

**Dissertation**  
**der**  
**Fakultät für Biologie**  
**der**  
**Ludwig-Maximilians-Universität München**  
**zur Erlangung des Dr. rer. nat.**

**Identifizierung und Charakterisierung**  
**von Interaktoren**  
**des zellulären Prion-Proteins**

vorgelegt von  
Christian Spielhauer  
am 19. April 2002

Erstgutachter: Prof. Dr. Lutz Gürtler  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Boshart  
Sondergutachter: Prof. Dr. Hermann Schätzl  
Tag der mündlichen Prüfung: 11.11.2002

## INHALT

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 TSE-Erkrankungen bei Tieren .....	2
1.1.1 Die Traberkrankheit oder „Scrapie“ .....	2
1.1.2 TME, CWD und FSE .....	3
1.1.3 Die bovine spongiforme Enzephalopathie .....	3
1.2 Prion-Krankheiten beim Menschen .....	5
1.2.1 Kuru.....	6
1.2.2 Die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) .....	6
1.2.2.1 Die sporadische Form von CJD .....	6
1.2.2.2 Genetische Fälle von CJD .....	7
1.2.2.3 Iatrogene Fälle von CJD .....	7
1.2.2.4 Die neue Variante von CJD (vCJD).....	8
1.2.3 Das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom.....	8
1.2.4 Die Fatale Familiäre Insomnie.....	9
1.3 Das Prion-Protein .....	9
1.3.1 Genstruktur und Expression.....	10
1.3.2 Reifung und Metabolismus des Prion-Proteins.....	11
1.3.3 Struktur und Topologie von PrP <sup>C</sup> und PrP <sup>Sc</sup> .....	14
1.4 Modelle der Prion-Replikation .....	16
1.4.1 Heterodimer-Modell.....	16
1.4.2 Das Keimbildungs-Modell .....	17
1.4.3 Der Faktor X und die Speziesbarriere .....	18
1.5 PrP-Knockout-Mäuse und Doppel .....	19
1.6 Mögliche Funktionen des zellulären Prion-Proteins .....	22
1.7 Beschriebene PrP-Interaktoren .....	23
1.8 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit .....	26
<b>2 Material &amp; Methoden.....</b>	<b>27</b>
2.1 Kultivierung von Mikroorganismen und Säugetierzellen .....	27
2.1.1 Bakterienkulturen.....	27
2.1.1.1 Verwendete Bakterienstämme.....	27
2.1.1.2 Kultivierung von Bakterien .....	27
2.1.1.3 Bestimmung der Zelldichte .....	27
2.1.1.4 Dauerkulturen.....	27
2.1.2 Hefekulturen.....	28
2.1.2.1 Verwendete Hefestämme.....	28
2.1.2.2 Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	28
2.1.2.3 Bestimmung der Hefezelldichte in Flüssigkultur .....	29
2.1.3 Säugetierzelllinien.....	29
2.1.3.1 Verwendete Zelllinien.....	29
2.1.3.2 Kultivierung .....	30
2.1.3.3 Dauerkulturen.....	30
2.2 Nukleinsäurereinigung und -analyse .....	30
2.2.1 Enzymatische Behandlung von DNA .....	30
2.2.2 Plasmidisolierung aus Bakterien .....	30
2.2.2.1 Präparation im kleinen Maßstab (Miniprep) .....	30
2.2.2.2 Präparation im großen Maßstab (Maxiprep) .....	30
2.2.3 Plasmidisolierung aus <i>S.cerevisiae</i> .....	31
2.2.4 Präparation von Nukleinsäuren aus Säugerzellen .....	31

