interferenz des aminoterminal deletierten PrP (PrP90-231) im zellulären Biotinmetabolismus zu untersuchen. BirA ist eine bakterielle Biotin Protein Ligase, die *in vivo* die Biotinylierung des ‚Biotin Carboxyl Carrier Proteins‘ (BCCP) von *E. coli* katalysiert. Das Enzym repräsentiert ein Ortholog der Holocarboxylase Synthase (HCS), die bei Säugetieren für den Biotintransfer zu den vier Apocarboxylasen zuständig ist. Der Mechanismus der Biotinaddition an Biotin-abhängige Carboxylasen ist evolutiv hochkonserviert. So konnte gezeigt werden, dass BirA *in vitro* nicht nur Zielsubstrate prokaryotischen Ursprungs, sondern auch zu biotinylierende Proteine aus Pflanzen und höheren Säugetieren spezifisch erkennen und biotinylieren kann [173, 174]. Die Biotin-bindende Domäne von BirA ist analog zu der der Säugetier-HCS [175-177] und besitzt Gemeinsamkeiten mit der Biotin-Bindetasche von Streptavidin [176, 178].

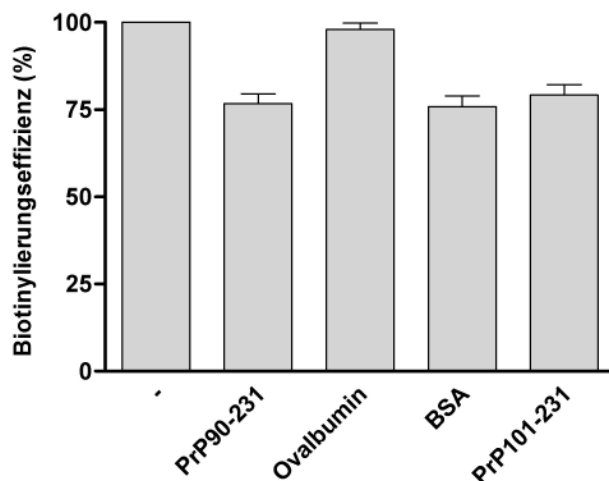
Das hier verwendete peptidische 14-mer Minimalsubstrat GLNDIFEAQKIEWH imitiert das natürliche BirA-Zielsubstrat [161, 179], so dass das interne Lysin (K) des Sequenzmotivs in einer ATP-abhängigen Reaktion effizient zum Biocytin umgesetzt wird.

#### 6.5.2.1 Wettbewerbsstudien mit dem BirA-Peptidsubstrat

Um herauszufinden, ob das potentiell biotinmimetische PrP90-231 in BirA-katalysierten Reaktionen spezifisch interferiert, wurden *in vitro*-Biotinylierungsreaktionen des BirA-Peptidsubstrats mit PrP90-231 als ‚Biotin-Kompetitor‘ bzw. nicht umsetzbares ‚Biotin-Analogon‘ in äquimolarer Menge zu Biotin supplementiert. Als Kontrolle für einen spezifischen kompetitiven oder inhibitorischen Effekt durch PrP90-231 wurden Ovalbumin

und BSA als Kontrollproteine eingesetzt. Laut Herstellerangaben (Avidity) kann das Lysinreiche BSA, eventuell aufgrund einer nicht genauer untersuchten Ähnlichkeit zum proteinösen oder peptidischen BirA-Zielsubstrat, in einer ineffizient verlaufenden Reaktion selbst biotinyliert werden. Für den Nachweis eines durch die Aminosäuren 90-100 von PrP vermittelten Inhibitionseffekts wurde PrP101-231 als weitere Kontrolle verwendet.

Die BirA-katalysierte Biotinylierungsreaktion fand in Lösung und angelehnt an die vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen statt. Der Grad der Peptidbiotinylierung als Maß für die Effizienz der Reaktion wurde im Immunoassay untersucht. Biotinylierte und nichtbiotinylierte Peptide wurden gleichermaßen über ihre aminoterminalen 2,4-D-Markierung ‚eingefangen‘; vorhandenes Biotin wurde durch Zugabe von Streptavidin-HRP nachgewiesen. Durch geeignete Vorversuche wurde sichergestellt, dass weder die verwendeten Peptidkonstrukte noch das im Biotinylierungsansatz vorhandene freie Biotin eine unspezifische Adsorption an die Mikrotiterplatte aufwies und das die als Kompetitoren eingesetzten Proteine den Nachweis des biotinylierten Peptids im Immunoassay nicht beeinträchtigten. Die Zugänglichkeit und Nachweisbarkeit des peptidinternen Biocytins wurde durch Verwendung des biotinylierten BirA-Kontrollpeptids (GLNDIFEAQBIEWH, mit B: Biocytin) im Immunoassay verifiziert.



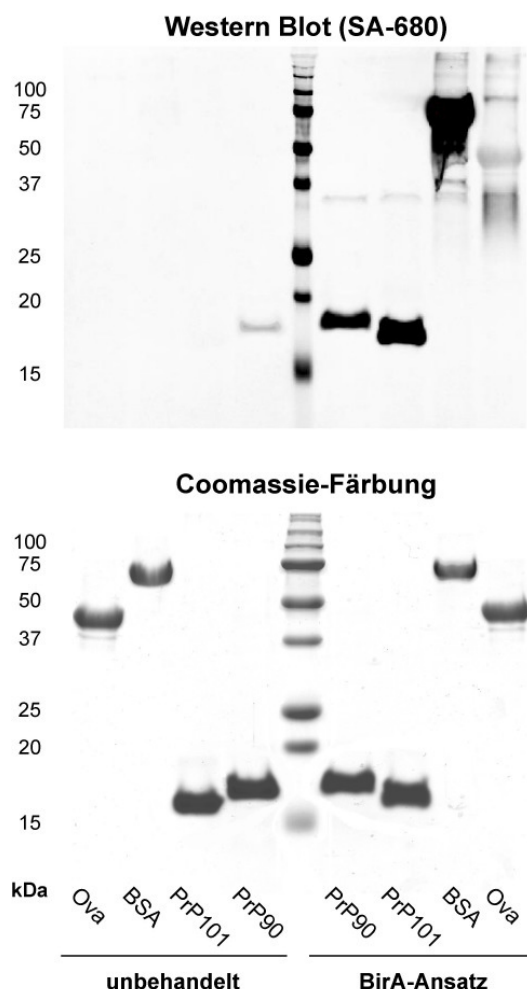
**Abbildung 6.7: Einfluss verschiedener Kompetitoren auf die BirA-katalysierte Biotinylierung eines Peptidsubstrats.** Dargestellt wurden Mittelwert und Standardfehler der prozentualen Biotinylierungseffizienz relativ zum nichtkompetitiven Ansatz aus vier unabhängigen Experimenten.

Abbildung 6.7 zeigt die Ergebnisse der Kompetitionsstudien. Zwar konnte bei Zugabe von PrP90-231 zur Biotinylierungsreaktion eine signifikante ( $P < 0,001$ ; One-way ANOVA mit Bonferroni's Multiple Comparison Test) Reduktion der BirA-katalysierten Peptidbiotinylierung auf  $76,8 \pm 2,8$  % relativ zu einem nichtkompetitiven Ansatz festgestellt werden. Eine ebenso starke, statistisch signifikante inhibitorische Wirkung wurde jedoch auch für PrP101-231 ( $79,2 \pm 3,0$  %) und die Kontrolle BSA ( $75,9 \pm 3,1$  %) gemessen. Einziger eingesetzter Kompetitor ohne signifikanten Einfluß auf die Reaktionseffizienz war Ovalbumin ( $97,9 \pm 1,9$  %).

### 6.5.2.2 Biotinylierung von PrP90-231 durch BirA *in vitro*

Als Grund für eine weniger effiziente Peptidbiotinylierung durch BirA in Anwesenheit eines Fremdproteins kommen verschiedene Aspekte in Betracht. Neben einer kompetitiven Hemmung der Enzymaktivität durch (reversible) Bindung eines Substratanalogons können z.B. Zugänglichkeitsprobleme durch eine hohe Gesamtprotein-Konzentration eine Rolle spielen. Denkbar wäre weiterhin eine Substratkompetition, denn durch das Anbieten eines alternativen Substrats würde weniger Peptid umgesetzt und nachgewiesen.

Zum Nachweis einer eventuellen Biotinylierung von PrP90-231 durch BirA wurden Reste der kompetitiven Biotinylierungsansätze aus Abschnitt 6.5.2.1 durch SDS-PAGE und nachfolgende Western Blots mit SA-680 als Nachweisreagenz durchgeführt. In der Tat konnten besonders im Falle von PrP90-231, PrP101-231 und BSA starke Streptavidin-spezifische Signale nachgewiesen werden, die auf eine Kopplung von Biotin an die genannten Proteine hindeuteten. Zur genaueren Analyse wurden größere Ansätze (40 µl) mit einer Proteinkonzentration von jeweils 0,5 mg/ml ÜN bei 25 °C mit und ohne Zusatz von BirA inkubiert und im Anschluss auf das Vorhandensein biotinylierter Proteinspezies hin untersucht (s. Abb. 6.8).



**Abbildung 6.8: *In vitro* Biotinylierung von rekombinantem PrP durch BirA.**

Je 20 µg (0,5 mg/ml) der Proteine PrP90-231 (PrP90), PrP101-231 (PrP101), BSA und Ovalbumin (Ova) wurden ÜN bei 25 °C mit oder ohne Zugabe von 1000 Units BirA inkubiert. Je 10 µl der Ansätze wurden durch SDS-PAGE auf zwei SDS-Gelen (10 % PA) separiert. Ein Gel wurde mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt, um unspezifisch alle Proteinbanden anzufärben (unten). Der Western Blot des zweiten Gels wurde oben dargestellt. Biotinylierte Proteinspezies wurden durch Inkubation des Blots mit 0,1 µg/ml SA-680 nachgewiesen und im Odyssey Infrared Imaging System detektiert. Bei den ohne BirA-Zusatz inkubierten Proteinen („unbehandelt“) konnte keine Biotinylierung nachgewiesen werden, während nach Inkubation der Proteine mit BirA unterschiedlich hohe SA-680-spezifische Signale gemessen wurden.

Die Ergebnisse der Blotting-Experimente korrelieren mit den Daten aus den Konkurrenzexperimenten und deuten darauf hin, dass der gemessene inhibitorische Effekt von PrP90-231, PrP101-231 und BSA auf die Biotinylierung des Peptidsubstrats (s. Abb. 6.7) auf einer Substratkompetition beruhte und nicht auf einer Biotinimitation durch PrP90-231. Ovalbumin, welches keine Beeinflussung der Peptidbiotinylierung im kompetitiven Ansatz zeigte, wurde in einem deutlich geringeren Ausmaß als die drei anderen untersuchten Proteine biotinyliert und besaß daher nur eine schwache Streptavidin-spezifische Reaktivität (s. Abb. 6.8 oben).

### 6.5.2.3 Biotinylierung von PrP90-231 durch BirA *in vivo*

Die Biotinylierung von PrP *in vitro* warf die Frage auf, ob diese Reaktion tatsächlich nur als unspezifisches Phänomen zu werten war, das durch die hohen Konzentrationen von Enzym und Protein im Ansatz zustande kam. Es konnte jedoch experimentell bestätigt werden, dass auch bei Reduktion der Protein-Konzentration im BirA-Biotinylierungsansatz um den Faktor 10 auf 50 µg/ml (vergl. Abschnitt 6.5.2.2) eine Biotinylierung von PrP90-231, PrP101-231 und von BSA nachweisbar war.

Eine spezifische Erkennung linearer Bereiche von PrP90-231 wurde ausgeschlossen, indem potentiell biotinylierbare, lysinhaltige Peptidmotive der PrP-Aminosäuresequenz analog zum BirA-Peptidsubstrat als abspaltbare Peptide mit N-terminaler 2,4-D Markierung synthetisiert wurden. Die Sequenzen der Peptide sind in Abbildung 6.9 dargestellt. Diese Peptide wurden durch das in Abschnitt 6.5.2.1 vorgestellte Verfahren auf ihre Biotinylierbarkeit durch BirA hin untersucht. Bei keinem der Peptide konnte ein Biotin-spezifisches Signal im Immunoassay detektiert werden.

```

G G G T H N Q W N K P S K P K T
T H N Q W N K P S K P K T N L K
N Q W N K P S K P K T N L K H V
K P S K P K T N L K H V A G A A
V H D C V N I T I K Q H T V T T
K Q H T V T T T T K G E N F T E
G E N F T E T D V K M M E R V V
E Q M C V T Q Y Q K E S Q A Y Y
-----
G L N D I F E A Q K I E W H

```

**Abbildung 6.9: Lysinhaltige Peptide aus der Aminosäuresequenz von PrP90-231.** Das rekombinante PrP90-231 umfasst insgesamt 8 Lysinreste; einige der dargestellten Peptide enthalten mehrere von ihnen (fett). Unten wurde zum Vergleich das BirA 14-mer Minimalsubstrat dargestellt; die Sequenzen wurden am internen Lysin (K) aliniert (rot). Das Streptavidin-bindende Kernmotiv (aa 94-100), das ebenfalls ein Lysin enthält, wurde umrahmt.

Die Tatsache, dass keines der lysinhaltigen PrP-Peptide spezifisch als BirA-Substrat erkannt wurde, schloss jedoch nicht das Vorhandensein einer konformationellen Determinante in PrP aus, die die BirA-katalysierte Biotinkopplung an PrP determinieren könnte. Auch die Erkennung des natürlichen, proteinösen BirA-Substrats BCCP ist von der räumlichen Anordnung bestimmter Aminosäurereste abhängig [180]. Falls also eine spezifische Erkennung von PrP90-231 durch das natürlicherweise in *E. coli* exprimierte BirA erfolgte, könnte eine Biotinylierung auch unter den Bedingungen der heterologen (Über-) Expression des rekombinanten Proteins im *E. coli*-System stattfinden. Hierbei wäre wahrscheinlich nur der (geringe) Anteil betroffen, der in löslicher Form vorliegt (s. auch Abb. 5.2 und 5.3), während in Form von Einschlusskörperchen ausgefallenes Proteinmaterial biologisch inert sein sollte.

Rekombinantes PrP aus der löslichen, cytoplasmatischen Fraktion von Expressionskulturen war aufgrund der mangelnden Reinheit der Präparationen bis zu diesem Zeitpunkt nicht auf seine Streptavidin-Bindung hin untersucht worden. Die Analyse durch Western-Blots mit rekombinantem Prionprotein aus Einschlusskörperchen und BL21(DE3)-Zell-Lysaten als Kontrollen erbrachte jedoch keinen Hinweis auf eine eventuelle Biotinylierung des löslichen rekombinanten Proteins im Zuge der heterologen Expression. In der cytoplasmatischen Fraktion des BL21(DE3)-Zellmaterials konnten *E. coli*-spezifische biotinylierte Proteine einer Größe von circa 15 und 20 kDa nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Zusammenfassend konnte eine neue PrP-bindende lineare Sequenz aus Streptavidin identifiziert werden, deren Bindungskapazität für PrP jedoch im Vergleich zu anderen PrP-Ligandenpeptiden nur gering war. In PrP90-231 selbst konnte eine biotinmimetische Sequenz gefunden werden, die zwar in den vorliegenden Experimenten keine physiologische Funktion ableiten ließ, deren Deletion allerdings für die Entwicklung von PrP-betreffenden *in vitro* Nachweissystemen essentiell war.

## 7 Diskussion

Spongiforme Enzephalopathien sind bei Mensch und Tier vorkommende, tödlich verlaufende neurodegenerative Erkrankungen, die sich nach einer lang andauernden Inkubationsperiode durch progressive Degeneration von Nervenzellen und Ablagerung von Plaques im Zentralen Nervensystem (ZNS) manifestieren. Gemäß der mittlerweile weithin akzeptierten Prion-Hypothese [6] repräsentiert das infektiöse Agens eine fehlgefaltete Isoform des im Organismus ubiquitär exprimierten zellulären Prionproteins (PrP<sup>c</sup>), wobei die Replikation und Propagation des pathogenen ‚Scrapie‘-Konformers (PrP<sup>Sc</sup>) durch autokatalytische Konversion von PrP<sup>c</sup> erfolgt.

Prionen-Erkrankungen sind aus zwei Gründen einzigartig: Zum einen können sie im Gegensatz zu anderen degenerativen Erkrankungen des ZNS über Spezies-Grenzen hinweg horizontal übertragen werden, wobei die orale Transmission durch Verzehr kontaminierter Nahrungsmittel aus epidemiologischer Sicht am bedeutsamsten ist [100]. Zum anderen werden Prionen als Isoform eines Selbst-Antigens von körpereigenen Abwehrmechanismen nicht erfasst [104, 107, 110] und können so, einmal in den Organismus eingedrungen, ungehindert von den Kontrollinstanzen des angeborenen und adaptiven Immunsystems ihr zerstörerisches Werk beginnen.

Die Erforschung prophylaktischer Ansätze zur Verhinderung der oralen Transmission Spongiformer Enzephalopathien über Prion-kontaminierte Nahrungs- und Futtermittel haben sich bisher auf immunologische Verfahren reduziert. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Immunantwort gegen PrP aufgrund des tolerogenen Status des Prionproteins nur unter Anwendung rigider Immunisierungsprotokolle ausgelöst werden kann; darüber hinaus konnte auch bei erfolgreicher Induktion einer systemischen, humoralen Immunität eine prophylaktische Wirksamkeit der Vakzinierung in Schutzexperimenten nur vereinzelt beobachtet werden [108, 109, 111-113]. Weiterhin birgt eine Immunisierung gegen ein körpereigenes Protein stets die Gefahr einer unkontrollierbaren Autoimmunreaktion in sich. In der vorliegenden Arbeit wurde daher ein möglicher Ansatz für eine nicht-immunologische Prävention der intestinalen Aufnahme von Prionen verfolgt. Die Arbeitshypothese beruhte dabei auf der Annahme, dass die wirksamste Prophylaxe für ein Pathogen, gegen das kein immunologischer Schutzmechanismus zur Verfügung steht, im Abfangen und Neutralisieren des Erregers vor seiner Penetration der epithelialen Barriere besteht. Um dieses Ziel zu erreichen, sollten als Weiterentwicklung der klassischerweise zur ‚Gastrointestinalen Dekontamination‘ eingesetzten, unspezifisch wirkenden Sorptionsmittel wie z.B. Kohletabletten [119, 120], PrP-spezifische Enterosorbentien entwickelt werden, die das Pathogen im intestinalen Lumen gezielt binden, dadurch seine Aufnahme in den Körper verhindern und die Elimination von PrP<sup>Sc</sup> über den Stuhl bewirken können [122, 126].

Um dabei auf eine permanente, prophylaktische Gabe synthetischer PrP-Bindemittel in Tierfutter bzw. in menschlicher Nahrung verzichten zu können, sollten kommensale Darmbakterien als Träger der spezifischen Prion-Rezeptoren fungieren; diese könnten durch ihre Fähigkeit zur Selbstreplikation eine dauerhafte Verfügbarkeit der Adsorbenzien im Intestinaltrakt gewährleisten [127]. Als molekulares Werkzeug für den Transport der proteinösen PrP-Bindedomäne auf die bakterielle Oberfläche wurde wegen seines einfachen Aufbaus und breiten Wirtsspektrums der AIDA Autotransporter aus *Escherichia coli* ausgewählt, für den ein erfolgreicher Display heterologer Proteinfragmente bereits in unterschiedlichen gramnegativen Wirtsbakterien gezeigt werden konnte [135, 136, 140-143].

## **7.1 Analyse putativer PrP-Liganden und Identifizierung peptidischer PrP-Binder**

Die Stabilität und Effizienz der Autotransporter-vermittelten Oberflächenexposition heterologer Determinanten ist abhängig von der Größe der translozierten Domäne und kann durch das Vorhandensein umfangreicher Tertiärstrukturen beeinträchtigt werden [132, 164]. Es ist daher notwendig, statt der Verwendung kompletter Proteine oder Proteindomänen auf möglichst kleine Proteinfragmente zur Insertion in das bakterielle Oberflächenprotein zurückzugreifen. Im Zuge der Suche nach peptidischen PrP-Bindern wurden in der Literatur beschriebene putative Prionprotein-Liganden auf lineare PrP-Bindestellen hin untersucht. Für die Entwicklung von intestinalen Prionen-bindenden Adsorbenzien wurde ein Bindungslokal im verdauungsresistenten Kernbereich von PrP<sup>Sc</sup> (Aminosäuren ~ 90-231) als essentiell erachtet, daher wurde für die Kartierungsexperimente das aminoterminal deletierte rekombinante PrP90-231 eingesetzt.

Da die Ergebnisse der hier durchgeführten Kartierungsexperimente nicht nur in Hinblick auf das vorliegende Projekt, sondern auch für eine genauere Charakterisierung des Interaktionsmechanismus des Prionproteins mit seinen postulierten *in vivo*-Liganden von allgemeinerem Interesse ist, soll im Rahmen der Diskussion hierauf genauer eingegangen werden.

### **7.1.1 NCAM**

Eine potentielle Interaktion des Prionproteins mit dem neuronalen Zelladhäsionsmolekül (neural cell adhesion molecule) NCAM wurde 2001 von Schmitt-Ulms *et al.* postuliert, die nach *in situ* Behandlung von Maus-Neuroblastom-Zellen (N2a-Zellen) mit chemischen Crosslinkern eine Kolo-kalisation beider Proteinspezies in hochmolekularen Komplexen fanden [52]. Die deduzierte *in vivo*-Funktionalität in Form einer Involvierung von PrP<sup>C</sup> in



neuronalen Entwicklungsprozessen durch Kooperation mit NCAM als zellulärem Rezeptor konnte in einer Studie von Santuccione *et al.* konkretisiert werden [54]. Sie zeigten eine Interaktion von PrP<sup>c</sup> mit NCAM in hippocampalen Neuronenkulturen, die durch Aktivierung einer p59<sup>fyn</sup>-vermittelten Signalkaskade zur Induktion der NCAM-abhängigen Neurogenese führte.

NCAM's, deren Expression im adulten Organismus fast ausschließlich auf neuronales Gewebe beschränkt ist, sind membrangebundene Glycoproteine und gehören zur Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle (CAM's) innerhalb der Immunglobulin-Superfamilie. Es existieren drei Haupt-Isoformen, die durch alternatives splicing einer Vorläufer-mRNA entstehen und sich in der Länge der carboxyterminalen Domäne und der Art der Verankerung in der Cytoplasmamembran unterscheiden [181]. Der homologe extrazelluläre Aminoterminus aller NCAM-Spezies beinhaltet fünf Immunglobulin-ähnliche Domänen (Ig 1-5) und zwei membranproximale Fibronectin-Typ III (FN3) Module. Potentielle lineare Sequenzmotive von NCAM, die für die postulierte heterophile Interaktion mit zellulärem Prionprotein verantwortlich sein könnten, wurden von Schmitt-Ulms *et al.* durch die Detektion von NCAM-Peptidbibliotheken mit ‚full-length‘-PrP (aa 23-231) in einem ELISA-ähnlichen Verfahren gefunden [52]. Lineare Bereiche mit PrP-Bindungsaktivität wurden im Bereich der Ig 5-Domäne und der beiden FN3-Domänen (aa 420-444 (Ig-Domäne 5), aa 525-564 (FN3-Domäne 1) und aa 635-669 (FN3-Domäne 2) von SwissProt Accession No. P13594) gefunden.

Obwohl in dem von uns genutzten Kartierungs-Verfahren das aminoterminal verkürzte PrP90-231 verwendet wurde, korreliert die Lokalisation der PrP-affinen Kernbereiche weitestgehend mit den von Schmitt-Ulms *et al.* postulierten Interaktionsdomänen. Dies hebt zum einen die untergeordnete Rolle der Aminosäuren 23-90 von PrP bei der Bindung an NCAM hervor und spricht auf der anderen Seite für die Spezifität des im Rahmen dieser Arbeit etablierten Nachweissystems, das auf der Nutzung von fluoreszenzmarkiertem, rekombinantem Prionprotein beruht. Während Schmitt-Ulms *et al.* ausschließlich mit einer Peptidbibliothek arbeiteten, die die Sequenz der kleinsten und über einen GPI-Anker mit der Zelloberfläche verknüpften NCAM-Isoform (NCAM-120) im Versatz um je fünf Aminosäuren darstellte, wurde hier eine Feinkartierung der Bindungsloci durchgeführt. Zusätzlich wurde der carboxyterminale, intrazelluläre Anteil von NCAM in die Analyse mit einbezogen, der bei der NCAM-180 Isoform komplett und bei der NCAM-140 Isoform zum Teil vorhanden ist. Hierdurch konnten die Prionprotein-bindenden Bereiche genauer kartiert und auf insgesamt vier Kernbereich eingengt werden (aa 439-451, aa 538-552, aa 635-646, aa 663-674; s. Tabelle 5.3). Der von Schmitt-Ulm *et al.* beschriebene lineare Prionprotein-bindende Bereich in der FN3-Domäne 2 enthält demnach zwei separate Bindemotive. Ein Vorliegen linearer Bindestellen für PrP90-231 in der intrazellulären Domäne von NCAM konnte ausgeschlossen

werden. Das Sequenzmotiv WKSLGEE SWHFTWYD (aa 538-552 von NCAM) zeigte von allen untersuchten Peptiden sowohl im Festphasenassay mit Peptidbibliotheken als auch im Peptid-ELISA die höchste Bindungsstärke für PrP<sup>90-231</sup> und wurde aus diesem Grund für den Einsatz im bakteriellen Display-System ausgewählt.

### 7.1.2 Plasminogen

Plasminogen (PLG) ist das Zymogen der Serinprotease Plasmin und wird hauptsächlich in der Leber, aber auch in anderen Geweben einschließlich des ZNS exprimiert [57]. Strukturell kann das Molekül in zwei Hauptbereiche untergliedert werden: der carboxyterminale Anteil umfaßt die Proteasedomäne, während der N-Terminus des Proteins fünf sogenannte Kringle-Domänen enthält und unter anderem für die spezifische Substratbindung zuständig ist [182]. Kringle-Domänen bestehen aus je circa 80 Aminosäuren und besitzen eine durch drei Disulfidbrücken stabilisierte charakteristische Tertiärstruktur; als autonome strukturelle Module kommen sie in unterschiedlicher Kopienzahl in verschiedenen Proteinen des Blutgerinnungs- bzw. thrombolytischen Systems, bei einigen Serinproteasen, Plasmaproteinen und Wachstumsfaktoren vor. Viele Kringle-Domänen, nicht aber die Kringle-Domäne 3 aus Plasminogen, besitzen Affinität für freies und proteingebundenes Lysin [182]. Obwohl die Struktur von Kringle-Domänen hochkonserviert ist, besitzen sie keine gemeinsame und gleichartige Funktion und können daher Interaktionen mit unterschiedlichen Liganden vermitteln [183].

Die proteolytische Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin erfolgt über die Plasminogen-Aktivatoren t-PA (tissue-type plasminogen activator) und u-PA (urokinase-type plasminogen activator). Plasmin kann ein breites Spektrum extrazellulärer Proteine wie z.B. Fibrin, Laminin oder Fibronectin degradieren und fungiert auch selber als Aktivator verschiedener Proenzyme wie z.B. der Prokollagenase. Neben der fibrinolytischen Aktivität von Plasmin werden dem Plasminogen/Plasminogen-Aktivator System daher Funktionen bei der Zellmigration und (Re-) Organisation von Geweben während der Embryonalentwicklung und auch im adulten Organismus z.B. bei der Angiogenese oder Neurogenese zugeschrieben [58, 59, 184].

Die Entdeckung von Plasminogen als selektiv mit dem pathogenen PrP<sup>Sc</sup>-Konformer interagierendes Protein wurde im Jahr 2000 von Fischer *et al.* berichtet [55]. Dass die Bindung von Plasminogen jedoch nicht auf das fehlgefaltete Prion beschränkt ist, konnten Ellis *et al.* nachweisen [62]. Sie zeigten, dass PrP<sup>C</sup> in einem ternären Komplex mit Plasminogen und dem Plasminogen-Aktivator t-PA interagiert und dass aus dieser Interaktion eine signifikante Stimulation der Plasminogen-Aktivierung resultiert. Es konnte gezeigt werden, dass t-PA, welches zwei aminoternale Kringle-Domänen enthält, über die

Lysin-Bindestelle seiner Kringle-Domäne 2 an zwei Lysincluster (aa 23-27 und aa 101-110) im N-Terminus von PrP bindet [60, 61, 165]. Neben t-PA können auch andere Aktivatoren von PLG, die über mindestens eine Kringle-Domäne verfügen (u-PA oder DSPA<sub>α1</sub> (Desmodus salivary plasminogen activator α1)), an PrP binden; hierdurch wird jedoch keine Stimulation der PLG-Aktivierung bewirkt [60].

Im Gegensatz zur PrP-Bindung an PLG-Aktivatoren wird die Bindung an Plasminogen selbst offensichtlich nicht nur über eine Interaktion mit Kringle-spezifischen konformationellen Determinanten vermittelt. So fanden Ryou *et al.* in einem Phage Display-Experiment eine Bindung von rekombinantem murinen PrP an ein Phagen-exponiertes Plasminogen-Fragment [166]. Dieses Fragment umfasste dabei keine komplette Kringle-Domäne, sondern jeweils Anteile der Kringle 3- und der Kringle 4-Domäne von murinem PLG (aa 309-386 von SwissProt Accession No. P20918). Das Fehlen der charakteristischen Tertiärstruktur impliziert so das Vorhandensein linearer PrP-affiner Bereiche, was im hier durchgeführten Kartierungsexperiment mit PrP90-231 bestätigt werden konnte: der gefundene lineare Bereich mit der höchsten PrP-Bindungskapazität (aa 334-346) ist in dem PLG-Fragment enthalten, das auch im Phage Display eine Bindung von PrP bewirkte. Dass sowohl das aminoterminal deletierte PrP90-231 als auch das komplette PrP (aa 23-231) eine spezifische Plasminogen-Bindung besitzt, wurde durch ein weiteres von Ryou *et al.* durchgeführtes Experiment bestätigt: sie konnten in einem ELISA-Verfahren mit den isolierten Kringle-Domänen 1-3 eine spezifische Bindung beider PrP-Spezies nachweisen. Im Zusammenspiel mit den im Rahmen dieses Projekts erhaltenen Ergebnissen, dass i) PrP90-231 in Korrelation zu der Studie von Ryou *et al.* [166] an einen linearen Bereich innerhalb der Kringle-Domäne 3 von Plasminogen bindet, dass ii) Homologe dieser linearen Bindestelle aus den Kringle-Domänen 1 und 2 aus PLG ebenfalls eine (geringeraffine) Bindung von PrP vermitteln und dass iii) eine Interaktion von PrP mit dem peptidischen Kernmotiv aus der Kringle-Domäne 3 im Zuge des bakteriellen Displays nicht nachweisbar war, während iiiii) die komplette Kringle-Domäne 3 eine deutliche PrP-Bindung im bakteriellen Display-System vermittelte, lassen sich daher einige Schlussfolgerungen in Bezug auf den PLG-PrP Interaktionsmechanismus ziehen. So kann postuliert werden, dass der PrP-Bindungsloкус von Plasminogen hauptsächlich durch ein lineares Motiv der Kringle-Domäne 3 gebildet wird, das durch die Kringle-typische Tertiärstruktur in der korrekten Weise präsentiert wird. Nicht ausgeschlossen werden kann hierbei ein Einfluss weiterer Aminosäurereste, die durch die Faltung der Kringle-Domäne in räumliche Nähe zum PrP-bindenden Peptidmotiv gelangen. Eine Interaktion mit höherer Avidität kommt wahrscheinlich durch das gleichzeitige Vorhandensein der Kringle-Domänen 1 und 2 im Plasminogen-Molekül zustande, die ein Homolog des Kringle 3-Sequenzmotivs und eine gleichartige Tertiärstruktur besitzen.

Für das Plasminogen-Peptid aus der Kringle-Domäne 3 wurde die zweithöchste PrP-Bindungskapazität aller im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Peptide festgestellt. Ebenso wie das Sequenzmotiv aus NCAM wurde es daher als Kandidat für die AIDA-vermittelte Expression ausgewählt.

### 7.1.3 Laminin

Laminine sind stark glycosylierte, heterotrimere Proteine, die als Bestandteil der extrazellulären Matrix und der Basalmembranen wichtige Funktionen beim Zusammenhalt und der Interaktion von Zell- und Gewebesystemen übernehmen. Im Zentralen Nervensystem spielen sie eine Rolle bei der neuronalen Differenzierung und Plastizität.

Laminin besteht aus einer langen  $\alpha$ -Kette (~ 400 kDa) und zwei kürzeren Polypeptidketten ( $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette, auch als B1 und B2 bezeichnet) mit einem Molekulargewicht von je circa 200 kDa. Durch Assemblierung der carboxyterminalen Anteile aller drei Untereinheiten zu einer  $\alpha$ -helicalen ‚coiled-coil‘ Struktur entsteht die für Laminin charakteristische cruziforme Quartärstruktur. Die großen und modular aufgebauten Laminin-Moleküle enthalten eine Vielzahl von Bindungsstellen für andere Proteine der extrazellulären Matrix wie Kollagen oder Nidogen und ebenso für zelluläre Rezeptoren [63-65].

Eine Interaktion von Laminin mit PrP als potentiell zellulären Laminin-Rezeptor wurde von Graner *et al.* gefunden [56]. Anhand von Konkurrenzexperimenten mit drei unterschiedlichen Laminin-Peptiden postulierten sie einen PrP-Bindungslokal im Bereich der Aminosäuren 1575-1584 des Carboxyterminus der  $\gamma_1$ -Kette von Laminin (SwissProt Accession No. P02468, Sequenz RDIAEIIKDA). Dieser Bereich des Laminin-Moleküls wird mit der stimulatorischen Wirkung von Laminin auf die Migration von Neuronen und das Auswachsen von Neuriten in Verbindung gebracht [66, 67]. In ihren Experimenten mit neuronalen Primärkulturen der Ratte konnten Graner *et al.* zeigen, dass das Blockieren von zellulärem Prionprotein durch spezifische Antikörper die Laminin-induzierte Ausbildung von Neuriten und die Anheftung neuronaler Zellen an Laminin-beschichtete Mikrotiterplatten beeinträchtigte [68].

Im Rahmen der hier durchgeführten Kartierung linearer PrP-Bindestellen innerhalb der  $\gamma_1$ -Kette von Laminin konnte keine Übereinstimmung mit dem postulierten PrP-bindenden Bereich ( $\gamma_1$ -Peptid) festgestellt werden. Während Peptide aus dem carboxyterminalen Bereich der  $\gamma_1$ -Kette eine konsistent niedrige PrP-Bindung aufwiesen, konnte eine starke Bindung des fluoreszenzmarkierten PrP90-231 an eine Region im Aminoterminus des Proteins festgestellt werden, die die Aminosäuren 161-176 umfasste. Die nicht nachweisbare Reaktivität mit dem  $\gamma_1$ -Peptid könnte am Fehlen der aminoterminalen Domäne des hier verwendeten rekombinanten PrP liegen, was jedoch die Identifizierung des zusätzlichen PrP-

bindenden Peptids nicht erklärt. Graner *et al.* führten jedoch die Konkurrenzexperimente nur mit drei ausgewählten Laminin-Peptiden durch; die Wahl wurde dabei auf der Basis einer bereits bekannten Funktionalität dieser Bereiche des Laminin-Moleküls getroffen. Ein kompetitiver Effekt ergab sich weiterhin nur bei Verwendung eines sehr hohen molaren Überschusses des Peptids (4.000-fach bis 40.000-fach) relativ zu dem verwendeten radioaktiv markierten Laminin.

Das im Rahmen dieser Arbeit gefundene PrP-affine Motiv liegt im N-Terminus der  $\gamma_1$  Laminin-Untereinheit im Bereich der globulär organisierten LamNT-Domäne (Laminin N-terminal domain, auch als Domäne VI bezeichnet, aa 1-282 der Laminin  $\gamma_1$ -Kette), die einen der am höchsten konservierten Bereiche in Lamininen darstellt [65, 185]. Diese Domäne enthält Erkennungsstellen für verschiedene  $\beta_1$ -Integrine und für die Heparin- und Heparansulfat-Ketten von Perlecan, einem Bestandteil der extrazellulären Matrix; sie ist weiterhin essentiell für die Zusammenlagerung (‘self-assembly’) der Laminin-Untereinheiten [185]. Ob der von uns neu identifizierte Bindungsloкус eine biologische Bedeutung besitzt, ist unklar. Wettbewerbsstudien, die einen Vergleich der inhibitorischen Effekte des ‘ $\gamma_1$ -Peptids’ und des hier identifizierten Peptids auf die Laminin-Bindung von PrP ermöglichen, könnten darüber Aufschluss geben.

#### 7.1.4 Laminin Rezeptor Precursor

Durch Heterodimerisierung mit einem bis heute unbekanntem Kofaktor [69, 70] entsteht aus dem transmembranen 37 kDa Laminin Rezeptor Precursor (LRP) der reife 67 kDa Laminin Rezeptor LR. Dieser ist auf einer Vielzahl von Zelltypen zu finden und konnte unter anderem auf der Oberfläche von neuronalen Zellen [186, 187] und auf der apikalen Bürstensaum-Membran von Enterozyten [188] nachgewiesen werden. Als Zelloberflächen-Rezeptor mit Bindungskapazitäten für Laminin, Elastin und bestimmte Kohlenhydratstrukturen übernimmt LR Funktionen bei der Interaktion von Zellen mit (Glyko-) Proteinen der Extrazellulären Matrix und spielt damit sowohl bei der Organisation und dem Zusammenhalt von Geweben als auch bei der Regulation der Zellmigration eine Rolle [64].

Eine Bindung von rekombinantem Prionprotein an LRP wurde 1997 von Rieger *et al.* durch ‘Yeast two-Hybrid’-Screening gefunden [189]. Weitere Studien zeigten, dass LRP/LR sowohl von PrP<sup>c</sup> als auch vom fehlgefalteten PrP<sup>sc</sup> als zellulärer Rezeptor genutzt werden kann [34, 71]; darüber hinaus wurde eine Rolle für LRP/LR bei der intestinalen Aufnahme und der Propagation von PrP<sup>sc</sup> postuliert [72, 73]. Eine genauere Kartierung der Interaktions-Domänen wurde 2001 von Hundt *et al.* durch Bindungsstudien mit Deletionsmutanten beider Proteine vorgenommen [162]. Eine direkte Bindung der Aminosäuren 144-179 von PrP wurde für den Bereich der Aminosäuren 161-179 des Laminin Rezeptor Precursors

demonstriert; dieser Bereich beinhaltet auch die Laminin-bindende Domäne von LRP mit der palindromischen Sequenz LMWWML [190]. Weiterhin wurde eine indirekte, Heparansulfat-Proteoglycan (HSPG)-abhängige Bindung zwischen dem Aminoterminus (aa 53-93) des Prionproteins und einem nicht genau definierten Locus (zwischen aa 101-160 oder aa 180-295) am LRP nachgewiesen. Da die Aminosäuren 205-224 mutmaßlich eine Heparansulfat-Bindestelle von LRP darstellen [191], wurde dieser Bereich als der wahrscheinlichste Kandidat für eine HSPG-vermittelte PrP-Bindung angenommen.

Im Rahmen der hier durchgeführten Kartierung linearer Bindestellen des Laminin Rezeptor Precursors für PrP<sup>90-231</sup> konnten zwei peptidische PrP-bindende Motive gefunden werden. Eine schwache Bindung des fluoreszenzmarkierten Prionproteins konnte für den Bereich des auch von Hundt *et al.* beschriebenen Laminin-Bindungslokus von LRP bestätigt werden [162]. Da die postulierte korrespondierende Interaktionsdomäne von PrP mit den Aminosäuren 144-179 in dem von uns zur Kartierung verwendeten Konstrukt PrP<sup>90-231</sup> enthalten war, kann hier also eine Korrelation der Ergebnisse festgestellt werden. Für den Fall des zweiten von uns identifizierten PrP-Bindungslokus, der mit den Aminosäuren 189-210 Anteile der von Kazmin *et al.* [191] beschriebenen putativen Heparansulfat-Bindestelle von LRP (aa 205-224) umfasste, ist dies weniger klar. Eine Bindestelle für PrP in diesem Bereich wurde zwar auch von Hundt *et al.* vermutet, jedoch zum einen nicht direkt nachgewiesen und zum zweiten als über den Aminoterminus von PrP vermittelt sowie als HSPG-abhängig beschrieben. Inwiefern also der hier gefundene PrP-affine Bereich im Carboxyterminus von LRP eine Bedeutung für die Interaktion beider Proteine *in situ* bzw. *in vivo* besitzt und ob ein Zusammenhang mit der von Hundt *et al.* beschriebenen HSPG-abhängigen Bindung besteht, bleibt offen.

### 7.1.5 Bcl-2

Auf der Suche nach Interaktionspartnern des Apoptoseregulator Bcl-2 fanden Kurschner und Morgan 1995 eine spezifische Bindung des Prionproteins (aa 72-245) an das im ‚Yeast two-Hybrid‘ Screen verwendete LexA/Bcl-2 Fusionsprotein [77]. Eine Kartierung des PrP-Bindungslokus durch Analyse verkürzter Bcl-2 Konstrukte im gleichen experimentellen Ansatz identifizierte die Aminosäuren 174-236 von Bcl-2 (SwissProt Accession No. P10417) als Hauptmediator der Interaktion; eine schwächere Bindung konnte jedoch auch für das Minimalkonstrukt, welches nur die carboxyterminalen 37 Aminosäuren (aa 200–236) von Bcl-2 umfasste, nachgewiesen werden [163].