## Inhaltsverzeichnis

---

2.2.4.1 Präparation genomischer DNA .....	31
2.2.4.2 Präparation von RNA .....	32
2.3 Reverse Transkription und RACE.....	32
2.4 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration.....	33
2.5 PCR-Amplifikation.....	33
2.5.1 Verwendete PCR-Primer .....	34
2.6 Gerichtete Mutagenese von DNA .....	35
2.6.1 Nukleotidsubstitution mittels “Mismatch-Overlap” .....	35
2.6.2 Epitop-Einführung mittels PCR-Primer .....	35
2.7 Northern-Blot .....	35
2.7.1 Präparation und Markierung von radioaktiven DNA-Sonden.....	36
2.7.2 Hybridisierung.....	36
2.7.3 Detektion und Auswertung der radioaktiven Signale.....	37
2.7.4 Entfernung der radioaktiven Sonde von der Membran.....	37
2.8 Auftrennung von DNA in Agarosegelen.....	37
2.9 Elution von DNA aus Agarosegelen.....	38
2.9.1 Elution mittels Glasmilch (Gene-Clean) .....	38
2.9.2 Elution mittels Ionenaustauschersäulchen.....	38
2.10 Sequenzierung von DNA.....	38
2.11 Einführung von Plasmid-DNA in Mikroorganismen und Säugetierzellen.....	39
2.11.1 Transformation von Bakterien .....	39
2.11.1.1 Elektroporation .....	39
2.11.1.2 Transformation mittels Hitzeschock.....	40
2.11.2 Transformation von Hefezellen .....	40
2.11.3 Transfektion von Säugetierzellen .....	41
2.11.3.1 Transfektion mittels Calcium-Phosphat.....	41
2.11.3.2 Transfektion mittels Superfect.....	41
2.11.3.3 Elektroporation .....	41
2.12 Yeast-Two-Hybrid-Methoden.....	42
2.12.1 Konstruktion der benötigten Plasmid-Vektoren .....	42
2.12.1.1 Konstruktion des „Köder“-Plasmids.....	42
2.12.1.2 Konstruktion und Amplifikation der cDNA-Bibliothek .....	42
2.12.2 $\beta$ -Galaktosidase Filter-Assay (Colony-Lift-Assay).....	43
2.12.3 Experimentelles Vorgehen .....	44
2.12.4 Re-Isolierung der cDNA-Bibliotheksplasmide .....	44
2.12.5 Ausschluß von falsch positiven Interaktionssignalen.....	45
2.13 Überexpression von Proteinen.....	46
2.13.1 Expression in Retikulozytenlysate.....	46
2.13.2 Vaccinia-Virus induzierte Überexpression.....	46
2.14 Immunpräzipitation von Proteinen .....	47
2.14.1 Co-Immunpräzipitation aus Retikulozyten-Lysat .....	47
2.14.2 Co-Immunpräzipitation aus Zellkultur.....	48
2.15 Präparation von postnukleären Überständen.....	48
2.16 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	49
2.17 SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	49
2.18 Western-Blot .....	50
2.19 Verwendete Antikörper.....	51
2.20 Löslichkeitsassays .....	51
2.20.1 Ultrazentrifugation in Sarcosyl .....	51
2.20.2 Fällung mit Phosphorwolframsäure .....	52
2.21 Proteinase K-Verdau .....	52
2.22 Herstellung von Antiseren .....	52
2.23 Präparation von Mikrosomen.....	53