Die Proteine der Bcl-2 Familie repräsentieren wichtige Regulatoren des programmierten Zelltods in neuronalen Geweben und umfassen neben antiapoptotischen Proteinen wie Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> auch proapoptotisch wirkende Vertreter wie Bax und Bad [192]. Auf einen

apoptotischen Stimulus hin wird das cytosolische Bax aktiviert, inseriert in Form von Oligomeren in die mitochondriale Membran und permeabilisiert diese [193]. Das Austreten von apoptogenen Proteinen wie z.B. Cytochrom c in das Cytosol initiiert dann Caspase-abhängige und -unabhängige Mechanismen, die zum Tod der Zelle führen. Bcl-2 interferiert mit der beschriebenen Ereigniskaskade, indem es die für die Homo-Oligomerisierung von Bax notwendige Konformationsänderung des Proteins und damit die mitochondriale Translokation verhindert [194].

Im Zuge verschiedener *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass PrP ähnlich dem für das antiapoptotische Bcl-2 beschriebenen Mechanismus die Konformationsänderung von Bax inhibieren kann [195] und dadurch neuronale Zellen vor Bax-induzierter Apoptose schützt [74]. Rambold *et al.* demonstrierten, dass im Cytosol vorliegendes fehlgefaltetes PrP<sup>Sc</sup> mit Bcl-2 koaggregiert und dadurch Apoptose auslöst [196]. Der genaue Mechanismus der Interaktion von PrP mit Bcl-2 und/oder Bax und die Signifikanz der hiermit assoziierten neuroprotektiven Funktion von PrP<sup>C</sup> bzw. der neurotoxischen Wirkung von PrP<sup>Sc</sup> *in vivo* blieb jedoch bisher unklar.

Während Kurschner und Morgan aus ihren Phage Display-Experimenten mit deletierten Bcl-2 Konstrukten schlossen, dass die carboxyterminalen Aminosäuren 174-236 von Bcl-2 ausreichend und die Aminosäuren 200-236 notwendig für eine Interaktion mit PrP (aa 72-245) sind [163], konnten hier im Rahmen der Kartierung von Bcl-2 mit Peptidbibliotheken drei unabhängige PrP90-231-Bindungsloci identifiziert werden. Der gefundene PrP-affine Bereich im Carboxyterminus (aa 171-200) mit dem Kernmotiv der Aminosäuren 177-193 überschneidet sich dabei zwar zum Teil mit der von Kurschner und Morgan postulierten Bindedomäne (aa 174-236), enthält aber keine Anteile der potentiellen Transmembrandomäne von Bcl-2 (aa 209-230), die als essentiell für die Bindung des Prionproteins beschrieben wurde und die ebenfalls für eine Homodimerisierung von Bcl-2 notwendig ist. Stattdessen überschneidet sich das von hier gefundene, proximal zur Transmembrandomäne gelegene Bindemotiv mit der BH 2-Domäne (Bcl-2 homology domain 2, aa 184-199), die zusammen mit der BH 1-Domäne (aa 133-152) eine Rolle bei der Heterodimerisierung von Bcl-2 mit Bax spielt und damit essentiell für die antiapoptotische Wirksamkeit von Bcl-2 ist [197, 198]. Die weiteren linearen Motive aus Bcl-2 mit Affinität für PrP90-231 (aa 91-110 und aa 15-36) liegen in bzw. bei der BH 4- (aa 10-30) und der BH 3-Domäne (aa 90-104), denen keine distinkte Funktion zugeordnet werden konnte, aber die wahrscheinlich ebenfalls Einfluss auf die Bindung von Bax besitzen.

### 7.1.6 Streptavidinbindung und putative Biotinimitation durch PrP90-231

Das Phänomen der Streptavidinbindung durch PrP90-231 wurde bereits im Rahmen der Publikation dieses Teilprojekts der Dissertation ausführlich diskutiert [157]. Hier sollen daher nur die wichtigsten Aspekte dargestellt werden.

Die im ELISA aufgefallene und durch Western-Blots verifizierte Bindung von Streptavidin an rekombinantes PrP90-231 konnte durch die Detektion von PrP-Peptidbibliotheken mit fluoreszenzmarkiertem Streptavidin und durch Analyse der Streptavidin-Bindung an die Deletionsmutante PrP101-231 auf die N-terminalen Aminosäuren 90-100 des Prionproteins als Hauptmediator der Interaktion eingengt werden. Während durch Kompetition der Bindung mit Biotin für PrP90-231 eine signifikante Reduktion Streptavidin-spezifischer Signale nachgewiesen werden konnte, wurde die schwache Interaktion von Streptavidin mit der Deletionsmutante durch Biotin kaum beeinflusst. Zusammenfassend können diese Daten dahingehend interpretiert werden, dass PrP90-231 über den Bereich der Aminosäuren 90-100 an die Biotin-Bindestelle von Streptavidin bindet. Die nicht über die Biotin-Bindetasche und das aminoterminal Sequenzmotiv vermittelte Rest-Bindungsaktivität von 14,1 % (Biotin-Kompetitionsstudien mit PrP90-231) bzw. 19 % (Streptavidin-Bindungsaffinität der Deletionsmutante relativ zu PrP90-231) könnte durch eine niederaffine Bindung von Streptavidin an das zweite in PrP90-231 detektierte Bindemotiv (aa 127-140) verursacht werden; der zusätzliche Einfluss einer unbekannt konformationellen Determinante kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Die Biotin-Bindetasche von Streptavidin wird von Aminosäuren gebildet, die erst durch die korrekte Ausbildung der Tertiär- und Quartärstruktur des tetrameren Proteins in räumliche Nähe zueinander gelangen. Für die Assemblierung der vier funktionellen Biotin-Bindetaschen eines Moleküls sind dabei je vier Tryptophanreste essentiell, von denen je drei im jeweiligen Monomer selbst enthalten sind, das vierte aber von der benachbarten Untereinheit zur Verfügung gestellt wird. Das lineare, PrP90-231-bindende Sequenzmotiv aus Streptavidin (aa 99-108) enthält eines dieser Tryptophane ( $W_{103}$  des Streptavidin Precursors, SwissProt Accession No. P22629) und liegt so zumindest zum Teil innerhalb der Biotin-Bindestelle von Streptavidin. Daher ist eine Beteiligung der Aminosäuren 99-108 von Streptavidin an der niederaffinen Restbindung an PrP101-231 bzw. der Restbindung Biotin-gesättigten Streptavidins an PrP90-231 unwahrscheinlich.

Das in dieser Arbeit gefundene Streptavidin-bindende Hauptmotiv des rekombinanten PrP90-231 ist im flexiblen und unstrukturierten Aminoterminus des Prionproteins lokalisiert, der die Aminosäuren 23-124 von murinem PrP umfasst [26]. Ob eine Reaktivität mit Streptavidin auch für das nicht deletierte zelluläre PrP (aa 23-231) gegeben wäre, konnte im Rahmen dieses Projektes nicht aufgeklärt werden; die Zugänglichkeit des Sequenzmotivs im



rekombinanten PrP90-231 impliziert jedoch, dass zumindest die auch *in vivo* vorkommenden aminoterminal deletierten PrP-Spezies Biotinmimetika darstellen könnten.

Obwohl das Vorhandensein verkürzter PrP-Isoformen im Körper häufig beschrieben wurde [29, 36, 37, 199], ist über die physiologische Bedeutung dieses Phänomens nur wenig bekannt. Eine Hauptform der N-terminal verkürzten PrP-Spezies repräsentiert das sogenannte C1-Fragment, das die Aminosäuren 111 bis 231 umfasst. Zusätzlich existiert eine heterogenere Population deletierter Moleküle, deren Aminotermini zwischen den Aminosäurepositionen 80 und 100 beginnen (s. auch Abbildung 2.3) und die so zum Teil das Streptavidin-bindende Sequenzmotiv enthalten. Die *post mortem* Analyse von Hirnmaterial menschlicher SE-Patienten zeigte eine Anreicherung an PrP-Spezies der letzteren Gruppe [37], was auf eine verminderte Zugänglichkeit der Schnittstelle am Histidin-111 im pathogenen Scrapie-Konformer zurückgeführt wurde. Dies bedeutet gleichzeitig eine Akkumulation potentiell Biotin-imitierender PrP-Formen im SE-infizierten Hirn.

Eine biologische Relevanz der biotinitierenden Eigenschaften von PrP90-231 konnte im Rahmen der hier durchgeführten Experimente nicht schlüssig nachgewiesen werden. Die Hypothese einer potentiellen Bedeutung des aminoterminalen, Streptavidin-bindenden Sequenzmotivs für die intestinale Invasion von Prionen wurde durch PrP-Bindungsstudien mit der intestinalen Caco-2<sub>BBE1</sub>-Zelllinie als Dünndarmepithel-Modellsystem überprüft. PrP<sup>sc</sup> erfährt während der Gastrointestinalpassage eine partielle proteolytische Degradation und liegt so an seinem putativen Aufnahmeort im distalen Dünndarm zum Großteil in Form eines aminoterminal deletierten Moleküls vor, welches analog zum hier verwendeten rekombinanten PrP die Aminosäuren 90-231 umfasst [12]. Eine Imitation von Biotin durch das prozessierte PrP<sup>sc</sup> könnte so eine Biotinrezeptor-vermittelte Bindung an Enterozyten bewirken und die Transzytose des Pathogens erleichtern. Alle Säugetiere besitzen für Biotin als essentielles Vitamin intestinale Transportsysteme wie den Natrium-abhängigen Multivitamintransporter SMVT oder SLC19A3 (Solute Carrier Family 19 Member 3), die beide hauptsächlich in Leber, Niere und in der intestinalen Mukosa exprimiert werden, aber auch z.B. im Zentralen Nervensystem zu finden sind [200, 201]. Obwohl freies Biotin als Hauptsubstrat dieser Transporter nachgewiesen wurde, können auch Biotinderivate wie Biocytin erkannt und transportiert werden [202]. Dies hat man sich im Falle des SMVT zunutze gemacht, um durch ‚SMVT-Targeting‘ mit biotinylierten Peptid-basierten Medikamenten eine verbesserte orale Absorption zu erreichen [203]. Bei Absättigung der Caco-2<sub>BBE1</sub> Biotin-Rezeptoren bzw. -Transporter durch Vorinkubation der Zellen mit Biocytin konnte jedoch keine Reduktion der PrP90-231-Bindung an die Zellen beobachtet werden. Da andererseits nach Vorinkubation der Zellen mit der PrP101-231 Deletionsmutante eine signifikante Inhibition der PrP90-231-Bindung gezeigt werden konnte, kann ein Interaktionsmechanismus von PrP90-231 mit Caco-Zellen postuliert werden, der sowohl von

der Anwesenheit eines Biotintransporters als auch von den Aminosäuren 90-100 des Prionproteins unabhängig ist. Ein Einfluss von Biotin-imitierenden Eigenschaften des pathogenen Kernproteins ‚PrP<sup>sc</sup>90-231‘ auf die intestinale Aufnahme und damit auf die Infektiosität von Prionen kann also weitestgehend ausgeschlossen werden.

Auch die Konkurrenzexperimente mit der *E. coli* Biotin Protein Ligase BirA ergaben keinen Hinweis auf eine physiologische Bedeutung der putativen Biotin-Mimikri durch PrP90-231. Zwar konnte in Anwesenheit von PrP90-231 eine signifikante Reduktion der Biotinylierung des peptidischen Zielsubstrats nachgewiesen werden; diese Reduktion konnte jedoch ebenso bei Zugabe von PrP101-231 oder BSA beobachtet werden. Die Analyse von BirA-Biotinylierungsansätzen im Western-Blot zeigte, dass alle Proteine mit inhibitorischer Wirkung auf die Biotinylierungsreaktion selbst biotinyliert wurden. Dies legt nahe, dass statt einer spezifischen kompetitiven Hemmung von BirA der Mechanismus der Substratkompetition für die verringerte Effizienz der Peptidbiotinylierung verantwortlich war.

Auch wenn die Suche nach einer potentiellen biologischen Funktion der Biotin-Imitation durch N-terminal verkürzte PrP-Spezies im Rahmen dieser Arbeit nur stichprobenartig durchgeführt werden konnte und so nicht alle denkbaren Ansatzpunkte für eine potentielle Intervention von PrP90-231 im zellulären Biotinmetabolismus untersucht wurden, erwecken die dargestellten Ergebnisse eher Zweifel an einer physiologischen Relevanz der Streptavidin-PrP-Interaktion. Die Identifizierung der Hauptbindestelle von Streptavidin im Aminoterminus von PrP90-231 ermöglichte jedoch die Etablierung des Peptid-ELISAs unter Verwendung der Deletionsmutante PrP101-231. Hieran angelehnt dürften die Resultate der Studie auch für andere Forschergruppen von Interesse sein, die im Zusammenhang mit Prionproteinen ein Streptavidin-basiertes Nachweisverfahren nutzen möchten oder müssen.

## 7.2 Validierung der PrP-Bindung durch peptidische Liganden

Die Analyse von Peptidbibliotheken ist eine etablierte Methode zur Kartierung linearer Bindestellen eines Liganden, die in den meisten Fällen zur Identifizierung nicht-konformationeller Epitope von Antikörpern genutzt wird (‚Epitopkartierung‘). Ein Nachteil dieses experimentellen Ansatzes ist jedoch häufig ein hohes Hintergrundsignal, welches bei indirekten Nachweisverfahren durch die genutzten sekundären und tertiären Detektionsreagenzien verursacht wird und das die Identifikation realer Bindestellen für das zu untersuchende Protein erschwert. Das zunächst getestete ‚Sandwich-Verfahren‘ mit Detektion der Bindung unmarkierten Prionproteins an Peptidbibliotheken über einen Primär- und einen markierten Sekundärantikörper konnte daher nicht angewendet werden. Die daraufhin etablierte Methode zum Nachweis der PrP-Bindung an Peptidbibliotheken, die auf der Verwendung von direkt mit Alexa Fluor 680 markiertem Prionprotein (PrP-680) beruhte,

vereinte viele Vorteile in sich. Zum einen entfiel durch die kovalente Kopplung des Fluorophors an das nachzuweisende Molekül die Notwendigkeit für ein sekundäres und tertiäres Detektionsreagenz, wodurch alle nicht auf PrP-Bindung basierenden unspezifischen Signale eliminiert wurden. Ein weiterer Vorteil der direkten Nachweismethode war die Quantifizierbarkeit der Signale, da die gemessene Fluoreszenzintensität direkt mit der Menge an gebundenem PrP-680 korrelierte. Verglichen mit einem Bindungsnachweis durch Farbreaktion oder durch Chemilumineszenz bei enzymgekoppelten Detektionsreagenzien ist die Detektion von fluorophormarkierten Proteinen unabhängig von variierenden Entwicklungszeiten, ist gerade im hier genutzten langwelligen Infrarotbereich äußerst hintergrundarm und besitzt weiterhin den Vorzug einer hohen Sensitivität [204, 205].

Fluoreszenzfarbstoffe sind kleine Moleküle, deren Molekulargewicht meist zwischen 400 und 1200 Dalton liegt. Ihre kovalente Kopplung an ein Protein sollte daher dessen Bindungseigenschaften viel weniger beeinflussen, als es die Kopplung mit den häufig für die Markierung von Antikörpern verwendeten, hochmolekularen Enzymen wie Meerrettichperoxidase oder alkalischer Phosphatase täte. Um einen Einfluss des Fluorophors auf die Peptidbindung von PrP weitestmöglich auszuschließen, wurde darüber hinaus eine geringe Derivatisierung des Prionproteins angestrebt. Der durch Einsatz eines äquimolaren Protein:Farbstoff-Verhältnisses in der Kopplungsreaktion erhaltene Derivatisierungsgrad von 0,2 für PrP-680 bedeutete, dass nur jedes fünfte PrP-Molekül ein einzelnes Fluorophor trug. Da also in der markierten Charge PrP-680 zusätzlich zum fluorophorgekoppelten auch unmarkiertes Prionprotein vorlag, wurde durch geeignete Experimente ein kompetitiver Effekt auf die Bindung an Peptidbibliotheken ausgeschlossen: Peptidbibliotheken wurden mit der markierten Charge PrP-680 mit oder ohne Zusatz weiteren unmarkierten Prionproteins inkubiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Supplementation der Detektionslösungen mit einem 10-fachen molaren Überschuss an PrP90-231 relativ zu PrP-680 keinen Einfluss auf die Detektierbarkeit PrP-bindender Peptide ausübte. Der fehlende Einfluss nichtfluoreszierenden Prionproteins erklärt sich durch die hohe Konzentration an zur Verfügung stehenden PrP-Bindestellen in den Peptidbibliotheken, wodurch PrP in massivem Überschuss zu seinem Liganden vorlag. Eine Kompetitionswirkung unmarkierten Prionproteins wäre erst bei dessen Einsatz in sehr viel höheren Konzentrationen zu erwarten. In den späteren Versuchen wurde die Menge an zugegebenem PrP-680 konstant gehalten und darüber hinaus nicht als Verdünnung berechnet, sondern an die Anzahl von Peptidspots in der zu analysierenden Bibliothek angepasst (1 ng PrP-680 pro Peptidspot). Hierdurch wurde eine für jede Peptidbibliothek äquivalente Konkurrenzsituation um das zur Verfügung stehende PrP-680 geschaffen.

Ein direkter Einfluss der Farbstoffkomponente in Form einer Fluorophor-vermittelten Peptidbindung, die eine weitere mögliche Fehlerquelle darstellte, wurde durch die Kontrollexperimente mit Alexa Fluor 680 markierten BSA (BSA-680) ausgeschlossen.

Mit Hilfe des im Rahmen dieser Arbeit etablierten Festphasenassays konnte also eine sensitive und spezifische Detektion linearer PrP-Bindestellen erfolgen. Ob die Assoziation von PrP mit seinen Liganden *in situ* bzw. *in vivo* zum Teil oder komplett über die hier identifizierten Bindestellen vermittelt wird, kann nur durch weiterführende Experimente mit den isolierten PrP-Ligandenproteinen geklärt werden; entscheidend für das vorliegende Projekt waren jedoch die PrP-bindenden Eigenschaften der Peptide *per se*.

Um die PrP-bindenden Eigenschaften der Sequenzmotive in einem weiteren experimentellen Ansatz und unabhängig vom Festphasenassay zu verifizieren, wurde ein Mikrotiterplatten-Immunoassay (ELISA) etabliert. Dieser beruhte auf der Detektion einer Bindung von in Lösung vorliegenden, biotinmarkierten Peptiden an immobilisiertes, unmarkiertes Prionprotein. In der Tat konnte mit Hilfe dieses Verfahrens eine spezifische Bindung der im Peptidsynthese-Festphasenassay als PrP-bindend identifizierten Aminosäuresequenzmotive bestätigt werden. Obwohl die Konzentration der eingesetzten Peptidlösungen nicht genau bestimmt werden konnte und die eingesetzte Peptidmenge daher als Anteil der Peptidmenge eines Spots angegeben wurde, korrelieren die Signalhöhen mit der Höhe der für die gleichen Peptide im Festphasenassay detektierten Signalintensitäten. Generell konnten jedoch im ELISA auch bei hohen Peptidkonzentrationen nur niedrige PrP-spezifische Signale gemessen werden. Dies spricht für eine niedrigaffine Peptid-PrP-Interaktion und hebt die hohe Sensitivität der Analyse von Peptidbibliotheken mit fluoreszenzmarkiertem Prionprotein hervor, bei der aufgrund der hohen Peptid-Dichte und der empfindlichen fluoreszenzoptischen Nachweismethode auch niedrigaffine Interaktionen erfasst werden konnten. Der Nachweis der Peptidbindung an das unmarkierte rekombinante Protein im ELISA stellte darüber hinaus einen weiteren Beweis für die Unabhängigkeit der Peptid-PrP-Interaktion von der Fluorophorkopplung des Prionproteins dar.

### **7.3 AIDA-vermittelte Expression der PrP-Liganden in *E. coli***

Wie durch Western Blots bakterieller Lysate gezeigt wurde, war eine effiziente AIDA-vermittelte Expression der peptidischen PrP-Liganden sowohl in *E. coli* C600-Zellen als auch in dem OmpT-defizienten *E. coli*-Stamm BL21 möglich. Sowohl der erfolgreiche Transport durch die innere bakterielle Membran als auch die Integration der Translokator-domäne in die äußere Membran konnten durch den Nachweis von AIDA und den des Reporterepitops Flag in Präparationen der äußeren Membran bestätigt werden.