<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>54</b>
3.1 Das Prinzip der Yeast-Two-Hybrid-Interaktion.....	54
3.2 Vorversuche .....	56
3.3 Durchführung der Interaktorensuche mittels der Yeast-Two-Hybrid-Methode.....	57
3.4 PrP interagiert in Hefe mit diversen Proteinen unterschiedlicher Proteinklassen.....	58
3.5 Bestätigung der Wechselwirkungen durch alternative Interaktionsassays .....	60
3.5.1 Klonierung von PrP und der PrP-Interaktoren in Plasmide mit T7-Promotor .....	60
3.5.2 Co-Präzipitation von PrP 23-231 mit den PrP-Interaktoren in Retikulozytenlysat.....	61
3.5.3 Expression der PrP-Interaktoren in Vaccinia-vT7-infizierten Säugetierzellen.....	63
3.5.3.1 PrP 23-231 co-präzipitiert in BHK-Zellen mit Synapsin I, Pint1 und Grb2 .....	64
3.5.3.2 Co-Präzipitation von N- und C-terminal trunziertem PrP mit den PrP- Interaktoren .....	65
3.6 Weitere Charakterisierung der drei neu identifizierten PrP-Interaktoren .....	67
3.7 Der Prion-Interaktor 1 (Pint1) .....	67
3.7.1 Sequenz und mögliche Eigenschaften des identifizierten Pint1-Fragments .....	67
3.7.2 Pint1 besitzt eine teilweise Homologie zu publizierten Proteinsequenzen.....	68
3.7.3 Erzeugung und Analyse polyklonaler Antikörper gegen ein Pint1-Peptid.....	69
3.7.4 Identifizierung von Geweben mit Pint1-mRNA-Expression .....	70
3.7.5 Untersuchung der mRNA-Transkriptlänge von Pint1 .....	71
3.7.6 Suche nach dem N-Terminus von Pint1 mittels RACE .....	72
3.8 Das Adaptor-Protein Grb2.....	73
3.8.1 Lokalisation der identifizierten Region innerhalb von Grb2 .....	73
3.8.2 Untersuchung der endogenen Expression von Grb2 in diversen Zell-Linien .....	73
3.8.3 Die PrP-Mutationen P102L und P105L beeinflussen die Interaktion mit Grb2 nicht.	74
3.8.4 Klonierung und Expression des vollständigen Leserahmens von Grb2 und PrP .....	76
3.8.5 Grb2 der vollen Länge und matures PrP <sup>C</sup> co-präzipitieren.....	77
3.9 Synapsin I .....	79
3.9.1 Lokalisation der identifizierten Region innerhalb von Synapsin I.....	79
3.9.2 Untersuchung der Synapsin I-Expression verschiedener Zelltypen .....	79
3.10 Expression von PrP, Synapsin und Grb2 in Abhängigkeit von der Zelldichte .....	80
3.11 Cofraktionierung von PrP, Grb2 und Synapsin I in mikrosomalen Vesikeln.....	81
3.12 Löslichkeitsverhalten und Proteinase K-Resistenz der PrP-Interaktoren .....	83
3.13 Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen Caveolin und PrP .....	84
3.13.1 Klonierung von Caveolin .....	85
3.13.2 Caveoline interagieren in Hefe nicht mit PrP 23-231 .....	86
3.14 Das PrP-ähnliche Protein Doppel.....	86
3.14.1 Klonierung von Doppel in verschiedene Plasmide .....	86
3.14.2 Analyse der Doppel-mRNA-Expression in Mäusegeweben.....	87
3.14.3 Doppel interagiert nicht mit den identifizierten PrP-Interaktoren .....	87
3.14.4 Doppel und PrP 23-231 interagieren in Hefe nicht miteinander .....	88
<b>4 Diskussion</b> .....	<b>89</b>
4.1 Die Interaktion von PrP mit cytosolischen Proteinen.....	89
4.2 Der neu identifizierte PrP-Interaktor Pint1.....	91
4.3 Das Adaptorprotein Grb2.....	92
4.3.1 Eine PP-II-Helix im N-Terminus von PrP ist ein potentielles Bindeepitop für Grb2.	95
4.3.2 Grb2 ist ein möglicher PrP-Dimerisierer .....	96
4.4 Synapsin I .....	96
4.5 Subzelluläre Lokalisation der PrP-Interaktoren .....	98
4.6 Ein hypothetisches Heterotrimer aus PrP, Synapsin I und Grb2.....	100
4.7 Das Löslichkeitsverhalten von Synapsin I und Grb2 .....	101
4.8 Interaktionstests von PrP und der PrP-Interaktoren mit anderen Proteinen .....	101

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>104</b>
<b>6 Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>105</b>
<b>7 Literatur.....</b>	<b>106</b>
<b>8 Publikationen .....</b>	<b>121</b>
<b>9 Danksagung .....</b>	<b>122</b>
<b>10 Lebenslauf .....</b>	<b>123</b>

## 1 Einleitung

Prion-Erkrankungen bilden eine Gruppe von Krankheiten, die bei Mensch und Tier Neurodegeneration im Zentralnervensystem verursachen und immer tödlich verlaufen. Die Ursache bzw. der Erreger der Krankheiten war bis vor ca. 20 Jahren nicht bekannt, aber es wurde ein „Slow-Virus“, d.h. ein sich sehr langsam replizierendes Virus als Erreger vermutet. Erst 1982 gelang es, das Prion-Protein zu isolieren, welches offenbar für die Übertragung und den Ausbruch der Krankheiten verantwortlich ist.

Lange Zeit galten die sporadisch bei Menschen beobachteten Krankheitsfälle von Demenzen mit schwammartiger Zersetzung des Hirngewebes als „Kuriositäten“, die allenfalls bei Neuropathologen verstärktes Interesse erweckten. Dies änderte sich, als 1986 eine Krankheit mit ähnliche Symptomen bei britischen Rindern beschrieben wurde, die als „Rinderwahn“ bzw. BSE Schlagzeilen machte und in Großbritannien epidemische Ausmaße erreichte. Insgesamt wiesen ca. 200.000 Tiere die sichtbaren BSE-Symptome des Einknickens der Hinterläufe und motorischer Störungen auf. Die Zahl der präventiv geschlachteten Rinder geht in die Millionen. 1996 wurde die Angst der Verbraucher noch stärker geschürt, da damals erstmals ein direkter Zusammenhang zwischen BSE und einer neuen Variante der humanen Creutzfeldt-Jakob-Krankheit nachgewiesen werden konnte (Will et al., 1996). Zunächst wurde dieses Phänomen als rein britisches Problem angesehen. Als die ersten BSE-Fälle in Kontinentaleuropa auftraten, konnten meist noch Zusammenhänge mit britischem Futter oder Tieren nachgewiesen werden. Spätestens seit dem Bekanntwerden erster BSE-Fälle in Deutschland, deren Anzahl durch die mittlerweile obligatorischen Reihenuntersuchungen auf über 100 angestiegen ist, ist das Randgebiet der Forschung in den Mittelpunkt des öffentlichen Interesses gerückt.

**Tabelle 1:** bislang bekannte Prion-Erkrankungen bei Mensch und Tier

Abkürzung	Krankheit	betroffene Spezies	Infektionsweg
<b>bei Tieren</b>			
Scrapie	Scrapie	Schafe, Ziegen	natürlich auftretend
CWD	Chronic Wasting Disease	Hirsche	natürlich auftretend
TME	Transmissible Nerz Enzephalopathie	Zuchtnerze	wahrscheinlich Futter
FSE	Feline spongiforme Enzephalopathie	Katzenartige	oral
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie	Rinder	oral
<b>beim Menschen</b>			
Kuru	Kuru	Mensch	durch rituellen Kannibalismus
CJD	Creutzfeldt-Jacob Krankheit	Mensch	spontan, iatrogen, genetisch
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom	Mensch	genetisch
FFI	Fatale Familiäre Insomnie	Mensch	genetisch
vCJD	Neue Variante von CJD	Mensch	oral

### 1.1 TSE-Erkrankungen bei Tieren

BSE ist nur eine Erscheinungsform von transmissiblen spongiformen Enzephalopathien (TSEs), die eine Gruppe von Krankheiten zusammenfasst, die in vielen Säugetieren auftritt.