Der Nachweis mit einem AIDA-spezifischem Kaninchenserum zeigte jedoch auch eine partielle Degradation von AIDA in *E. coli* C600-Lysaten. Diese konnte bei Expression der Konstrukte in BL21-Zellen nicht nachgewiesen werden, was eine Beteiligung der äußeren Membran-Protease OmpT am proteolytischen Angriff auf den Autotransporter nahelegt. Konieczny *et al.* demonstrierten eine OmpT vermittelte Spaltung von AIDA zwischen den Aminosäuren R<sub>926</sub> und V<sub>927</sub> im oberflächenexponierten  $\beta$ 1-Linkerbereich von AIDA<sup>c</sup> [138]. Dieses Sequenzmotiv ähnelt der universellen OmpT Konsensussequenz und ist identisch mit der OmpT-Schnittstelle in Plasminogen. Eine hocheffiziente Prozessierung durch OmpT erfordert allerdings die Anwesenheit zweier basischer Aminosäuren (meist R ↓ R), wobei zusätzlich weitere, benachbarte Aminosäuren eine Rolle für die Erkennung spielen [206]. Eine OmpT-vermittelte Abspaltung heterologer Passengerdomänen von Autotransportern, die zur Sekretion des abgespaltenen extrazellulären Aminoterminus in das umgebende Medium führt, wurde in verschiedenen Studien sowohl für AIDA [135, 140] als auch für den IgA-Protease Autotransporter aus *Neisseria gonorrhoeae* berichtet [164]. Die Tatsache, dass bei der Analyse von in *E. coli* C600 exprimiertem AIDA-Flag in Western Blots das Flag-spezifische Signal nur mit dem intakten AIDA kolokalisierte, nicht aber mit den durch das polyklonale AIDA-Serum ebenfalls detektierbaren OmpT-Degradationsprodukten, bestätigte, dass eine spezifische Abspaltung des aminoterminalen, extrazellulären Passengerbereichs erfolgte. Die Prozessierung betraf jedoch unabhängig von der Identität der heterologen AIDA-Insertion immer nur einen Teil der insgesamt nachweisbaren AIDA-Moleküle. Der Großteil lag in intakter, undegradierter Form vor, so dass durch OmpT nur eine Reduktion der Menge an oberflächenexponiertem Liganden bewirkt wurde.

Die Oberflächenexposition des aminoterminalen AIDA-Anteils konnte durch Pull-Down Assays mit AIDA-Flag exprimierenden Bakterien nachgewiesen werden, wobei die Bindung des anti-Flag Antikörpers an intakte Zellen ein Vorliegen des Epitops auf der bakteriellen Oberfläche impliziert. Dass dieser Nachweis auch bei Expression in *E. coli* C600 mit hoher Effizienz möglich war, beweist eine ausreichende Menge an kovalent gebundenem Passenger auch im OmpT-positiven Bakterienstamm.

Aus welchen Gründen die Expression und Translokation der Kringle 3 (K3)-Domäne nur in *E. coli* C600 und nicht in BL21-Zellen möglich war, ist unklar. Die nachteiligen Auswirkungen voluminöser Passengerdomänen auf den Autotransporter-vermittelten Export wurden zwar mehrfach beschrieben, sollten jedoch auf beide Bakterienstämme gleichermaßen zutreffend sein. Kringle-Domänen enthalten bei einer Länge von circa 80 Aminosäuren sechs Cysteinreste, die während des Proteintransits durch das oxidierende Milieu des Periplasmas mit hoher Wahrscheinlichkeit intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden. Klauser *et al.* konnten zeigen, dass ein Export der B-Untereinheit von Cholera toxin (CTB) durch den IgA-Autotransporter nur unter Bedingungen möglich war, die eine Bildung von Disulfidbrücken im

Periplasma verhinderten [164]. Gefaltetes CTB blieb -bildlich gesprochen- in der Translokationspore der äußeren Membran stecken, was durch die Entstehung charakteristischer periplasmatischer Abbaufragmente nachgewiesen werden konnte. Demgegenüber konnte mutiertes, cysteinfreies CTB problemlos exportiert werden [132]. Eine Möglichkeit, die Bildung von Disulfidbrücken im Periplasma zu verhindern, ist die Wahl eines DsbA-defizienten Expressionssystems [132]. DsbA ist eine periplasmatische Oxidoreduktase, die in *E. coli* für die korrekte Ausbildung Disulfidbrücken-stabiler Tertiärstrukturen notwendig ist [207]. Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass in DsbA<sup>-</sup>-Bakterienstämmen der Export von potentiell Disulfidbrücken-haltigen Passengerdomänen ermöglicht bzw. erleichtert wird [132, 140, 208]. Gleichzeitig wurde jedoch eine durch inkorrekte Faltung bedingte reduzierte Funktionalität der exportierten Polypeptide gefunden [140, 209]. Aus diesem Grund, aber auch wegen der anzunehmenden genetischen Instabilität einer solchen bakteriellen Deletionsmutante *in vivo*, stellte die Verwendung von DsbA-defizienten *E. coli* im vorliegenden Projekt keine adäquate Alternative dar.

Trotz des Vorliegens von Cysteinresten im heterologen Kringle 3-Passenger und obwohl *E. coli* C600 eine funktionsfähige DsbA-Oxidoreduktase besitzt, konnte in diesem Stamm eine stabile Expression von AIDA-K3 erzielt werden. Allerdings wiesen die Bakterien dabei eine reduzierte Wachstumsgeschwindigkeit relativ zu solchen Bakterien auf, die nur peptidische AIDA-Insertionen exprimierten. Weiterhin war die in Western Blots nachweisbare Menge des Autotransporters für AIDA-K3 deutlich reduziert, was entweder für eine anteilige periplasmatische Degradation oder aber für eine verminderte generelle Expressionsaktivität spricht. Eine AIDA-vermittelte Expression des fast 260 Aminosäuren und drei Kringle-Domänen (Kringle-Domänen 1-3 des murinen Plasminogen) umfassenden AIDA-K123-Konstrukts konnte auch in *E. coli* C600 nicht erreicht werden.

*E. coli* C600 wurde als pMK90-Wirt zur Expression von AIDA und Oberflächenexposition der PrP-Liganden ausgewählt und in den Prionprotein-Bindungsstudien verwendet. Die Problematik der OmpT-vermittelten partiellen Freisetzung der AIDA-Passengerdomäne ließe sich für die spätere Anwendung der Bakterien *in vivo* durch gerichtete Mutagenese der OmpT-Schnittstelle R<sub>926</sub> ↓ V<sub>927</sub> beseitigen (z. B. R<sub>926</sub> → S<sub>926</sub> durch die Substitution C → A bei nt 2821 von SwissProt Accession No. X65022). Ein Fehlen des basischen Arginins würde die Erkennung der ohnehin von der Konsensussequenz abweichenden Schnittstelle durch OmpT eliminieren oder zumindest drastisch reduzieren.

#### 7.4 PrP-Bindung durch modifizierte Bakterien

Obwohl die PrP-Affinität der ausgewählten Peptidsequenzmotive *per se* durch Nutzung unterschiedlicher experimenteller Ansätze (Kartierungen, Peptid-ELISA) eindeutig nachweisbar war, konnte für keines der bakteriellen Konstrukte mit peptidischen Insertionen eine effiziente Adsorption von PrP<sup>90-231</sup> demonstriert werden. Zwar war bei Verwendung von AIDA-NCAM exprimierenden *E. coli* C600 in der Dot Blot-Analyse nach Pull-Down Assays eine Verdopplung der Fluoreszenzintensität relativ zur Kontrolle messbar, eine entsprechende Steigerung der Bindungskapazität konnte jedoch im immunzytometrischen Verfahren nicht bestätigt werden. Die geringe PrP-Bindungsstärke der Peptide deutete sich allerdings bereits während der Peptid-Analyse im Immunoassay an. Im ELISA-Format konnte selbst für diejenigen Peptide, die im Festphasenassay sehr starke Signalintensitäten zeigten, nur bei Verwendung hoher Peptidmengen und nicht zu starker Absättigungsreagenzien eine spezifische Bindung nachgewiesen werden.

Das einzige bakterielle Konstrukt mit deutlicher und auch im durchflusszytometrischen Messverfahren detektierbarer PrP-Bindungskapazität war *E. coli* C600-(AIDA-K3). Die relativ hohe Affinität der aus Plasminogen stammenden Kringle 3-Domäne zum Prionprotein muss dabei durch Kringle-spezifische, konformationelle Determinanten bedingt worden sein. Dies wird durch die Tatsache impliziert, dass das aus Kringle 3 stammende Plasminogen-Peptid (trotz seiner PrP-Reaktivität im Peptidsynthese-Festphasenassay und im Peptid-ELISA) im AIDA-Kontext keine PrP-Bindung bewirken konnte, und zwar unabhängig vom Vorhandensein der beiden im Original-Peptidmotiv (AIDA-PLG) enthaltenen Cysteinreste, die im modifizierten Konstrukt (AIDA-mPLG) durch Alanin ersetzt worden waren. Durch Ausbildung einer intrapeptidischen Disulfidbrücke in AIDA-PLG sollte die Anordnung des Peptids in einer Loop-Struktur ermöglicht werden, die der nativen Peptidkonformation in Kringle-Domänen ähnelt (s. Abb. 5.12 B). Ob diese Loop-Struktur während der Expression von AIDA-PLG in *E. coli* tatsächlich ausgebildet wurde, konnte allerdings experimentell nicht überprüft werden. Dass generell eine Bildung von Disulfidbrücken innerhalb der Passenger-Domänen möglich war und stattfand, kann jedoch sowohl aus der mit hoher Wahrscheinlichkeit Tertiärstruktur-abhängigen PrP-Bindung an K3-präsentierende Bakterien als auch aus der reduzierten Translokationseffizienz der Kringle-Domäne in C600-(AIDA-K3) bzw. der nicht stattfindenden Translokation in BL21-(AIDA-K3) abgeleitet werden.

#### 7.5 *De novo* Generierung höheraffiner Peptidliganden

Das Einfügen der Kringle 3-Domäne in den oberflächenassoziierten AIDA-Passenger bewirkte zwar eine effiziente Adsorption von PrP an die modifizierten Bakterien. Im Hinblick auf eine problemlosere Translokation und eine hiermit vermutlich zusammenhängende

höhere genetische Stabilität der bakteriellen Enterosorbenzien *in vivo* wäre die Identifikation höheraffiner Peptidliganden wünschenswert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher verschiedene Versuche unternommen, höheraffine PrP-bindende Peptide zu identifizieren bzw. *de novo* zu generieren.

Die kommerziell erhältliche ‚FliTrx Random Peptide Library‘ (Merck Biosciences/Invitrogen) wurde für die Suche nach neuen, artifiziell PrP-bindenden Peptiden genutzt. ‚FliTrx‘ repräsentiert ein bakterielles Display-System, bei dem die Bakterien nach Induktion der heterologen Proteinexpression zufällige Dodecamer-Peptide als Bestandteil ihrer Flagellen exponieren [210]; die Bakterien-Bibliothek enthielt  $1,77 \times 10^8$  Primärklone. Im ersten Ansatz erfolgte die Selektion PrP-bindender FliTrx-Klone wie vom Hersteller empfohlen auf mit PrP90-231 beschichteten Petrischalen (5 cm Durchmesser). Nach fünf Selektionsrunden konnte hierbei jedoch ebensowenig eine Anreicherung PrP-bindender Klone erreicht werden wie im zweiten Ansatz, bei dem der Selektionsschritt mit Hilfe magnetischer Beads durchgeführt wurde, an die PrP90-231 über seinen Hexahistidin-Tag gekoppelt worden war. Das FliTrx-System wurde bereits erfolgreich für die Identifizierung von Peptiden mit Bindungsspezifität für angiogenetische Marker [211], zur Identifizierung von Antikörper-Epitopen oder -Mimotopen [212] und von Tumor-spezifischen Peptiden [213] eingesetzt. Aus welchem Grund die Experimente in diesem Fall nicht erfolgreich waren, ist schwer zu sagen. Neben der Möglichkeit, dass tatsächlich keine 12-mer Peptide existieren, die eine genügend hohe PrP-Affinität für eine effiziente Immobilisierung von Bakterien an PrP besitzen, ist die wahrscheinlichste Erklärung eine mangelnde Stringenz bei der Entfernung unspezifisch haftender Bakterien im Selektionsprozess. Die flagellare Lokalisation der Zufallspeptide sorgt zwar für eine gute Zugänglichkeit der potentiellen Bindungsstelle, verbietet aber auch rigide Wasch-Schritte. Gerade bei solchen Bakterien, die über ihre Flagellen am immobilisierten PrP90-231 hängen, können Scherkräfte das Abbrechen des Flagellums bewirken.

Ein weiterer experimenteller Ansatz zur Generierung höheraffiner PrP-Ligandenpeptide war der Versuch einer computergestützten molekularen Evolution PrP-bindender Peptide. Hierbei erzeugt eine als ‚Genetischer Algorithmus‘ (GA) bezeichnete Software Bibliotheken von Peptidmutanten, die sich aus den eingegebenen Leitsequenzen durch Rekombinations- und Mutationsprozesse ableiten. Diese Peptide wurden durch Spot-Synthese in Form von festphasengekoppelten Peptidbibliotheken hergestellt; anschließend wurde die Bindung von PrP-680 an die mutierten Peptide quantitativ ausgewertet und in Form einer jedem Peptid zugeordneten Punktzahl ausgedrückt.

Anhand der Rangfolge innerhalb der Elterngeneration wurden dann vom GA durch bevorzugte Auswahl ‚guter‘ Peptide und deren erneute Rekombination und Mutation Filialgenerationen erstellt, die wiederum auf ihre PrP-Bindung hin untersucht wurden. Basierend auf diesem Prinzip konnten in unserer Arbeitsgruppe im Zuge der Evolution



Gangliosid-bindender Peptide bereits herausragende Ergebnisse mit einer linearen Steigerung der Peptid-Ligand-Bindungsaffinität um den Faktor 2-3 pro Generationszyklus erzielt werden (unveröffentlichte Resultate; Dr. Niels Roekendorf, PD Dr. Andreas Frey). Während jedoch bei dem kleinen Gangliosid-Molekül auf mehrere, rekombinierbare Leitmotive mit gleichem Bindungsloкус im Zuckeranteil des Sphingolipids zurückgegriffen werden konnte, war für die im Experiment verwendeten PrP-bindenden Sequenzmotive aus NCAM, PLG und LRP der Ort und/oder der Mechanismus der Bindung am Prionprotein offensichtlich so unterschiedlich, dass durch intramolekulare Rekombinationen ausschließlich nicht PrP-bindende Peptide erzeugt wurden. Bei molekularen Evolutionen, die unter Zufügung von Zufallspeptiden nur auf Grundlage eines (statt mehrerer) Leitmotive mit Hilfe des Genetischen Algorithmus' gestartet wurden, konnte zwar in der ersten Filialgeneration bei einigen ‚Peptid-Nachkommen‘ eine 2-3 fache Steigerung der Signalintensitäten gemessen werden. Ein weiterer linearer oder sogar exponentieller Affinitätszuwachs (relativ zum Leitpeptid) in den Folgegenerationen konnte aber bisher nicht erreicht werden. Hier könnte eventuell eine Optimierung der diversen Evolutionsparameter oder auch eine Anpassung der Peptid-‚Scoring‘-Methode und der Auswahlstringenz des GA Abhilfe schaffen und weitere Verbesserungen der Peptid-Affinität ermöglichen. Aufgrund des hohen Zeitaufwands für eine solche multifaktorielle Parameteroptimierung bedarf ein solcher Prozess jedoch eines über diese Arbeit hinausgehenden Entwicklungszeitraums.

## 7.6 Anwendbarkeit der PrP-spezifischen Enterosorbentien *in vivo*

Um bei einem potentiellen Einsatz bakterieller Enterosorbentien *in vivo* intestinale Epithelien effizient und langfristig vor dem Kontakt mit und der Aufnahme von Prionen zu schützen, müssen die modifizierten Bakterien drei Hauptanforderungen gerecht werden.

Auf der einen Seite muss die PrP-Affinität der exponierten heterologen Domäne hoch genug sein, um im Intestinaltrakt -trotz ‚Störfaktoren‘ wie der Darmperistaltik oder dem Vorhandensein unterschiedlichster Nahrungsbestandteile- eine spezifische Adsorption von PrP und eine längerfristige Persistenz der Bindung zu ermöglichen. Im Zusammenhang hiermit muss für das PrP-adsorbierende bakterielle AIDA-K3-Konstrukt unter geeigneten Sicherheitsvorkehrungen verifiziert werden, dass sich die Affinität der präsentierten Kringle-Domäne nicht auf das in den bisherigen Nachweisverfahren verwendete rekombinante Prionprotein beschränkt, sondern auch das pathogene PrP<sup>Sc</sup>-Konformer umfasst. Ein solcher Nachweis der PrP<sup>Sc</sup>-Bindung durch die modifizierten Bakterien bzw. der Peptidliganden müsste jedoch durch Bindungsstudien an infizierten Zellkulturen oder direkt durch Tierversuche (Schutzexperimente) *in vivo* erfolgen, da der bisherige Stand der Technik keine selektive Reinigung oder Präparation von PrP<sup>Sc</sup> aus infektiösem Material erlaubt. Dass durch

das Kringle 3-Enterosorbens nur das rekombinante PrP gebunden wird, ist allerdings sehr unwahrscheinlich. Zum einen wurde für Plasminogen als physiologischem ‚Kringel 3-Träger‘ eine über die Kringle-Domänen 1-3 vermittelte Bindung an PrP<sup>Sc</sup> ebenso nachgewiesen wie diejenige an PrP<sup>C</sup> [55, 214]. Auch für die PrP-Liganden LRP [71-73] und Bcl-2 [196] wurde die Interaktion mit PrP<sup>Sc</sup> untersucht und eine Bindung bestätigt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die in PrP-defizienten Mäusen erzeugten monoklonalen Antikörper in den meisten Fällen sowohl das zelluläre Prionprotein als auch PrP<sup>Sc</sup>, nie aber ausschließlich PrP<sup>Sc</sup> erkannten, was für das Vorliegen oberflächenexponierter linearer oder auch konformationeller Determinanten in beiden Isoformen spricht, die in weiten Teilen übereinstimmen. Zusammen mit der Tatsache, dass bisher kein Detektionsreagenz mit ausschließlicher Spezifität für das infektiöse Konformer gefunden werden konnte, legt dies nahe, dass Bindungsbereiche in der infektiösen Variante des zellulären PrP auch für die in dieser Arbeit identifizierten linearen Liganden-Peptide zur Verfügung stehen sollten.

Weitere wichtige Faktoren für eine effiziente Enterosorption von Prionen sind die ausreichende Resistenz des PrP-bindenden Bereichs gegenüber intestinalen Proteasen und die genetische Stabilität des Bakteriums, die eine Expression des modifizierten, mit einer heterologen Insertion versehenen AIDA Autotransporters auch in Abwesenheit eines permanenten Selektionsdrucks erlaubt. Für peptidische Insertionen in permissive Loci des AIDA Autotransporters, die auch im hier genutzten Modellsystem mit plasmidvermittelter AIDA-Expression keine nachteiligen Auswirkungen auf das Bakterienwachstum und/oder die AIDA-Expressionsaktivität zeigten, sollte bei Inkorporation der kodierenden Sequenzen in das bakterielle Genom eine hohe Stabilität der Expression erreichbar sein. So verwendeten Kramer *et al.* in einer Immunisierungsstudie einen Salmonella-Vakzinestamm, der über den plasmidkodierten AIDA-Autotransporter ein *Yersinia enterocolitica*-Epitop auf seiner Oberfläche exponierte [143]. Sieben Tage nach intragastraler Gabe der Bakteriensuspension konnte für alle der aus Leber und Milz isolierten Salmonellen die Plasmidpersistenz nachgewiesen werden. Der AIDA Autotransporter an sich, für den *E. coli* bzw. allgemeiner die meisten der gramnegativen Proteobakterien homologe Wirte darstellen, stellt also keinen Selektionsnachteil für die betroffenen Bakterien dar. Inwieweit sich allerdings die wahrscheinlich geringere Translokationseffizienz der Kringle 3-Domäne auf die Lebens- und Konkurrenzfähigkeit seines Wirtes im intestinalen Milieu auswirken würde, müsste nach Insertion des Leserasters in das Wirtsgenom anhand von Kolonisierungsstudien eruiert werden.

Einen geeigneten AIDA-Wirtsstamm für erste Experimente zur Kolonisierungseffizienz und der Stabilität der AIDA-vermittelten Kringle 3-Translokation könnte der *Escherichia coli* Stamm Nissle 1917 (EcN) darstellen. Nissle 1917 wird als probiotisch wirksamer,

apathogener und nicht-invasiver Keim mit guten Kolonisierungseigenschaften seit 1917 in der Humanmedizin verwendet (Mutaflor<sup>®</sup>; vertrieben von Ardeypharm, Herdecke) und zur Behandlung unterschiedlicher enteraler Erkrankungen wie Colitis ulcerosa [215], Morbus Crohn [216] oder von Obstipation [217] eingesetzt. In der Veterinärmedizin ist das Produkt seit 2001 unter dem Namen Ponsocol<sup>®</sup> zugelassen und wird zur Prophylaxe von Diarrhöe bei neugeborenen Kälbern angewendet. In einer kürzlich veröffentlichten Studie [218] konnte gezeigt werden, dass der AIDA Autotransporter in EcN als gramnegativem *E. coli*-Stamm stabil exprimiert werden kann; weiterhin wurde bei Mäusen die nicht-invasive intestinale Kolonisierung nach oraler Gabe der rekombinanten Bakterien und die Persistenz der AIDA-Expression bestätigt. Die effizienteste Ansiedlung von Nissle 1917 findet dabei im Dickdarm statt, hohe Keimzahlen können aber auch im distalen Dünndarm gefunden werden [219], der den postulierten Haupt-Aufnahmeort von Prionen im Zuge der oralen Transmission darstellt [220-224].

Ebenso wie die Problematik der genetischen Stabilität lässt sich die Frage einer ausreichenden Proteolyse-Resistenz des AIDA-Kringle 3 Kontrukts abschließend erst durch *in vivo*-Versuche klären. Experimente *in vitro*, auch wenn sie durch Verwendung muriner Dünndarmlavage statt artifizieller Enzymlysungen an die realen Bedingungen angenähert waren, können das gesamte Spektrum der involvierten Faktoren nur unzureichend darstellen und repräsentieren notwendigerweise nur einen Anhaltspunkt für das Ausmaß der Sensitivität bzw. einen Maßstab für den Vergleich unterschiedlicher Konstrukte. Im Verhältnis zur Nachweisbarkeit des AIDA-exponierten Flag-Reporterpeptids nach Inkubation der Bakterien in Dünndarmlavage besaß das AIDA-K3-Konstrukt eine beeindruckend hohe Stabilität: Während Flag-spezifische Signale sogar in der verdünnt vorliegenden Lavageflüssigkeit so schnell eliminiert wurden, dass eine genaue Bestimmung der Halbwertszeit nicht möglich war und auf maximal 10 Sekunden geschätzt wurde, konnte für AIDA-K3 exprimierende *E. coli* unter den gleichen experimentellen Bedingungen noch nach 20 Minuten eine halbmaximale PrP-Bindung nachgewiesen werden. Es ist anzunehmen, dass unter diesen Bedingungen einer relativ langsam voranschreitenden Degradation zunehmend weitere Aspekte wie das Ausmaß der in dieser Zeitspanne stattfindenden Neuexpression von AIDA-K3 und der hierdurch erfolgende Ersatz abgebauter PrP-bindender Domänen auf der bakteriellen Oberfläche eine Rolle spielen. Weiterhin befinden sich im Darm normalerweise große Mengen von Nahrungsproteinen, die als Konkurrenz-Substrat wirken und so die Heftigkeit des proteolytischen Angriffs auf die Bakterien reduzieren. Das Ausmaß dieses Effekts jedoch ist variabel und vom Füllzustand des Darms und der Art der Nahrung abhängig. Einen Einfluss dürften auch die speziellen Bedingungen im jeweils besiedelten Darmkompartiment bzw. im Mikrohabitat des Wirtsbakteriums besitzen.

Anmerkenswert ist darüber hinaus die Tatsache, dass die gemessene Geschwindigkeit der Abnahme in der PrP- bzw.  $\alpha$ -Flag-Bindungskapazität nicht nur durch die proteolytische Degradation der heterologen Domäne bedingt wird. Auch der oberflächenexponierte Anteil des AIDA-Autotransporters selbst besitzt potentielle Schnittstellen für Darmproteasen. So konnten im  $\beta$ 1 Linkerbereich der AIDA<sup>c</sup>-Translokator-domäne potentielle Schnittstellen für Trypsin (zwischen K<sub>947</sub> und G<sub>948</sub>) und für Chymotrypsin (zwischen Y<sub>950</sub> und L<sub>951</sub>) identifiziert werden [135, 136, 138]; eine Spaltung von AIDA in diesen Positionen führt zur Freisetzung der distal gelegenen Passengerdomäne. Da diese Aminosäurereste jedoch keine Bedeutung für die Translokationsfunktion oder für die PrP-Bindung besitzen, könnten sie durch Mutagenese substituiert werden. Die hohe Stabilität der Kringle 3-Domäne könnte jedoch auch darauf hindeuten, dass die AIDA-internen Schnittstellen durch die vorgelagerte, voluminöse K3-Domäne geschützt werden.

Ob auch für peptidische PrP-Liganden im bakteriellen Display-System eine ausreichende Verdauungsresistenz erreichbar wäre, ist fraglich. Selbst wenn durch die im vorherigen Abschnitt vorgestellte molekulare Evolution hochaffine peptidische Binder kreiert werden können, deutete sich doch in den durchgeführten Alanin-Scans an, dass gerade diejenigen Aminosäurereste, die Angriffsziele der häufigsten Darmproteasen Trypsin und Chymotrypsin darstellen, oft auch gleichzeitig als Hauptmediator der PrP-Bindung fungieren. Dies betrifft insbesondere die aromatischen Aminosäuren Tryptophan (W) und Tyrosin (Y), die in den identifizierten Peptidliganden fast immer als für die Bindung essentiell notwendig charakterisiert werden konnten und daher nur schwer substituierbar sind, die aber ebenfalls eine Chymotrypsin-vermittelte Spaltung bewirken können [225]. Eine eventuelle Lösung dieses Problems könnte die Durchführung einer molekularen Peptid-Evolution mit zwei Optimierungsparametern (PrP-Bindung und Verdauungsstabilität) sein, wobei reine Zufallspeptide als ‚Leitsequenzen‘ dienen könnten. Das Anwendungspotential hochaffiner, aber verdauungslabiler peptidischer Prion-Binder würde sich wahrscheinlich auf ihre Implementation in nichtreplizierende, chemische Enterosorbenzien beschränken; hierbei könnten die Peptide in ihrer proteolyseresistenten Retroinverso-Form und an partikuläre Träger gekoppelt eingesetzt werden. Retroinverso-Peptide repräsentieren eine doppelt spiegelbildliche Darstellung des Originalpeptids und werden aus den nicht proteinogenen D-Aminosäuren aufgebaut, deren Peptidbindung nicht von Darmproteasen angegriffen wird. Die Entwicklung sowie eine permanente Futter- bzw. Nahrungsmittel-Supplementation mit einem solchen Konstrukt würde jedoch einen erheblichen finanziellen Aufwand bedeuten.

## 7.7 Planung weiterführender Studien: ein Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit dem Konstrukt C600-(AIDA-K3) ein effizient PrP-bindendes rekombinantes Bakterium entwickelt werden, welches - vermittelt durch den AIDA Autotransporter - die Kringle 3-Domäne aus murinem Plasminogen oberflächenassoziiert präsentierte. Die Eignung dieses gentechnisch veränderten Bakteriums als prionspezifisches Enterosorbens *in vivo* muss nun, ebenso wie seine Wirksamkeit in der Prävention einer oralen Übertragung Spongiformer Enzephalopathien, durch Kolonisierungsstudien und Schutzexperimente im Mausmodell bestätigt werden. Ein Focus weiterführender Studien soll darüber hinaus die bioinformatisch unterstützte *de novo* Generierung verdauungsstabiler und hochaffiner Peptidliganden des Prionproteins betreffen.

Weitere Untersuchungen in Bezug auf die genauere Analyse des Bindungsmechanismus von PrP<sup>c</sup> mit seinen *in vivo*-Liganden sind ebenfalls geplant. Dies könnte darüber Aufschluss geben, ob die hier identifizierten Liganden-Peptide auch bei der physiologischen Interaktion der entsprechenden Holo-Proteine mit PrP eine Rolle spielen. So konnte im Zuge der Kartierungsexperimente innerhalb der  $\gamma$ 1 Laminin-Untereinheit ein bisher unbekanntes Bindemotiv für PrP90-231 in der konservierten aminoterminalen Domäne VI von Laminin identifiziert werden, dessen funktionelle PrP-Bindung im Laminin-Gesamtprotein überprüft und bezüglich seiner physiologischen Bedeutung analysiert werden soll. Analoge Studien wären auch im Falle des Apoptoseregulators Bcl-2 denkbar.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Alper, T., D.A. Haig, und M.C. Clarke, *The exceptionally small size of the scrapie agent*. Biochem Biophys Res Commun, 1966. 22(3): p. 278-84.
2. Alper, T., W.A. Cramp, et al., *Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid?* Nature, 1967. 214(90): p. 764-6.
3. Griffith, J.S., *Self-replication and scrapie*. Nature, 1967. 215(105): p. 1043-4.
4. Prusiner, S.B., D.F. Groth, et al., *Thiocyanate and hydroxyl ions inactivate the scrapie agent*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. 78(7): p. 4606-10.
5. Prusiner, S.B., M.P. McKinley, et al., *Scrapie agent contains a hydrophobic protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. 78(11): p. 6675-9.
6. Prusiner, S.B., *Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie*. Science, 1982. 216(4542): p. 136-44.
7. Oesch, B., D. Westaway, et al., *A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein*. Cell, 1985. 40(4): p. 735-46.
8. Chesebro, B., R. Race, et al., *Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain*. Nature, 1985. 315(6017): p. 331-3.
9. Caughey, B.W., A. Dong, et al., *Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy*. Biochemistry, 1991. 30(31): p. 7672-80.
10. Gasset, M., M.A. Baldwin, et al., *Perturbation of the secondary structure of the scrapie prion protein under conditions that alter infectivity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(1): p. 1-5.
11. McKinley, M.P., D.C. Bolton, und S.B. Prusiner, *A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion*. Cell, 1983. 35(1): p. 57-62.
12. Mishra, R.S., S. Basu, et al., *Protease-resistant human prion protein and ferritin are cotransported across Caco-2 epithelial cells: implications for species barrier in prion uptake from the intestine*. J Neurosci, 2004. 24(50): p. 11280-90.
13. McKinley, M.P., R.K. Meyer, et al., *Scrapie prion rod formation in vitro requires both detergent extraction and limited proteolysis*. J Virol, 1991. 65(3): p. 1340-51.
14. Brown, D.R., *Molecular advances in understanding inherited prion diseases*. Mol Neurobiol, 2002. 25(3): p. 287-302.
15. Prusiner, S.B., *Scrapie prions*. Annu Rev Microbiol, 1989. 43: p. 345-74.
16. Borchelt, D.R., A. Taraboulos, und S.B. Prusiner, *Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway*. J Biol Chem, 1992. 267(23): p. 16188-99.
17. Taraboulos, A., M. Scott, et al., *Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform*. J Cell Biol, 1995. 129(1): p. 121-32.
18. Bueler, H., A. Aguzzi, et al., *Mice devoid of PrP are resistant to scrapie*. Cell, 1993. 73(7): p. 1339-47.
19. Schatzl, H.M., M. Da Costa, et al., *Prion protein gene variation among primates*. J Mol Biol, 1995. 245(4): p. 362-74.
20. Rudd, P.M., T. Endo, et al., *Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(23): p. 13044-9.
21. Endo, T., D. Groth, et al., *Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein*. Biochemistry, 1989. 28(21): p. 8380-8.

22. Haraguchi, T., S. Fisher, *et al.*, *Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins*. Arch Biochem Biophys, 1989. 274(1): p. 1-13.
23. Stahl, N., D.R. Borchelt, *et al.*, *Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid*. Cell, 1987. 51(2): p. 229-40.
24. Riek, R., S. Hornemann, *et al.*, *NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231)*. FEBS Lett, 1997. 413(2): p. 282-8.
25. Riek, R., G. Wider, *et al.*, *Prion protein NMR structure and familial human spongiform encephalopathies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(20): p. 11667-72.
26. Donne, D.G., J.H. Viles, *et al.*, *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, 1997. 94(25): p. 13452-7.
27. Zahn, R., A. Liu, *et al.*, *NMR solution structure of the human prion protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(1): p. 145-50.
28. Lopez Garcia, F., R. Zahn, *et al.*, *NMR structure of the bovine prion protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(15): p. 8334-9.
29. Shyng, S.L., M.T. Huber, und D.A. Harris, *A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells*. J Biol Chem, 1993. 268(21): p. 15922-8.
30. Marella, M., S. Lehmann, *et al.*, *Filipin prevents pathological prion protein accumulation by reducing endocytosis and inducing cellular PrP release*. J Biol Chem, 2002. 277(28): p. 25457-64.
31. Vey, M., S. Pilkuhn, *et al.*, *Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(25): p. 14945-9.
32. Shyng, S.L., J.E. Heuser, und D.A. Harris, *A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits*. J Cell Biol, 1994. 125(6): p. 1239-50.
33. Shyng, S.L., K.L. Moulder, *et al.*, *The N-terminal domain of a glycolipid-anchored prion protein is essential for its endocytosis via clathrin-coated pits*. J Biol Chem, 1995. 270(24): p. 14793-800.
34. Gauczynski, S., J.M. Peyrin, *et al.*, *The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein*. Embo J, 2001. 20(21): p. 5863-75.
35. Chen, S.G., D.B. Teplow, *et al.*, *Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases*. J Biol Chem, 1995. 270(32): p. 19173-80.
36. Nieznanski, K., M. Rutkowski, *et al.*, *Proteolytic processing and glycosylation influence formation of porcine prion protein complexes*. Biochem J, 2005. 387(Pt 1): p. 93-100.
37. Jimenez-Huete, A., P.M. Lievens, *et al.*, *Endogenous proteolytic cleavage of normal and disease-associated isoforms of the human prion protein in neural and non-neural tissues*. Am J Pathol, 1998. 153(5): p. 1561-72.
38. Kretzschmar, H.A., S.B. Prusiner, *et al.*, *Scrapie prion proteins are synthesized in neurons*. Am J Pathol, 1986. 122(1): p. 1-5.
39. Herms, J., T. Tings, *et al.*, *Evidence of presynaptic location and function of the prion protein*. J Neurosci, 1999. 19(20): p. 8866-75.
40. Fournier, J.G., F. Escaig-Haye, *et al.*, *Ultrastructural localization of cellular prion protein (PrP<sub>c</sub>) in synaptic boutons of normal hamster hippocampus*. C R Acad Sci III, 1995. 318(3): p. 339-44.

41. Oidtmann, B., D. Simon, *et al.*, *Identification of cDNAs from Japanese pufferfish (Fugu rubripes) and Atlantic salmon (Salmo salar) coding for homologues to tetrapod prion proteins.* FEBS Lett, 2003. 538(1-3): p. 96-100.
42. Strumbo, B., S. Ronchi, *et al.*, *Molecular cloning of the cDNA coding for Xenopus laevis prion protein.* FEBS Lett, 2001. 508(2): p. 170-4.
43. Simonic, T., S. Duga, *et al.*, *cDNA cloning of turtle prion protein.* FEBS Lett, 2000. 469(1): p. 33-8.
44. Gabriel, J.M., B. Oesch, *et al.*, *Molecular cloning of a candidate chicken prion protein.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(19): p. 9097-101.
45. Bueler, H., M. Fischer, *et al.*, *Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein.* Nature, 1992. 356(6370): p. 577-82.
46. Tobler, I., S.E. Gaus, *et al.*, *Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein.* Nature, 1996. 380(6575): p. 639-42.
47. Collinge, J., M.A. Whittington, *et al.*, *Prion protein is necessary for normal synaptic function.* Nature, 1994. 370(6487): p. 295-7.
48. Burns, C.S., E. Aronoff-Spencer, *et al.*, *Copper coordination in the full-length, recombinant prion protein.* Biochemistry, 2003. 42(22): p. 6794-803.
49. Brown, D.R., K. Qin, *et al.*, *The cellular prion protein binds copper in vivo.* Nature, 1997. 390(6661): p. 684-7.
50. Brown, D.R., B.S. Wong, *et al.*, *Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase.* Biochem J, 1999. 344 Pt 1: p. 1-5.
51. Rachidi, W., D. Vilette, *et al.*, *Expression of prion protein increases cellular copper binding and antioxidant enzyme activities but not copper delivery.* J Biol Chem, 2003. 278(11): p. 9064-72.
52. Schmitt-Ulms, G., G. Legname, *et al.*, *Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein.* J Mol Biol, 2001. 314(5): p. 1209-25.
53. Welzl, H. und O. Stork, *Cell adhesion molecules: key players in memory consolidation?* News Physiol Sci, 2003. 18: p. 147-50.
54. Santuccione, A., V. Sytnyk, *et al.*, *Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth.* J Cell Biol, 2005. 169(2): p. 341-54.
55. Fischer, M.B., C. Roeckl, *et al.*, *Binding of disease-associated prion protein to plasminogen.* Nature, 2000. 408(6811): p. 479-83.
56. Graner, E., A.F. Mercadante, *et al.*, *Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis.* Brain Res Mol Brain Res, 2000. 76(1): p. 85-92.
57. Zhang, L., D. Seiffert, *et al.*, *Plasminogen has a broad extrahepatic distribution.* Thromb Haemost, 2002. 87(3): p. 493-501.
58. Carroll, P.M., S.E. Tsirka, *et al.*, *The mouse tissue plasminogen activator gene 5' flanking region directs appropriate expression in development and a seizure-enhanced response in the CNS.* Development, 1994. 120(11): p. 3173-83.
59. Melchor, J.P. und S. Strickland, *Tissue plasminogen activator in central nervous system physiology and pathology.* Thromb Haemost, 2005. 93(4): p. 655-60.
60. Epple, G., W.D. Schleuning, *et al.*, *Prion protein stimulates tissue-type plasminogen activator-mediated plasmin generation via a lysine-binding site on kringle 2.* J Thromb Haemost, 2004. 2(6): p. 962-8.



61. Epple, G., K. Langfeld, *et al.*, *Both lysine-clusters of the NH<sub>2</sub>-terminal prion-protein fragment PrP<sup>23-110</sup> are essential for t-PA mediated plasminogen activation.* Thromb Haemost, 2004. 91(3): p. 465-72.
62. Ellis, V., M. Daniels, *et al.*, *Plasminogen activation is stimulated by prion protein and regulated in a copper-dependent manner.* Biochemistry, 2002. 41(22): p. 6891-6.
63. Engel, J., *Laminins and other strange proteins.* Biochemistry, 1992. 31(44): p. 10643-51.
64. Mecham, R.P., *Receptors for laminin on mammalian cells.* Faseb J, 1991. 5(11): p. 2538-46.
65. Beck, K., I. Hunter, und J. Engel, *Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein.* Faseb J, 1990. 4(2): p. 148-60.
66. Liesi, P., A. Narvanen, *et al.*, *Identification of a neurite outgrowth-promoting domain of laminin using synthetic peptides.* FEBS Lett, 1989. 244(1): p. 141-8.
67. Liesi, P., I. Seppala, und E. Trenkner, *Neuronal migration in cerebellar microcultures is inhibited by antibodies against a neurite outgrowth domain of laminin.* J Neurosci Res, 1992. 33(1): p. 170-6.
68. Graner, E., A.F. Mercadante, *et al.*, *Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein.* FEBS Lett, 2000. 482(3): p. 257-60.
69. Rao, C.N., V. Castronovo, *et al.*, *Evidence for a precursor of the high-affinity metastasis-associated murine laminin receptor.* Biochemistry, 1989. 28(18): p. 7476-86.
70. Castronovo, V., A.P. Claysmith, *et al.*, *Biosynthesis of the 67 kDa high affinity laminin receptor.* Biochem Biophys Res Commun, 1991. 177(1): p. 177-83.
71. Gauczynski, S., D. Nikles, *et al.*, *The 37-kDa/67-kDa Laminin Receptor Acts as a Receptor for Infectious Prions and Is Inhibited by Polysulfated Glycanes.* J Infect Dis, 2006. 194(5): p. 702-9.
72. Leucht, C., S. Simoneau, *et al.*, *The 37 kDa/67 kDa laminin receptor is required for PrP(Sc) propagation in scrapie-infected neuronal cells.* EMBO Rep, 2003. 4(3): p. 290-5.
73. Morel, E., T. Andrieu, *et al.*, *Bovine prion is endocytosed by human enterocytes via the 37 kDa/67 kDa laminin receptor.* Am J Pathol, 2005. 167(4): p. 1033-42.
74. Bounhar, Y., Y. Zhang, *et al.*, *Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis.* J Biol Chem, 2001. 276(42): p. 39145-9.
75. Chiesa, R., P. Piccardo, *et al.*, *Bax deletion prevents neuronal loss but not neurological symptoms in a transgenic model of inherited prion disease.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(1): p. 238-43.
76. Park, S.K., S.I. Choi, *et al.*, *Differential expression of Bax and Bcl-2 in the brains of hamsters infected with 263K scrapie agent.* Neuroreport, 2000. 11(8): p. 1677-82.
77. Kurschner, C. und J.I. Morgan, *The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system.* Brain Res Mol Brain Res, 1995. 30(1): p. 165-8.
78. Gajdusek, D.C. und V. Zigas, *Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population.* N Engl J Med, 1957. 257(20): p. 974-8.
79. Bernoulli, C., J. Siegfried, *et al.*, *Danger of accidental person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by surgery.* Lancet, 1977. 1(8009): p. 478-9.
80. Davanipour, Z., L. Goodman, *et al.*, *Possible modes of transmission of Creutzfeldt-Jakob disease.* N Engl J Med, 1984. 311(24): p. 1582-3.
81. Llewelyn, C.A., P.E. Hewitt, *et al.*, *Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion.* Lancet, 2004. 363(9407): p. 417-21.