Alle Krankheiten äußern sich histologisch in schwammartiger Zersetzung des Gehirns und führen unvermeidlich zum Tod. Hirn- bzw. Rückenmark von Erkrankten ist infektiös und kann zur Übertragung der Krankheit auf weitere Individuen führen. Nicht nur Menschen, sondern auch viele Tierarten können davon betroffen sein (Tabelle 1). Dazu gehören viele Haus- und Nutztiere, wie Schafe, Ziegen, Rinder und Katzen. Einige wichtige Nutztierarten scheinen aber auch eine natürliche Resistenz gegen diese Krankheit zu besitzen. So wurde trotz intensiver Suche kein Fall bei Hunden entdeckt. Auch Schweine scheinen nicht über Nahrungsmittel bzw. eine orale Route mit BSE infizierbar zu sein (Ryder et al., 2000). Nur bei intrazerebraler Inokulation von BSE-Material in Schweine traten die charakteristischen schwammartigen Veränderungen im Hirn auf, die der Krankheitsfamilie ihren Namen gibt. Geflügel, bzw. generell alle Nicht-Säugetiere sind offenbar ebenfalls nicht anfällig, obwohl das zelluläre Prion-Protein auch von diesen Tierarten exprimiert wird.

#### 1.1.1 Die Traberkrankheit oder „Scrapie“

Die Traberkrankheit ist im Gegensatz zu den jüngeren Prionerkrankungen schon seit drei Jahrhunderten bekannt. Bereits im späten Mittelalter wurden die klassischen Symptome dieser Krankheit bei Schafen und Ziegen beschrieben. Die älteste bekannte Literatur datiert in England auf das Jahr 1732 zurück (McGowan, 1914). Im deutschen Sprachraum ist sie als Traberkrankheit bekannt und wurde hier 1759 erstmals erwähnt. Da die Tiere Bewegungsstörungen aufweisen und sich das Fell an Zäunen und Bäumen abscheuern, wird die Krankheit im englischen Sprachraum als Scrapie (engl. to scrape = kratzen, schaben) bezeichnet. Im weiteren Verlauf verlieren die betroffenen Tiere immer stärker ihre Bewegungskoordination und gehen schließlich nach einigen Monaten im Stadium völliger Paralyse zugrunde. Es gab keine epidemische Verbreitung der Fälle, sondern sie traten meist endemisch auf. Die Tiere können sich sowohl oral, als auch über Hautverletzungen infizieren. Eine Übertragung vom Muttertier auf das Lamm ist ebenfalls möglich (Smits et al., 1997). Das Fleisch der erkrankten Tiere wurde ganz normal verwertet und gegessen. Bei einer familiär gehäuft aufgetretenen CJD-Erkrankung libyscher Juden wurde zunächst vermutet, dass sie sich durch den Verzehr von Schafsorganen infiziert hatten. Nach der Entdeckung und Sequenzierung des Prion-Gens stellte sich aber heraus, dass die Erkrankten die E200K-Mutation trugen und somit eine genetische Krankheitsursache vorlag.



### 1.1.2 TME, CWD und FSE

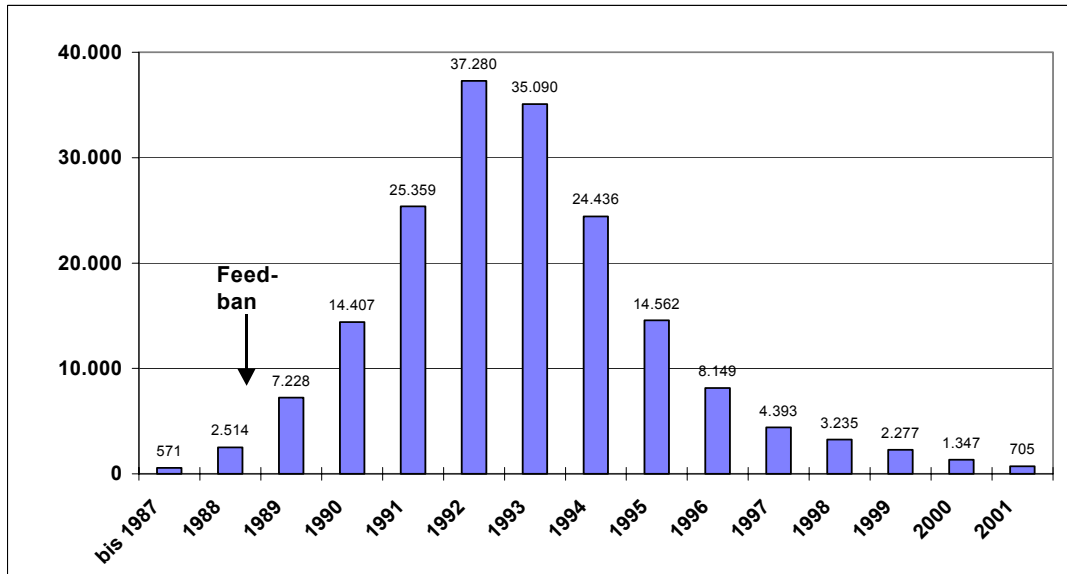
Die zweite beschriebene tierische transmissible Enzephalopathie trat Ende der 40'er Jahre des 20. Jahrhunderts auf und wurde 1965 erstmals veröffentlicht (Hartsough und Burger, 1965). Betroffen waren in Gefangenschaft gehaltene Nerze in Zuchtfarmen in den USA. Daher erhielt die Krankheit den Namen „Transmissible Mink Encephalopathy“ (TME). Aufgrund der Fütterung mit tierischen Produkten wird davon ausgegangen, dass der Erreger ursprünglich vom Schaf oder einer anderen infizierten Spezies, z.B. Rind stammt und sich an Nerze adaptiert hat (Marsh und Hadlow, 1992).

Bei einigen in den USA heimischen Hirscharten wurde 1967 die sogenannte „Chronic Wasting Disease“, kurz CWD, festgestellt. Da die Tiere abmagerten und unterernährt erschienen, ging man zunächst von einer Nährstoffmangelkrankheit aus. Erst 1978 konnte sie eindeutig den TSE-Krankheiten zugeordnet werden, nachdem die schwammartigen Veränderungen im Hirn von betroffenen Tieren nachgewiesen wurden (Williams und Young, 1980). Der natürliche Entstehungs- und Übertragungsweg der Krankheit ist nicht bekannt, da sowohl wilde als auch in Gefangenschaft aufwachsende Tiere gleichermaßen betroffen sind. Möglicherweise handelt es sich wie bei Scrapie um eine spontan auftretende Krankheit, die sich dann innerhalb einer Population verbreiten kann. Die Durchseuchungsrate der untersuchten Gesamtpopulation liegt bei ca. 20 % (Miller et al., 1998).

Die jüngste bekannte tierische spongiforme Enzephalopathie wurde 1990 beschrieben und betraf Hauskatzen sowie einige exotische Großkatzen in zoologischen Gärten und wurde deshalb feline spongiforme Enzephalopathie (FSE) genannt. Die erkrankten Tiere scheinen sich über infizierte Nahrung mit dem Erreger angesteckt zu haben (Leggett et al., 1990). Da gerade bei Tierfutter viele Körperteile von Rindern und Schafen verwertet wurden, ist BSE bzw. Scrapie der wahrscheinlichste Ursprung der Krankheit.