82. Brown, P., R.G. Will, *et al.*, *Bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease: background, evolution, and current concerns*. *Emerg Infect Dis*, 2001. 7(1): p. 6-16.
83. Wilesmith, J.W., J.B. Ryan, und W.D. Hueston, *Bovine spongiform encephalopathy: case-control studies of calf feeding practices and meat and bonemeal inclusion in proprietary concentrates*. *Res Vet Sci*, 1992. 52(3): p. 325-31.
84. Zeidler, M. und J.W. Ironside, *The new variant of Creutzfeldt-Jakob disease*. *Rev Sci Tech*, 2000. 19(1): p. 98-120.
85. Scott, M.R., R. Will, *et al.*, *Compelling transgenetic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(26): p. 15137-42.
86. Knight, R., *The relationship between new variant Creutzfeldt-Jakob disease and bovine spongiform encephalopathy*. *Vox Sang*, 1999. 76(4): p. 203-8.
87. Collins, S.J., V. Lewis, *et al.*, *Extended period of asymptomatic prion disease after low dose inoculation: assessment of detection methods and implications for infection control*. *Neurobiol Dis*, 2005. 20(2): p. 336-46.
88. Baier, M., S. Norley, *et al.*, *Prion diseases: infectious and lethal doses following oral challenge*. *J Gen Virol*, 2003. 84(Pt 7): p. 1927-9.
89. Thackray, A.M., M.A. Klein, *et al.*, *Chronic subclinical prion disease induced by low-dose inoculum*. *J Virol*, 2002. 76(5): p. 2510-7.
90. Prusiner, S.B., M. Scott, *et al.*, *Transgenetic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication*. *Cell*, 1990. 63(4): p. 673-86.
91. Scott, M., D. Groth, *et al.*, *Propagation of prions with artificial properties in transgenic mice expressing chimeric PrP genes*. *Cell*, 1993. 73(5): p. 979-88.
92. Weissmann, C., H. Bueler, *et al.*, *Susceptibility to scrapie in mice is dependent on PrPC*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1994. 343(1306): p. 431-3.
93. Telling, G.C., M. Scott, *et al.*, *Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from humans to transgenic mice expressing chimeric human-mouse prion protein*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(21): p. 9936-40.
94. Heppner, F.L., A.D. Christ, *et al.*, *Transepithelial prion transport by M cells*. *Nat Med*, 2001. 7(9): p. 976-7.
95. Neutra, M.R., A. Frey, und J.P. Kraehenbuhl, *Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization*. *Cell*, 1996. 86(3): p. 345-8.
96. Huang, F.P., C.F. Farquhar, *et al.*, *Migrating intestinal dendritic cells transport PrP(Sc) from the gut*. *J Gen Virol*, 2002. 83(Pt 1): p. 267-71.
97. Glatzel, M. und A. Aguzzi, *PrP(C) expression in the peripheral nervous system is a determinant of prion neuroinvasion*. *J Gen Virol*, 2000. 81(Pt 11): p. 2813-21.
98. Glatzel, M., F.L. Heppner, *et al.*, *Sympathetic innervation of lymphoreticular organs is rate limiting for prion neuroinvasion*. *Neuron*, 2001. 31(1): p. 25-34.
99. Mabbott, N.A. und G.G. MacPherson, *Prions and their lethal journey to the brain*. *Nat Rev Microbiol*, 2006. 4(3): p. 201-11.
100. Bosque, P.J., *Bovine spongiform encephalopathy, chronic wasting disease, scrapie, and the threat to humans from prion disease epizootics*. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2002. 2(6): p. 488-95.
101. Hill, A.F. und J. Collinge, *Subclinical prion infection in humans and animals*. *Br Med Bull*, 2003. 66: p. 161-70.

102. Belay, E.D. und L.B. Schonberger, *The public health impact of prion diseases*. Annu Rev Public Health, 2005. 26: p. 191-212.
103. Moore, R.A., I. Vorberg, und S.A. Priola, *Species barriers in prion diseases--brief review*. Arch Virol Suppl, 2005(19): p. 187-202.
104. Riesner, D., *The prion theory: background and basic information*. Contrib Microbiol, 2001. 7: p. 7-20.
105. Masters, C.L., D.C. Gajdusek, und C.J. Gibbs, Jr., *Creutzfeldt-Jakob disease virus isolations from the Gerstmann-Straussler syndrome with an analysis of the various forms of amyloid plaque deposition in the virus-induced spongiform encephalopathies*. Brain, 1981. 104(3): p. 559-88.
106. Prusiner, S.B., D. Groth, et al., *Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(22): p. 10608-12.
107. Williamson, R.A., D. Peretz, et al., *Circumventing tolerance to generate autologous monoclonal antibodies to the prion protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(14): p. 7279-82.
108. Souan, L., R. Margalit, et al., *Self prion protein peptides are immunogenic in Lewis rats*. J Autoimmun, 2001. 17(4): p. 303-10.
109. Nikles, D., P. Bach, et al., *Circumventing tolerance to the prion protein (PrP): vaccination with PrP-displaying retrovirus particles induces humoral immune responses against the native form of cellular PrP*. J Virol, 2005. 79(7): p. 4033-42.
110. Andrievskaia, O., H. McRae, et al., *Generation of antibodies against bovine recombinant prion protein in various strains of mice*. Clin Vaccine Immunol, 2006. 13(1): p. 98-105.
111. Sigurdsson, E.M., D.R. Brown, et al., *Immunization delays the onset of prion disease in mice*. Am J Pathol, 2002. 161(1): p. 13-7.
112. Schwarz, A., O. Kratke, et al., *Immunisation with a synthetic prion protein-derived peptide prolongs survival times of mice orally exposed to the scrapie agent*. Neurosci Lett, 2003. 350(3): p. 187-9.
113. Muller, S., R. Kehm, et al., *Testing the possibility to protect bovine PrPC transgenic Swiss mice against bovine PrPSc infection by DNA vaccination using recombinant plasmid vectors harboring and expressing the complete or partial cDNA sequences of bovine PrPC*. Virus Genes, 2005. 30(2): p. 279-96.
114. Vaerman, J.P., *[Effector mechanisms of IgA]*. Ann Biol Clin (Paris), 1984. 42(1): p. 61-70.
115. McSweegan, E., D.H. Burr, und R.I. Walker, *Intestinal mucus gel and secretory antibody are barriers to Campylobacter jejuni adherence to INT 407 cells*. Infect Immun, 1987. 55(6): p. 1431-5.
116. Phalipon, A., A. Cardona, et al., *Secretory component: a new role in secretory IgA-mediated immune exclusion in vivo*. Immunity, 2002. 17(1): p. 107-15.
117. Goni, F., E. Knudsen, et al., *Mucosal vaccination delays or prevents prion infection via an oral route*. Neuroscience, 2005. 133(2): p. 413-21.
118. Bade, S., M. Baier, et al., *Intranasal immunization of Balb/c mice against prion protein attenuates orally acquired transmissible spongiform encephalopathy*. Vaccine, 2006. 24(9): p. 1242-53.
119. Cupit, G.C. und A.R. Temple, *Gastrointestinal decontamination in the management of the poisoned patient*. Emerg Med Clin North Am, 1984. 2(1): p. 15-28.

120. de Vries, I., G.A. van Zoelen, *et al.*, [Measures to reduce absorption in the treatment of intoxications]. *Ned Tijdschr Geneeskd*, 2005. 149(53): p. 2964-8.
121. Harvey, R.B., L.F. Kubena, *et al.*, Prevention of aflatoxicosis by addition of hydrated sodium calcium aluminosilicate to the diets of growing barrows. *Am J Vet Res*, 1989. 50(3): p. 416-20.
122. Phillips, T.D., A.B. Sarr, und P.G. Grant, Selective chemisorption and detoxification of aflatoxins by phyllosilicate clay. *Nat Toxins*, 1995. 3(4): p. 204-13; discussion 221.
123. Spotti, M., M.L. Fracchiolla, *et al.*, Aflatoxin B1 binding to sorbents in bovine ruminal fluid. *Vet Res Commun*, 2005. 29(6): p. 507-15.
124. Williams, J.H., T.D. Phillips, *et al.*, Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clin Nutr*, 2004. 80(5): p. 1106-22.
125. Takeda, T., K. Yoshino, *et al.*, In vitro assessment of a chemically synthesized Shiga toxin receptor analog attached to chromosorb P (Synsorb Pk) as a specific absorbing agent of Shiga toxin 1 and 2. *Microbiol Immunol*, 1999. 43(4): p. 331-7.
126. Castagliuolo, I., J.T. LaMont, *et al.*, A receptor decoy inhibits the enterotoxigenic effects of *Clostridium difficile* toxin A in rat ileum. *Gastroenterology*, 1996. 111(2): p. 433-8.
127. Paton, A.W., R. Morona, und J.C. Paton, A new biological agent for treatment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections and dysentery in humans. *Nat Med*, 2000. 6(3): p. 265-70.
128. Steidler, L., W. Hans, *et al.*, Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science*, 2000. 289(5483): p. 1352-5.
129. Braat, H., P. Rottiers, *et al.*, A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2006. 4(6): p. 754-9.
130. Henderson, I.R., F. Navarro-Garcia, *et al.*, Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004. 68(4): p. 692-744.
131. Desvaux, M., N.J. Parham, und I.R. Henderson, *The autotransporter secretion system*. 2004.
132. Jose, J., J. Kramer, *et al.*, Absence of periplasmic DsbA oxidoreductase facilitates export of cysteine-containing passenger proteins to the *Escherichia coli* cell surface via the Iga beta autotransporter pathway. *Gene*, 1996. 178(1-2): p. 107-10.
133. Ruiz-Perez, F., R. Leon-Kempis, *et al.*, Expression of the *Plasmodium falciparum* immunodominant epitope (NANP)(4) on the surface of *Salmonella enterica* using the autotransporter MisL. *Infect Immun*, 2002. 70(7): p. 3611-20.
134. Kjaergaard, K., H. Hasman, *et al.*, Antigen 43-mediated autotransporter display, a versatile bacterial cell surface presentation system. *J Bacteriol*, 2002. 184(15): p. 4197-204.
135. Maurer, J., J. Jose, und T.F. Meyer, Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1997. 179(3): p. 794-804.
136. Konieczny, M.P., M. Suhr, *et al.*, Cell surface presentation of recombinant (poly-) peptides including functional T-cell epitopes by the AIDA autotransporter system. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2000. 27(4): p. 321-32.
137. Benz, I. und M.A. Schmidt, Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 1989. 57(5): p. 1506-11.
138. Konieczny, M.P.J., I. Benz, *et al.*, Modular organization of the AIDA autotransporter translocator: the N-terminal beta1-domain is surface-exposed and stabilizes the transmembrane beta2-domain. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2001. 80(1): p. 19-34.

139. Suhr, M., I. Benz, und M.A. Schmidt, *Processing of the AIDA-I precursor: removal of AIDA<sub>c</sub> and evidence for the outer membrane anchoring as a beta-barrel structure*. Mol Microbiol, 1996. 22(1): p. 31-42.
140. Lattemann, C.T., J. Maurer, et al., *Autodisplay: functional display of active beta-lactamase on the surface of Escherichia coli by the AIDA-I autotransporter*. J Bacteriol, 2000. 182(13): p. 3726-33.
141. Casali, N., M. Konieczny, et al., *Invasion activity of a Mycobacterium tuberculosis peptide presented by the Escherichia coli AIDA autotransporter*. Infect Immun, 2002. 70(12): p. 6846-52.
142. Rizos, K., C.T. Lattemann, et al., *Autodisplay: efficacious surface exposure of antigenic UreA fragments from Helicobacter pylori in Salmonella vaccine strains*. Infect Immun, 2003. 71(11): p. 6320-8.
143. Kramer, U., K. Rizos, et al., *Autodisplay: development of an efficacious system for surface display of antigenic determinants in Salmonella vaccine strains*. Infect Immun, 2003. 71(4): p. 1944-52.
144. Rozen, S. und H. Skaletsky, *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers*. Methods Mol Biol, 2000. 132: p. 365-86.
145. Konieczny, M., *Strukturelle und funktionelle Charakterisierung des AIDA Autotransporter Translokators*. Diss. rer. nat., 1999, Münster.
146. Lockwood, J.S. und H.T. Randall, *The place of electrolyte studies in surgical patients*. Bull N Y Acad Med, 1949. 25: p. 228-239.
147. Frank, R., *Spot-Synthesis: An easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support*. Tetrahedron, 1992. 48: p. 9217-9232.
148. Frey, A. und M.A. Schmidt, *Peptidarrays auf Cellulosemembranen*, in *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*, G. Schrimpf, Editor. 2002, 3. Aufl., Spektrum Akad. Verl.: Heidelberg/Berlin. p. 433-459.
149. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. 227(5259): p. 680-5.
150. Dechert, U., *Gelelektrophoresen*, in *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*, G. Schrimpf, Editor. 2002, 3. Aufl., Spektrum Akad. Verl.: Heidelberg/Berlin. p. 39-61.
151. Frey, A., *Protein-Blotting und Nachweis membran-gebundener Proteine*, in *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*, G. Schrimpf, Editor. 2002, 3. Aufl., Spektrum Akad. Verl.: Heidelberg/Berlin. p. 343-352.
152. Towbin, H., T. Staehelin, und J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. 76(9): p. 4350-4.
153. Stothard, P., *The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences*. Biotechniques, 2000. 28(6): p. 1102, 1104.
154. Frey, A., J. Di Canzio, und D. Zurakowski, *A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays*. J Immunol Methods, 1998. 221(1-2): p. 35-41.
155. *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*, Editor G. Schrimpf. Vol. 3. Aufl. 2002, 3. Aufl., Heidelberg/Berlin: Spektrum Akad. Verl.
156. Hanahan, D., J. Jessee, und F.R. Bloom, *Plasmid transformation of Escherichia coli and other bacteria*. Methods Enzymol, 1991. 204: p. 63-113.

157. Boetel, T., S. Bade, *et al.*, *Prion protein 90-231 contains a streptavidin-binding motif*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. 349(1): p. 296-302.
158. Gill, S.C. und P.H. von Hippel, *Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data*. *Anal Biochem*, 1989. 182(2): p. 319-26.
159. Gorris, H.H., *Entwicklung eines Hochdurchsatz-Proteolysetests*. Diss. rer. nat., 2005, Lübeck.
160. Frey, A., B. Meckelein, *et al.*, *A stable and highly sensitive 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays*. *J Immunol Methods*, 2000. 233(1-2): p. 47-56.
161. Beckett, D., E. Kovaleva, und P.J. Schatz, *A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation*. *Protein Sci*, 1999. 8(4): p. 921-9.
162. Hundt, C., J.M. Peyrin, *et al.*, *Identification of interaction domains of the prion protein with its 37- kDa/67-kDa laminin receptor*. *Embo J*, 2001. 20(21): p. 5876-86.
163. Kurschner, C. und J.I. Morgan, *Analysis of interaction sites in homo- and heteromeric complexes containing Bcl-2 family members and the cellular prion protein*. *Brain Res Mol Brain Res*, 1996. 37(1-2): p. 249-58.
164. Klauser, T., J. Pohlner, und T.F. Meyer, *Selective extracellular release of cholera toxin B subunit by Escherichia coli: dissection of Neisseria Iga beta-mediated outer membrane transport*. *Embo J*, 1992. 11(6): p. 2327-35.
165. Praus, M., G. Kettelgerdes, *et al.*, *Stimulation of plasminogen activation by recombinant cellular prion protein is conserved in the NH2-terminal fragment PrP23-110*. *Thromb Haemost*, 2003. 89(5): p. 812-9.
166. Ryou, C., S.B. Prusiner, und G. Legname, *Cooperative binding of dominant-negative prion protein to kringle domains*. *J Mol Biol*, 2003. 329(2): p. 323-33.
167. Stumpe, S., R. Schmid, *et al.*, *Identification of OmpT as the protease that hydrolyzes the antimicrobial peptide protamine before it enters growing cells of Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1998. 180(15): p. 4002-6.
168. Leytus, S.P., L.K. Bowles, *et al.*, *Activation of plasminogen to plasmin by a protease associated with the outer membrane of Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. 78(3): p. 1485-9.
169. Baneyx, F. und G. Georgiou, *In vivo degradation of secreted fusion proteins by the Escherichia coli outer membrane protease OmpT*. *J Bacteriol*, 1990. 172(1): p. 491-4.
170. Hanke, C., J. Hess, *et al.*, *Processing by OmpT of fusion proteins carrying the HlyA transport signal during secretion by the Escherichia coli hemolysin transport system*. *Mol Gen Genet*, 1992. 233(1-2): p. 42-8.
171. Ma, T.Y., D.L. Dyer, und H.M. Said, *Human intestinal cell line Caco-2: a useful model for studying cellular and molecular regulation of biotin uptake*. *Biochim Biophys Acta*, 1994. 1189(1): p. 81-8.
172. Fleet, J.C., L. Wang, *et al.*, *Gene expression profiling of Caco-2 BBe cells suggests a role for specific signaling pathways during intestinal differentiation*. *Physiol Genomics*, 2003. 13(1): p. 57-68.
173. Cronan, J.E., Jr., *Biotination of proteins in vivo. A post-translational modification to label, purify, and study proteins*. *J Biol Chem*, 1990. 265(18): p. 10327-33.
174. Leon-Del-Rio, A., D. Leclerc, *et al.*, *Isolation of a cDNA encoding human holocarboxylase synthetase by functional complementation of a biotin auxotroph of Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(10): p. 4626-30.

175. Dupuis, L., A. Leon-Del-Rio, *et al.*, *Clustering of mutations in the biotin-binding region of holocarboxylase synthetase in biotin-responsive multiple carboxylase deficiency*. Hum Mol Genet, 1996. 5(7): p. 1011-6.
176. Tissot, G., R. Douce, und C. Alban, *Evidence for multiple forms of biotin holocarboxylase synthetase in pea (Pisum sativum) and in Arabidopsis thaliana: subcellular fractionation studies and isolation of a cDNA clone*. Biochem J, 1997. 323 ( Pt 1): p. 179-88.
177. Kwon, K. und D. Beckett, *Function of a conserved sequence motif in biotin holoenzyme synthetases*. Protein Sci, 2000. 9(8): p. 1530-9.
178. Hytönen, V., *The Avidin Protein Family. Properties of Family Members and Engineering of Novel Biotin-Binding Protein Tools*. Diss. rer. nat., 2005. Jyväskylä.
179. Schatz, P.J., *Use of peptide libraries to map the substrate specificity of a peptide-modifying enzyme: a 13 residue consensus peptide specifies biotinylation in Escherichia coli*. Biotechnology (N Y), 1993. 11(10): p. 1138-43.
180. Chapman-Smith, A., T.D. Mulhern, *et al.*, *The C-terminal domain of biotin protein ligase from E. coli is required for catalytic activity*. Protein Sci, 2001. 10(12): p. 2608-17.
181. Owens, G.C., G.M. Edelman, und B.A. Cunningham, *Organization of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) gene: alternative exon usage as the basis for different membrane-associated domains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. 84(1): p. 294-8.
182. Castellino, F.J. und S.G. McCance, *The kringle domains of human plasminogen*. Ciba Found Symp, 1997. 212: p. 46-60; discussion 60-5.
183. Cao, Y., R. Cao, und N. Veitonmaki, *Kringle structures and antiangiogenesis*. Curr Med Chem Anticancer Agents, 2002. 2(6): p. 667-81.
184. Castellino, F.J. und V.A. Ploplis, *Structure and function of the plasminogen/plasmin system*. Thromb Haemost, 2005. 93(4): p. 647-54.
185. Nielsen, P.K. und Y. Yamada, *Identification of cell-binding sites on the Laminin alpha 5 N-terminal domain by site-directed mutagenesis*. J Biol Chem, 2001. 276(14): p. 10906-12.
186. Simoneau, S., S. Haik, *et al.*, *Different isoforms of the non-integrin laminin receptor are present in mouse brain and bind PrP*. Biol Chem, 2003. 384(2): p. 243-6.
187. Baloui, H., Y. von Boxberg, *et al.*, *Cellular prion protein/laminin receptor: distribution in adult central nervous system and characterization of an isoform associated with a subtype of cortical neurons*. Eur J Neurosci, 2004. 20(10): p. 2605-2616.
188. Shmakov, A.N., J. Bode, *et al.*, *Diverse patterns of expression of the 67-kD laminin receptor in human small intestinal mucosa: potential binding sites for prion proteins?* J Pathol, 2000. 191(3): p. 318-22.
189. Rieger, R., F. Edenhofer, *et al.*, *The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells*. Nat Med, 1997. 3(12): p. 1383-8.
190. Castronovo, V., G. Taraboletti, und M.E. Sobel, *Functional domains of the 67-kDa laminin receptor precursor*. J Biol Chem, 1991. 266(30): p. 20440-6.
191. Kazmin, D.A., T.R. Hoyt, *et al.*, *Phage display mapping for peptide 11 sensitive sequences binding to laminin-1*. J Mol Biol, 2000. 298(3): p. 431-45.
192. Reed, J.C., *Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities*. Cell Death Differ, 2006. 13(8): p. 1378-86.
193. Mikhailov, V., M. Mikhailova, *et al.*, *Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane*. J Biol Chem, 2001. 276(21): p. 18361-74.