### 1.1.3 Die bovine spongiforme Enzephalopathie

Die bekannteste Prion-Erkrankung ist die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) beim Rind. Symptomatisch sind zunächst Überempfindlichkeiten gegenüber sensorischen Reizen wie Lärm und Licht, gefolgt von immer stärker werdenden Bewegungsstörungen (Wilesmith et al., 1988). 1986 wurde BSE erstmals bei einer Kuh in Großbritannien beschrieben (Wells et al., 1987). Seitdem nahm die Seuche epidemieartige Ausmaße an und erreichte mit über 37.000 Fällen im Jahr 1992 ihren vorläufigen Höhepunkt (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Jahresstatistik der BSE-Fälle in Großbritannien. Der Höhepunkt der Seuche wurde 1992 erreicht, seitdem nimmt die Fallzahl stetig ab (Quelle: Schweizer Bundesamt für Veterinärwesen)

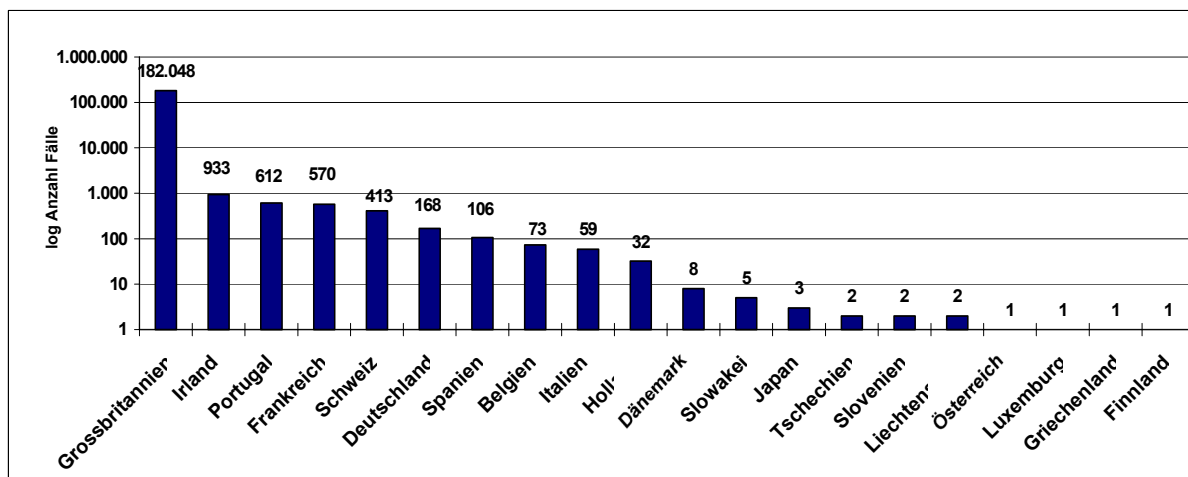
Die epidemieartige Ausbreitung von BSE ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf verseuchtes Futter zurückzuführen. Es war gängige Praxis, Kadaver von verendeten oder notgeschlachteten Tieren zu Tiermehl zu verarbeiten und dies auch an nicht fleischfressende Tierarten zu verfüttern. Zwei mögliche Szenarien werden momentan als wahrscheinliche Quelle der Epidemie diskutiert. Zum einen könnte der Scrapie-Erreger des Schafes über Tiermehl in das Futter von Rindern gelangt und aufgenommen worden sein (Wilesmith et al., 1988), was zu ersten Fällen von BSE geführt hat. Diese verseuchten Rinder könnten wieder zu Tiermehl verarbeitet worden sein, was zu einer enormen Streuung des verseuchten und nunmehr rinderpathogenen Futters führte. Alternativ wäre es auch möglich, dass Rinder an einem spontanen Fall von BSE erkrankt sind (ähnlich den spontanen CJD-Fällen beim Menschen bzw. spontanem Scrapie beim Schaf) und dann deren Kadaver über das Tiermehl in die Nahrungskette gelangten. Für diese Theorie spricht, dass bereits 1883 ein französischer Tierarzt einen Fall beschreibt, der retrospektiv als spontan aufgetretene BSE gewertet werden könnte (Sarraet, 1883).