194. Murphy, K.M., U.N. Streips, und R.B. Lock, *Bcl-2 inhibits a Fas-induced conformational change in the Bax N terminus and Bax mitochondrial translocation*. J Biol Chem, 2000. 275(23): p. 17225-8.
195. Roucou, X., P.N. Giannopoulos, et al., *Cellular prion protein inhibits proapoptotic Bax conformational change in human neurons and in breast carcinoma MCF-7 cells*. Cell Death Differ, 2005. 12(7): p. 783-95.
196. Rambold, A.S., M. Miesbauer, et al., *Association of Bcl-2 with misfolded prion protein is linked to the toxic potential of cytosolic PrP*. Mol Biol Cell, 2006. 17(8): p. 3356-68.
197. Yin, X.M., Z.N. Oltvai, und S.J. Korsmeyer, *BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax*. Nature, 1994. 369(6478): p. 321-3.
198. Tao, W., C. Kurschner, und J.I. Morgan, *Modulation of cell death in yeast by the Bcl-2 family of proteins*. J Biol Chem, 1997. 272(24): p. 15547-52.
199. Perini, F., R. Vidal, et al., *PrP27-30 is a normal soluble prion protein fragment released by human platelets*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. 223(3): p. 572-7.
200. Prasad, P.D., H. Wang, et al., *Cloning and functional expression of a cDNA encoding a mammalian sodium-dependent vitamin transporter mediating the uptake of pantothenate, biotin, and lipoate*. J Biol Chem, 1998. 273(13): p. 7501-6.
201. Zeng, W.Q., E. Al-Yamani, et al., *Biotin-responsive basal ganglia disease maps to 2q36.3 and is due to mutations in SLC19A3*. Am J Hum Genet, 2005. 77(1): p. 16-26.
202. Leon-Del-Rio, A., A. Velazquez, et al., *Association of pancreatic biotinidase activity and intestinal uptake of biotin and biocytin in hamster and rat*. Ann Nutr Metab, 1990. 34(5): p. 266-72.
203. Ramanathan, S., S. Pooyan, et al., *Targeting the sodium-dependent multivitamin transporter (SMVT) for improving the oral absorption properties of a retro-inverso Tat nonapeptide*. Pharm Res, 2001. 18(7): p. 950-6.
204. Picariello, L., S.C. Sala, et al., *A comparison of methods for the analysis of low abundance proteins in desmoid tumor cells*. Anal Biochem, 2006. 354(2): p. 205-12.
205. Schutz, R., Y. Altschuler, et al., *Highly sensitive detection of proteins on membranes with near-infrared fluorescence*. On-line posters, [www.licor.com](http://www.licor.com), 2000.
206. McCarter, J.D., D. Stephens, et al., *Substrate specificity of the Escherichia coli outer membrane protease OmpT*. J Bacteriol, 2004. 186(17): p. 5919-25.
207. Kadokura, H., F. Katzen, und J. Beckwith, *Protein disulfide bond formation in prokaryotes*. Annu Rev Biochem, 2003. 72: p. 111-35.
208. Veiga, E., V. de Lorenzo, und L.A. Fernandez, *Probing secretion and translocation of a beta-autotransporter using a reporter single-chain Fv as a cognate passenger domain*. Mol Microbiol, 1999. 33(6): p. 1232-43.
209. Veiga, E., V. de Lorenzo, und L.A. Fernandez, *Structural tolerance of bacterial autotransporters for folded passenger protein domains*. Mol Microbiol, 2004. 52(4): p. 1069-80.
210. Lu, Z., K.S. Murray, et al., *Expression of thioredoxin random peptide libraries on the Escherichia coli cell surface as functional fusions to flagellin: a system designed for exploring protein-protein interactions*. Biotechnology (N Y), 1995. 13(4): p. 366-72.
211. Brown, C.K., R.A. Modzelewski, et al., *A novel approach for the identification of unique tumor vasculature binding peptides using an E. coli peptide display library*. Ann Surg Oncol, 2000. 7(10): p. 743-9.



212. Tripp, B.C., Z. Lu, *et al.*, *Investigation of the 'switch-epitope' concept with random peptide libraries displayed as thioredoxin loop fusions*. *Protein Eng*, 2001. 14(5): p. 367-77.
213. Zitzmann, S., S. Kramer, *et al.*, *Identification of a new prostate-specific cyclic peptide with the bacterial FliTrx system*. *J Nucl Med*, 2005. 46(5): p. 782-5.
214. Maissen, M., C. Roeckl, *et al.*, *Plasminogen binds to disease-associated prion protein of multiple species*. *Lancet*, 2001. 357(9273): p. 2026-8.
215. Kruis, W., E. Schutz, *et al.*, *Double-blind comparison of an oral Escherichia coli preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis*. *Aliment Pharmacol Ther*, 1997. 11(5): p. 853-8.
216. Malchow, H.A., *Crohn's disease and Escherichia coli. A new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease?* *J Clin Gastroenterol*, 1997. 25(4): p. 653-8.
217. Mollenbrink, M. und E. Bruckschen, *[Treatment of chronic constipation with physiologic Escherichia coli bacteria. Results of a clinical study of the effectiveness and tolerance of microbiological therapy with the E. coli Nissle 1917 strain (Mutaflor)]*. *Med Klin (Munich)*, 1994. 89(11): p. 587-93.
218. Westendorf, A.M., F. Gunzer, *et al.*, *Intestinal immunity of Escherichia coli NISSLE 1917: a safe carrier for therapeutic molecules*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2005. 43(3): p. 373-84.
219. Rao, S., S. Hu, *et al.*, *Toward a live microbial microbicide for HIV: commensal bacteria secreting an HIV fusion inhibitor peptide*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(34): p. 11993-8.
220. Andreoletti, O., P. Berthon, *et al.*, *Early accumulation of PrP(Sc) in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie*. *J Gen Virol*, 2000. 81(Pt 12): p. 3115-26.
221. van Keulen, L.J., M.E. Vromans, und F.G. van Zijderveld, *Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep*. *Apmis*, 2002. 110(1): p. 23-32.
222. Terry, L.A., S. Marsh, *et al.*, *Detection of disease-specific PrP in the distal ileum of cattle exposed orally to the agent of bovine spongiform encephalopathy*. *Vet Rec*, 2003. 152(13): p. 387-92.
223. Beekes, M. und P.A. McBride, *Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie*. *Neurosci Lett*, 2000. 278(3): p. 181-4.
224. Joiner, S., J.M. Linehan, *et al.*, *High levels of disease related prion protein in the ileum in variant Creutzfeldt-Jakob disease*. *Gut*, 2005. 54(10): p. 1506-8.
225. Keil, B., *Specificity of proteolysis*. 1992, Springer Verlag: Berlin-Heidelberg-New York. p. 335 ff.

## 9 Anhang

### 9.1 Sequenzdaten

#### 9.1.1 PrP90-231 und PrP101-231

Dargestellt ist die DNA-Sequenz und die deduzierte Aminosäuresequenz des rekombinanten murinen Prionproteins PrP90-231. Die aminoterminalen 21 Aminosäuren (fett gedruckt) sind vektorkodiert (pET-15b) und beinhalten den His-Tag, der zur affinitätschromatographischen Reinigung der rekombinanten PrP-Fragmente genutzt wurde. Der in der Deletionsmutante PrP101-231 fehlende Bereich der Aminosäuren 90-100 (Nummerierung nach SwissProt Accession No. AAH06703) wurde umrahmt. Ein Stern (\*) bezeichnet das Stopcodon.

<b>M</b>	<b>G</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>H</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>G</b>	<b>L</b>	<b>V</b>	<b>P</b>	<b>R</b>	<b>G</b>	<b>S</b>	<b>H</b>	<b>M</b>	21
ATG	GGC	AGC	AGC	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAC	AGC	AGC	GGC	CTG	GTG	CCG	CGC	GGC	AGC	CAT	ATG	63
<b>Q</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>H</b>	<b>N</b>	<b>Q</b>	<b>W</b>	<b>N</b>	<b>K</b>	<b>P</b>	<b>S</b>	<b>K</b>	<b>P</b>	<b>K</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>L</b>	<b>K</b>	<b>H</b>	42
CAA	GGA	GGG	GGT	ACC	CAT	AAT	CAG	TGG	AAC	AAG	CCC	AGC	AAA	CCA	AAA	ACC	AAC	CTC	AAG	CAT	126
<b>V</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>V</b>	<b>V</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>L</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>Y</b>	<b>M</b>	<b>L</b>	<b>G</b>	<b>S</b>	63
GTG	GCA	GGG	GCT	GCG	GCA	GCT	GGG	GCA	GTA	GTG	GGG	GGC	CTT	GGT	GGC	TAC	ATG	CTG	GGG	AGC	189
<b>A</b>	<b>M</b>	<b>S</b>	<b>R</b>	<b>P</b>	<b>M</b>	<b>I</b>	<b>H</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>N</b>	<b>D</b>	<b>W</b>	<b>E</b>	<b>D</b>	<b>R</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>R</b>	<b>E</b>	<b>N</b>	84
GCC	ATG	AGC	AGG	CCC	ATG	ATC	CAT	TTT	GGC	AAC	GAC	TGG	GAG	GAC	CGC	TAC	TAC	CGT	GAA	AAC	252
<b>M</b>	<b>Y</b>	<b>R</b>	<b>Y</b>	<b>P</b>	<b>N</b>	<b>Q</b>	<b>V</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>R</b>	<b>P</b>	<b>V</b>	<b>D</b>	<b>Q</b>	<b>Y</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>Q</b>	<b>N</b>	<b>N</b>	105
ATG	TAC	CGC	TAC	CCT	AAC	CAA	GTG	TAC	TAC	AGG	CCA	GTG	GAT	CAG	TAC	AGC	AAC	CAG	AAC	AAC	315
<b>F</b>	<b>V</b>	<b>H</b>	<b>D</b>	<b>C</b>	<b>V</b>	<b>N</b>	<b>I</b>	<b>T</b>	<b>I</b>	<b>K</b>	<b>Q</b>	<b>H</b>	<b>T</b>	<b>V</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>K</b>	<b>G</b>	126
TTC	GTG	CAC	GAC	TGC	GTC	AAT	ATC	ACC	ATC	AAG	CAG	CAC	ACG	GTC	ACC	ACC	ACC	ACC	AAG	GGG	378
<b>E</b>	<b>N</b>	<b>F</b>	<b>T</b>	<b>E</b>	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>V</b>	<b>K</b>	<b>M</b>	<b>M</b>	<b>E</b>	<b>R</b>	<b>V</b>	<b>V</b>	<b>E</b>	<b>Q</b>	<b>M</b>	<b>C</b>	<b>V</b>	<b>T</b>	147
GAG	AAC	TTC	ACC	GAG	ACC	GAT	GTG	AAG	ATG	ATG	GAG	CGC	GTG	GTG	GAG	CAG	ATG	TGC	GTC	ACC	441
<b>Q</b>	<b>Y</b>	<b>Q</b>	<b>K</b>	<b>E</b>	<b>S</b>	<b>Q</b>	<b>A</b>	<b>Y</b>	<b>Y</b>	<b>D</b>	<b>G</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	*					164
CAG	TAC	CAG	AAG	GAG	TCC	CAG	GCC	TAT	TAC	GAC	GGG	AGA	AGA	TCC	AGC	TAA					492

## 9.1.2 Der AIDA Autotransporter

### 9.1.2.1 Nativer AIDA Autotransporter

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz des nativen AIDA Autotransporters (SwissProt Accession No. CAA46156) aus *Escherichia coli*.

```

1  mnkaysiiws hsrqawivas elarghgfv1 akntllvlav vstignafav nisgtvssgg
61 tvssgetqiv ysgrgnsnat vnsGGtqivn nggkttattv nssgsqnvgt sgatistivn
121 sgg1qrvssg gvasatnlsG gaqniynlgh asntvifsgg nqtifsggit dstnissggq
181 qrvssggvas nttinssgaq nilseegais thissggnqy isaganatet ivnsggfqrv
241 nsgavatgtv lsggtqnvss ggsaistsvy nsgvqtvfag atvtdttvns ggnqnissgg
301 ivsettvnvs gtqniysggs alsanikgsq ivnsegtain tlvsdgggyqh irnggiasgt
361 ivnqsgyvni ssggyaesti insggtlr1vl sdgyargtil nnsgrenvsn ggvsynamin
421 tggnyqiysd geataaivnt sgfqrinsgg tapvqnsvvv trtvssaakp fdaevyssgk
481 qtvylwrgiw ysnfltavws mfpgtasgan vnlsgrlnaf agnvvgtiln qegrqyvysg
541 atatstvgnn egreyvlsGg itdgtvlnsG glqavssgkGk asatvinegg aqfvydggqv
601 tgtniknggt irvdsgasal nialssgnl ftstgat1pe lttmaalsvs qnhasnivle
661 nggllrvtsG gtatdttvns agrlriddgG tingtttina dgivagtniq ndgnfilnla
721 enydfetels gsgvlvkdnt gimtyagt1t qaqqvkvkng giifdsavvn admavnqnay
781 inisdqatin gs1vnnngsiv innsiingni tndadlsfgt akllsatvng slvnnkniil
841 nptkesagnt ltvsn1ygtGp gsvisl1ggv1 egd1nsltdrl vvkGntsgqs divyvnedgs
901 ggqtrdgini isveGnsdae fslknrvvag aydytlqkgn esgtdnkGwy ltshlptsdt
961 rqyrpengsy atnmalansl flmdlnerkq framsdntqp esasvwmkit ggissgk1nd
1021 gqnktttnqf inqlggdiyk fhaeqlgdft lgimggyana kgktinytsn kaarntldgy
1081 svgyvgtwyq ngenatglfa etwmqynwfn asvkgdglee ekynlnglta sagggyn1nv
1141 htwtspedit gefwlqphlq avwmgvtpdt hqedngtvvq gagknniqtk agiraswkvk
1201 stldkdtgrr frpyieanwi hnthefgvkm sddsqllsG r1nqgeiktgi egvitqnlsv
1261 nggvayqagg hgsnaisgal gikysf

```

#### Farkodierung:

- Türkis: Signalsequenz  
(In pMK90 enthalten)
- Blau: im modifizierten, pMK90-kodierten AIDA Autotransporter enthaltener Anteil der AIDA I-Passengerdomäne ( $\alpha$ -Domäne)
- Schwarz: nicht im modifizierten AIDA Autotransporter enthaltener Anteil der AIDA I-Passengerdomäne ( $\alpha$ -Domäne)  
(In pMK90 ersetzt durch die ‚Multiple Cloning Site‘)
- Rot: AIDA<sup>c</sup>-Translokator-domäne ( $\beta$ -Domäne)  
(In pMK90 vollständig enthalten)

### 9.1.2.2 modifizierter AIDA Autotransporter (pMK90)

Dargestellt ist die DNA-Sequenz und die deduzierte Aminosäuresequenz des pMK90-kodierten modifizierten AIDA Autotransporters ohne die aminoternale Signalsequenz. Der translozierte und auf der bakteriellen Oberfläche präsentierte Anteil von AIDA wurde unterstrichen. Die artifiziell eingefügte ‚Multiple Cloning Site‘ wurde in Großbuchstaben (DNA-Sequenz) bzw. fett gedruckt (Aminosäuresequenz) dargestellt. (Rot: Substitution Alanin (A) → Isoleucin (I))

```

1 V N I S G P V S M A R D M Y P R G N G Y
1 gtaaatatatttcagggcCCGGTGTCCATGGCCCCGGGACATGTATCCACGTGGGAATGGGTAC
21 R L D R V N N N G S I V I N N S I I N G
61 CGTCTAGACCGggtgaataacaatggaagcattgtcattaataacagcattataaacggy
41 N I T N D A D L S F G T A K L L S A T V
121 aatattacgaatgatgctgacttaagcttttggtacagcaaagctgctctctgctacagtg
61 N G S L V N N K N I I L N P T K E S I G
181 aatggtagtcttggttaataacaaaaatcattcttaacctacaaaaagaaagtataggt
81 N T L T V S N Y T G T P G S V I S L G G
241 aatactcttaccggtgtcaaattatactgggacaccgggaagtggtatttctcttggtggt
101 V L E G D N S L T D G R L V V K G N T S G
301 gtgcttgaaggagataattcacttacggaccgtctggtggtgaaaggtaaacctctggt
121 Q S D I V Y V N E D G S G G Q T R D G I
361 caaagtgacatcgtttatgtcaatgaagatggcagtggtggtcagacgagagatggtatt
141 N I I S V E G N S D A E F S L K N R V V
421 aatattatctctgtagagggaaattctgatgcagaattctctctgaagaaccgctagtt
161 A G A Y D Y T L Q K G N E S G T D N K G
481 gccggagcttatgattacacactgcagaaaggaaacgagagtggtgacagataataagga
181 W Y L T S H L P T S D T R Q Y R P E N G
541 tggtatttaaccagtcattctccacatctgataccggcaatacagaccggagaacgga
201 S Y A T N M A L A N S L F L M D L N E R
601 agttatgctaccaatattggcactggctaactcactggttcctcatggatttgaatgagcgt
221 K Q F R A M S D N T Q P E S A S V W M K
661 aagcaattcagggccatgagtgataatacacagcctgagtgctgcatccgtgtggatgaag
241 I T G G G I S S G K L N D G Q N K T T T N
721 atcactggaggaataagctctggttaagcttaagcgggcaaaataaaacaacaaccaat
261 Q F I N Q L G G D I Y K F H A E Q L G D
781 cagtttatcaatcagctcgggggggatatttataaattccatgctgaacaactgggtgat
281 F T L G I M G G Y A N A K G K T I N Y T
841 tttaccttagggattatgggaggatacgcgaatgcaaaaggtaaaacgataaattacacg
301 S N K A A R N T L D G Y S V G V Y G T W
901 agcaacaaagctgccagaaacacactggatggttattctgtcgggggtatacggtagctgg
321 Y Q N G E N A T G L F A E T W M Q Y N W
961 tatcagaatggggaaaatgcaacagggctctttgctgaaacttggatgcaatataactgg
341 F N A S V K G D G L E E E K Y N L N G L
1021 tttaatgcatcagtgaaaggtgacggactggaagaagaaaaatataatctgaatggttta
361 T A S A G G G Y N L N V H T W T S P E G
1081 accgcttctgcaggtgggggatataacctgaatgtgcacacatggacatcacctgaagga
381 I T G E F W L Q P H L Q A V W M G V T P
1141 ataacaggtgaattctggttacagcctcatttgcaggctgtctggatgggggttacaccg
401 D T H Q E D N G T V V Q G A G K N N I Q
1201 gatacacatcaggaggataacggaacgggtggtgcagggagcagggaaaaataatattcag
421 T K A G I R A S W K V K S T L D K D T G
1261 acaaagcaggtattcgtgcatcctggaaggtgaaaagcaccctggataaggataaccggg
441 R R F R P Y I E A N W I H N T H E F G V
1321 cggaggttccgtccgtatatagaggcaaacctggatccataaacactcatgaatttgggtt
461 K M S D D S Q L L S G S R N Q G E I K T
1381 aaaatgagtgatgacagccagttggtgctcaggttagccgaaatcagggagagataaagaca
481 G I E G V I T Q N L S V N G G V A Y Q A
1441 ggtattgaaggggtgattactcaaaacttgtcagtgatggcggagtcgcatatcaggga
501 G G H G S N A I S G A L G I K Y S F *
1501 ggaggtcacgggagcaatgccatctccggagcactggggataaaatacagcttctga

```

### 9.1.2.3 Heterologe AIDA-Konstrukte

Dargestellt ist jeweils nur der Anteil, der das heterologe Insert (fett gedruckt) enthält (aa 1-29 des modifizierten AIDA Autotransporters aus Abschnitt 9.1.2.2). Die DNA-Sequenz der ‚Multiple Cloning Site‘ und die Sequenz des jeweiligen inserierten DNA-Fragments wurde in Großbuchstaben dargestellt. Aminosäurereste, die bei Klonierung der Inserts zum Erhalt des Leserasters eingefügt wurden, sind unterstrichen.

#### AIDA (ohne Insert)

(Unterstrichen: Restriktionsschnittstellen XmaI und KpnI)

```

1 V N I S G P V S M A R D M Y P R G N G Y
1 gtaaataatttcaggcCCGGTGTCCATGGCCCGGGACATGTATCCACGTGGGAATGGGTAC

21 R L D R V N N N G ...
61 CGTCTAGACCGggtgaataacaatgga ...

```

#### AIDA-Flag

```

1 V N I S G P V S M A R D Y K D D D D K A
1 gtaaataatttcaggcCCGGTGTCCATGGCCCGGGATTATAAAGATGACGATGACAAAAGCG

21 Y R L D R V N N N G ...
61 TACCGTCTAGACCGggtgaataacaatgga ...

```

#### AIDA-NCAM

```

1 V N I S G P V S M A R E W K S L G E E S
1 gtaaataatttcaggcCCGGTGTCCATGGCCCGGGAATGGAAAAGCCTGGGCGAAGAAAAGC

21 W H F T W Y D A Y R L D R V N N N G ...
61 TGGCATTTTACCTGGTATGATGCGTACCGTCTAGACCGggtgaataacaatgga ...

```

#### AIDA-PLG

```

1 V N I S G P V S M A R W C Y T T D S Q L
1 gtaaataatttcaggcCCGGTGTCCATGGCCCGGTGGTGTATACCACCGATAGCCAGCTG

21 R W E Y C E I P Y R L D R V N N N G ...
61 CGCTGGGAATATTGCGAAATTCCGTACCGTCTAGACCGggtgaataacaatgga ...

```

**AIDA-mPLG**

1 V N I S G P V S M A R **W A Y T T D S Q L**  
 1 gtaaataatttcaggcCCGGTGTCCATGGCCCCGGTGGGCTATACCACCGATAGCCAGCTG  
 21 **R W E Y A E I P Y R L D R V N N N G ...**  
 61 CGCTGGGAATATGCCGAAATTCGGTACCGTCTAGACCGggtgaataacaatgga ...

**AIDA-LRP**

1 V N I S G P V S M A R **D I P C N N K G A**  
 1 gtaaataatttcaggccccgggtgcatggccccgggacattccgtgcaacaacaaaggcgcg  
 21 **H S V G L M W W M L A R Y R L D R V N N**  
 61 catagcggtgggctgatgtggtggatgctggcgcggtaccgtctagaccgggtgaataac  
 41 N G ...  
 121 aatgga ...

**AIDA-K3**

1 V N I S G P V S M A R **G P T Y Q C L K G**  
 1 gtaaataatttcaggcCCGGTGTCCATGGCCCCGGGgcccacactaccaatgtctgaaagga  
 21 **R G E N Y R G T V S V T V S G K T C Q R**  
 61 agaggtgaaaattaccgagggaccgtgtctgtcaccgtgtctgggaaaacctgtcagcgc  
 41 **W S E Q T P H R H N R T P E N F P C K N**  
 121 tggagtgagcaaaccctcataggcacaacaggacaccagaaaatttcccctgcaaaaat  
 61 **L E E N Y C R N P D G E T A P W C Y T T**  
 181 ctggaagagaactactgcccgaaccagatggagaaactgctccctggtgctataccact  
 81 **D S Q L R W E Y C E I P S C E S W Y R L**  
 241 gacagccagctgaggtgggagtactgtgagattccatcctgcgagtcctGGTACCGTCTA  
 101 D R V N N N G ...  
 301 GACCGggtgaataacaatgga ...

### 9.1.3 Aminosäuresequenzen der PrP-Liganden

#### NCAM-180 (SwissProt Accession No. P13595)

Bereiche mit Affinität für PrP90-231 wurden unterstrichen; Kernmotive sind zusätzlich fett gedruckt.

```

1 mlrtkdliwt lfflgtavsl qvdivpsqge isvgeskffl cqvagdakdk diswfspnge
61 klspnqqrisk vvwnddsst ltiynanidd agiykcvvta edgtqseatv nvkifqklmf
121 knaptpqefk egedavivcd vvsslpptii wkhkgrdvil kkdvrfivls nnylqirgik
181 ktdegtyrce grilargein fkdiqvivnv pptvqarqsi vnatanlgqs vtlvcdadgf
241 peptmswtkd gepieneeed ersrsvsds sevtirnvdn ndeaeyvcia enkageqdas
301 ihlkvfakpk ityvenqtam eleeqvltlc easgdpipsi twrtstrnis seeqlddghm
361 vvrsharvss ltlksiqyrd ageymctasn tigqdsqsid lefqyapklq gpvavytweg
421 nqvnitcevf aypsatiswf rdgqllpssn ysnikiyntp sasylevtpd sendfgnync
481 tavnrigqes lefilvqadt psspsidrve pysstaqvqf depeatggvp ilkykaewks
541 lgeeswhfkw ydakeanmeg ivtinglkpe trysvrlaal ngkglgeisa atefktqpvv
601 epsapklegq mgedgnsikv nliqddggs pirhylvkyr alasewkpei rlpsgsdhvm
661 lksldwnaey evyvvaenqq gkskaahfvf rtsaqptaip angsptagls tgaivgiliv
721 ifvlllvvmd itcyflnkcq llmciavnlc gkagpgakgk dmeegkaafs kdeskepive
781 vrteeertpn hdggkhtepn ettpltel padttatved mlpsvttvtt nsdtitetfa
841 taqnsptset tlttssiapp attvpdsnsv pagqatpskg vtasssspas apkvaplvdl
901 sdtptsapsa snlsstvlan qgavlspsstp asagetskap paskaspapt ptpagaaspl
961 aavaapatda pqakqepast kgpdppeptqp gtvknppeaa tapaspkska attnpsqged
1021 lkmdegnfkt pdidlakdvf aalgsprpat gasgqasela pspadsavpp apaktekqpv
1081 etkseppese akpaptevtkt vpndatqtke neska

```

aa 1-19	Signalsequenz
aa 20-711	extrazellulärer Bereich mit:
	aa 39-107      lg 1-Domäne
	aa 120-192    lg 2-Domäne
	aa 218-303    lg 3-Domäne
	aa 309-402    lg 4-Domäne
	aa 410-496    lg 5-Domäne
	aa 501-596    FN3-Domäne 1
	aa 605-685    FN3-Domäne 2
aa 712-729	Transmembran-Domäne
aa 730-1115	cytoplasmatischer Bereich

**Plasminogen (SwissProt Accession No. P20918)**

Bereiche mit Affinität für PrP90-231 wurden unterstrichen; die fünf Kringle-Domänen wurden fett gedruckt.

```

1 mdhkevillf llllkpgqgd sldgyistqg aslfsltkqkq laaggvsdcl akcegetdfv
61 crsfqyhske qqcvimaens ktssiirmrd vilfekrvyl secktgigng yrgtmsrtks
121 gvacqkwgat fphvpnyssp thpnegleen ycrnpndeq gpwcyttddp krydycnipe
181 ceecmycsg ekyegkiskt msgldcqawd sqsphahgyi pakfpsknlk mnycrnpdge
241 prpwcfttdp tkrweycdip rcttppppps ptyqclkgrg enyrgtvsvt vsgktcqrws
301 eqtphrhrt penfpcknle enycrnpdge tapwcyttds qlrweyceip scessaspdq
361 sdssvppeeq tpvvqecyqs dgqsyrgtss ttitgkkcqs waamfphrhs ktpenfpdag
421 lemnycrnpd gdkgpwcytt dpsvrweycn lkrcsetggs vvelptvsqe psgpsdsetd
481 cmygngkdyr gktavtaagt pcqgwaaqep hrhsiftppt npraglekny crnpdgdvng
541 pwcyttnprk lydycdiplc asassfecgk pqvepkkcpg rvvggcvanp hswpwqislr
601 trftgqhfcg gtliapewvl taahclekss rpefykvilg aheeyirgsd vqeisvakli
661 lepnnrdial lklsrpatit dkvipaclps pnymvadrti cyitgwgetq gtfgagrke
721 aqlpvienkv cnrveylnnr vkstelcagq laggvdscqg dsggplvcfe kdkyilqgvt
781 swglgcarpn kpgvyvrvsr fvdwieremr nn

```

aa 1-19	Signalsequenz	
aa 103-181	Kringle-Domäne 1	} K1-4: Angiostatin
aa 185-262	Kringle-Domäne 2	
aa 275-352	Kringle-Domäne 3	
aa 377-454	Kringle-Domäne 4	
aa 481-560	Kringle-Domäne 5	
aa 582-807	Serinprotease-Domäne	



**Laminin  $\gamma$ -1 Kette (SwissProt Accession No. P02468)**

Bereiche mit Affinität für PrP90-231 wurden unterstrichen; Kernmotive sind zusätzlich fett gedruckt. Das von Graner *et al.* [56] postulierte PrP-bindende Motiv (aa 1575-1584) wurde durch eine gestrichelte Linie hervorgehoben.

```

1  mtgggraala lqprgrlwpl lavlaavagc vraamdecad eggrpqrcomp efvnaafnvt
61  vvatntcgtp peeycvqtgv tgvtkschlc dagqqhlqhg aaflddynnq adttwwqsqt
121 mlagvqypns inltlhlqka fdityvrlkf htsrpesfai ykrtredqpw ipyqyyssqsc
181 entyskanrg firtggdeqq alctdefdsi spltggnvaf stlegprsay nfdnspvlqe
241 wvtatdirvt lnrlntfgde vfnepkvlks yyyaisdfav ggrckcngha secvknfcdk
301 lmcnckhnty gvdcekclpf fndrpwrrat aesaseslpc dcngrsqecy fdpelyrstg
361 hgghctncrd ntdgakcerc renffrlgnt eacspchcsp vgslstqcds ygrcsckpgv
421 mgdkcdrcqp gfhslteagc rpcscdlrgs tdecnvetgr cvckdnvegf ncerckpgfff
481 nlessnpkgc tpcfcfghss vctnavgysv ydisstfqid edgwrveqrd gseaslewss
541 drqdiavid syfpryfiap vkflgnqvlv yqgnlsfsfr vdrdrtrlsa edlvlegagl
601 rvsvpliaqg nsypsettvk yifrlheatd ypwrpalspf efqkllnnlt sikirgtyse
661 rtagylddvt lqsarpgpgv patwvesctc pvgyggqfce tclpgyrret pslgpyspcv
721 lctcnghset cdpetgvcdc rdntagphce kcsdgyygds tlgtssdcqp cpcpggssca
781 ivpktkevvc thcptgtagk rcelcddgyf gdplgsngpv rlcrcpcqnd nidpnavgnc
841 nrltgeclkc iyntagfygd rckegffgnp lapnpadkck acacnpygtv qqqsscnpvt
901 gqcqclphvs grdcgtcdpg yynlqsgqgc ercdchalgs tngqcdirtg qcecqpgitg
961 qhcercetnh fgfgpegckp cdchhegsls lqckddgrce cregfvgnrc dqceenyfyn
1021 rswpgcqecp acyrlvkdka aehrvklqel eslianlgtg ddmvtdqafe drlkeaerev
1081 tdllreaqev kdvdqnlmdr lqrvnsslhs qisrlqnirn tieetgilae rarsrveste
1141 qlieiasrel ekakmaaanv sitqpestge pnnmtllae arrlaerhkg eaddivrvak
1201 tanetsaeay nlllrtlage nqtaleieel nrkyeqakni sqdleqqaar vheeakragd
1261 kaveiyasva qltpvdseal eneankikke aadldrlidq klkdyedlre dmrgehevk
1321 nllkkgkaeq qtadqllara daakalaea akkgrstlqe andilnnlkd fdrdrvndnkt
1381 aaealrrip ainrtiaean ektreaqlal gnaaadatae knkaheaeri asavqknats
1441 tkadaertfg evtdldnevn gmlrqleeae nelkrkqdda dqdmmmmagma sqaaqeaeln
1501 arkaknsvss llsqlnnlld qlgqltdvdl nklneiagsl nkakdemkas dldrkvdsle
1561 searkqeaai mdynrdiaei ikdihnledi kktlptgcf ntpsiekp

```

aa 1-33	Signalsequenz
aa 42-282	LamNT-Domäne (laminin N-terminal domain, Domäne VI)
aa 283-1028	laminin EGF-like domains 1-11 (enthält Domänen III-V)
aa 1034-1594	coiled-coil Region (enthält Domänen I und II)

**Laminin Rezeptor Precursor (SwissProt Accession No. AAB22299)**

Bereiche mit Affinität für PrP90-231 wurden unterstrichen; Kernmotive sind zusätzlich fett gedruckt.

```

1 msgaldvlqm keedvlkfla agthlggtnl dfqmeqyiyk rksdgiyiin lkrtwekl11
61 aaraivaien padvsvissr ntggravlkf aaatgatpia grftpgtftn qiqaafrepr
121 llvtdprad hqplteasyv nlptialcnt dsplryvdia ipcnnkgahs vglmwwmlar
181 evlrmrgtis rehpwevmpd lyfyrdpeei gkeeqaaaek avtkeeflge wtapapefta
241 tqpevadwse gvqvpsvpiq qfptedwsaq patedwsaap taqatewvga ttdws

```

**Bcl-2 (SwissProt Accession No. P10417)**

Bereiche mit Affinität für PrP90-231 wurden unterstrichen; Kernmotive sind zusätzlich fett gedruckt.

```

1 maqagrtgyd nreivmkyih yklsqrgyew dagdadaapl gaaptpgifs fqpesnmpa
61 vhremaarts plrplvatag palsvppcv hltlrragdd fsrryrdfa emssqlh1tp
121 ftargrfatv veelfrdgvn wgrivaffef ggvmcvesvn remsplvdni alwmteylnr
181 hlhtwiqdnq gwdafvelyg psmrplfdfs wslsktllsl alvgacitlg aylghk

```

aa 10-30	BH 4	} Bcl-2 homology (BH) Domänen
aa 90-104	BH 3	
aa 133-152	BH 1	
aa 184-199	BH 2	
aa 209-230	potentielle Transmembrandomäne	

## 9.2 Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäure
Abb.	Abbildung
A. bidest	zweifach destilliertes Wasser
Acm	Acetamidomethyl
ad	bis zu
AIDA	adhesin involved in diffuse adherence
ANOVA	Analyse der Varianz
Aun	Aminoundecansäure
BCA	Bicinchoninsäure
Boc	tertiär-Butoxycarbonyl (t-Boc)
BSA	Bovines Serumalbumin
BSA-680	BSA, mit Alexa Fluor 680 gekoppelt
BSE	engl.: Bovine Spongiform Encephalopathy
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
ca.	circa
CJD	engl.: Creutzfeld-Jakob Disease
C-Terminus	Carboxyterminus
CWD	engl.: Chronic Wasting Disease
Da	Dalton
DOL	engl.: degree of labeling; Derivatisierungsgrad
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	engl.: enzyme-linked immunosorbent assay
<i>et al.</i>	und andere
FACS	engl.: fluorescence activated cell sorter
FFI	Fatale Familiäre Insomnie
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FSE	engl.: Feline Spongiform Encephalopathy
$\lambda$	Wellenlänge
$\gamma$ m	engl.: goat anti-mouse antibody; Ziege anti-Maus Antikörper
$\gamma$ m-680	Ziege anti-Maus Antikörper, mit Alexa Fluor 680 markiert
$\gamma$ r	engl.: goat anti-rabbit antibody; Ziege anti-Kaninchen Antikörper
$\gamma$ r-680	Ziege anti-Kaninchen Antikörper, mit Alexa Fluor 680 markiert
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom

---

h	Stunde
HRP	engl.: horseradish peroxidase; Meerrettichperoxidase
HWZ	Halbwertszeit
ic	engl.: inclusion bodies; Einschlusskörperchen
Ig	Immunglobulin
K3	Kringle 3-Domäne aus murinem Plasminogen
LRP	37 kDa laminin receptor precursor
MCS	engl.: multiple cloning site
MW	Molekulargewicht
MWCO	engl.: molecular weight cut off; Molekulargewichtsausschluss
NCAM	engl.: neural cell adhesion molecule
NHS	N-Hydroxy-Succinimidyl
Ni-NTA	engl.: Nickel-Nitrilo-Triacetic Acid; Nickel-Nitrilo-Triessigsäure
N-Terminus	Aminoterminus
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
OtBu	tertiär-Butylester
p.a.	zur Analyse
Pbf	2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PI	Proteaseinhibitor
PLG	Plasminogen
Prion	engl.: proteinaceous infectious particle
PrP	Prionprotein
PrP <sup>c</sup>	zelluläres Prionprotein
PrP <sup>sc</sup>	pathogenes, infektiöses Konformer („Scrapie“-Form) des Prionproteins
PrP90-231	rekombinantes, murines PrP (aa 90-231)
PrP101-231	rekombinantes, murines PrP (aa 101-231)
PrP-680	PrP90-231, mit Alexa Fluor 680 gekoppelt
PrP-Fam	PrP90-231, mit 5-/6-Carboxyfluorescein gekoppelt
RT	Raumtemperatur
U	engl.: units; Einheit
ÜN	über Nacht
s.	siehe
SA	Streptavidin
SA-680	Streptavidin, mit Alexa Fluor 680 markiert

---

SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SE	Spongiforme Enzephalopathie
SIF	simulierte Intestinalflüssigkeit
Tab.	Tabelle
TME	engl.: Transmissible Mink Encephalopathy
Trt	Trityl
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
% (v/v)	Volumen pro Volumen
% (w/v)	Gewicht pro Volumen
6H4	monoklonaler Anti-PrP Antikörper 6H4

Aminosäuren wurden nach dem Einbuchstaben- oder Dreibuchstaben-Code benannt. Gewichts- und andere Einheiten wurden nach dem SI-System benannt. Als Einheitenpräfixe wurden die SI-Präfixe verwendet. Die abgekürzten Bezeichnungen von Chemikalien und Puffern wurden, soweit im Text verwendet, im Abschnitt 3 erwähnt.

## **Ich bedanke mich...**

... sehr herzlich bei meiner Referentin Prof. Dr. Dr. Sivia Bulfone-Paus und bei Herrn Prof. Dr. Thomas Roeder für die Übernahme des Korreferats

... bei meinem Betreuer PD Dr. Andreas Frey für die Bereitstellung des Themas, die vielen Diskussionen und Hilfestellungen und für sein Engagement

... bei Steffen für seine Unterstützung bei Prion-Fragen, seine Hilfsbereitschaft und für das Korrekturlesen dieser Arbeit

... bei Barbara Frey für die viele Arbeit beim Korrigieren diverser Manuskripte und für hilfreiche Vorschläge

... bei Hanne, Imke und Heidi und natürlich auch bei Denise, Witali, Iris, Marie-Luise, Björn und Kerstin für die tatkräftige Unterstützung beim praktischen Teil der Arbeit

... bei unserer ‚Chemiker-Fraktion‘ Niels, Naho und Steffen für die geduldige Hilfe bei chemischen Fragestellungen und für praktische Tips und Erläuterungen

... bei Prof. Dr. M. Alexander Schmidt für die Bereitstellung des pMK90-Plasmids und des anti-AIDA Serums; ebenso bei Dr. Michael Baier für den PrP-Vektor

... bei Dr. Martin Ernst, Dr. Kathleen Marienfeld und Renate Bergmann für die Nutzung des FACS, die engagierte Hilfestellung bei der Bedienung und bei der Reparatur des Geräts

... bei PD Dr. Buko Lindner für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen

... bei Katrin und Hanne für die lustige Fahrgemeinschaft, für die Oldenburger Stories und dafür, dass ich jetzt zumindest ein Police-Album auswendig kann

... bei Imke für die Kutschfahrten und Ausritte und bei Heidi für die ulkigen Geschichten

... bei Hans-Heiner für die Aufklärung der Plattenbindung

... bei Verena, Fabian und Steffen für die lustige Zeit in Boston und/oder NYC

... überhaupt bei der gesamten aktuellen und ehemaligen Muclmm-Besetzung für die tolle Atmosphäre, die Hilfsbereitschaft und nicht zuletzt für die Spieleabende, die Wasserski-Ausflüge, die ‚Bastelstunden‘ in diversen Aufenthaltsräumen und für den letzten Platz im Borstel-Cup

Last but not least möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich lange Jahre begleitet, unterstützt und motiviert haben. Und natürlich bei Rossi, meinem Schatz, für seine Liebe und für seine Geduld in den letzten anstrengenden Monaten, für die Beschaffung von Nahrungsmitteln und die klaglose Übernahme meiner Haushaltspflichten.

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Ferner erkläre ich, dass ich nicht anderweitig versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

Borstel, den 30.10.2006

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Thurid Boetel  
Geburtstag/-ort: 18.08.1975, Osnabrück  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

## Schulbildung

1982-1986: Grundschule Tostedt  
1986-1988: Orientierungsstufe Tostedt  
1988-1995: Allgemeines Gymnasium Tostedt  
05/1995: Abitur

## Studium

10/1995-04/2001: Studium der Biologie (Diplom) an der Christian-Albrechts-Universität (CAU) zu Kiel mit den Schwerpunkten Molekularbiologie, Biochemie und Mikrobiologie  
10/1997: Diplom-Vorprüfung  
04/1999-06/1999: Semesterarbeit  
„Etablierung einer Multiplex-nested PCR zur Analyse hypervariabler Loci der Glykoproteine UL55 und UL75 des humanen Cytomegalievirus“  
02/2000: Diplom-Hauptprüfung  
03/2000-03/2001: Diplomarbeit:  
„Klonierung und Expression chimärer Proteine des Masernvirus“

## Berufserfahrung

04/2001-10/2002: Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung *Genomics* (Mermaid Pharmaceuticals GmbH, Hamburg)

## Promotion

seit 01/2003: Promotion in der Laborgruppe Mukosaimmunologie am Forschungszentrum Borstel



## Publikationen

Boetel, T.; Bade, S.; Schmidt, M. A.; Frey, A. (2006). "*Prion protein 90-231 contains a streptavidin-binding motif*" *Biochem Biophys Res Commun* 349(1): 296-302.

Bade, S.; Baier, M.; Boetel, T.; Frey, A. (2006). "*Intranasal immunization of Balb/c mice against prion protein attenuates orally acquired transmissible spongiform encephalopathy*" *Vaccine* 24(9): 1242-53.

Stalmans, I.; Lambrechts, D.; De Smet, F.; Jansen, S.; Wang, J.; Maity, S.; Kneer, P.; von der Ohe, M.; Swillen, A.; Maes, C.; Gewillig, M.; Molin, D. G.; Hellings, P.; Boetel, T.; Haardt, M.; Compennolle, V.; Dewerchin, M.; Plaisance, S.; Vlietinck, R.; Emanuel, B.; Gittenberger-de Groot, A. C.; Scambler, P.; Morrow, B.; Driscoll, D. A.; Moons, L.; Esguerra, C. V.; Carmeliet, G.; Behn-Krappa, A.; Devriendt, K.; Collen, D.; Conway, S. J.; Carmeliet, P. (2003). "*VEGF: a modifier of the del22q11 (DiGeorge) syndrome?*" *Nat Med* 9(2): 173-82.