Beide Modelle gehen davon aus, dass sowohl die Verfütterung von Tiermehl an Wiederkäuer als auch dessen Herstellungsmethode maßgeblich zur Verbreitung von BSE beigetragen haben. Die Bedingungen zur Desinfektion bei der Herstellung von Tiermehl wurden in England Anfang der 1980'er Jahre im Zuge von Energiesparmaßnahmen reduziert. Die Temperatur wurde auf unter 120° C gesenkt und es entfiel ein Schritt, bei dem Natronlauge verwendet wurde (Ford, 1996). Diese „milden“ Methoden reichten nicht aus, eventuell vorhandene Erreger effizient zu inaktivieren. Seit dem Verbot der Verfütterung von Tiermehl an Wiederkäuer in Großbritannien ist die Zahl der BSE-Fälle pro Monat stark rückläufig, aber noch nicht völlig auf Null gesunken.

Neben den britischen Inseln traten auch in der Schweiz und Portugal bereits früh Fälle von BSE auf. Im übrigen Europa wurden bis ins Jahr 2000 kein BSE bei Kühen entdeckt, da auch keine Reihenuntersuchungen an Schlachtvieh vorgeschrieben waren.

Im Jahr 2000 wurde in Deutschland der erste „endemische“ BSE-Fall diagnostiziert, nachdem eine systematische Untersuchung eingeführt worden war. Bei den wenigen vorangegangenen deutschen Fällen waren die Tiere oder das Futter aus Großbritannien eingeführt worden. Erst Anfang 2001 wurde auch in der Bundesrepublik ein absolutes Verfütterungsverbot von Tiermehl erlassen. Durch die verpflichtende Untersuchung von allen Rindern über 24 Monaten auf BSE ist die Anzahl der positiv getesteten Tiere rapide angestiegen. Davor wurden nur verendete Tiere zwangsgetestet und im Schlachthof nur Stichproben untersucht. Mittlerweile sind hierzulande mehr als 100 positiv getestete Fälle bekannt geworden.

Die europaweite Verschärfung der Testvorschriften führte zur Diagnose von BSE-Fällen in fast allen Ländern, auch in jenen, die zuvor als BSE-frei galten. In Japan wurden ebenfalls Tiere positiv getestet, so dass BSE kein rein europäisches Problem zu sein scheint (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** die Gesamtzahl der diagnostizierten BSE-Fälle in verschiedenen Ländern (Stand März 2002); zu beachten ist die logarithmische Skalierung der y-Achse (Quelle: Schweizer Bundesamt für Veterinärwesen)

## 1.2 Prion-Krankheiten beim Menschen

Eine herausragende Besonderheit der beim Menschen bekannten Prion-Krankheiten besteht darin, dass vier unabhängige Prinzipien als Ursache identifiziert worden sind.

Sowohl sporadische, als auch genetische und iatrogene Fälle wurden beschrieben. Inzwischen ist eine vierte Form hinzugekommen: die neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD), die mit hoher Wahrscheinlichkeit durch Verzehr von BSE-kontaminierten Lebensmitteln auf den Menschen übertragen wurde. Abgesehen von der schwammartigen Zersetzung können im Hirn histologisch auch Amyloid-Ablagerungen nachgewiesen werden, die durch Congo-Rot anfärbbar sind.

### 1.2.1 Kuru

Die Kuru-Krankheit trat bei dem Volksstamm der Fore in Papua-Neuguinea auf, bei dem das Gehirn Verstorbener rituell verspeist wurde (Gajdusek und Zigas, 1957). Bei vielen Teilnehmern an dieser Zeremonie traten daraufhin nach Jahren Bewegungsstörungen und progressive Demenz auf, die schließlich zum Tode führten. Nach dem Verbot dieses Brauches ging die Zahl der Erkrankungen bei diesem Volk im Laufe der Zeit auf Null zurück. Keine nach dem Verbot geborene Person erkrankte daran, was eindeutig auf eine infektiöse Übertragung hinwies. Erstmals wurde 1959 von William Hadlow ein Zusammenhang zwischen den Symptomen der menschlichen Kuru-Krankheit und der Schafskrankheit Scrapie hergestellt (Hadlow, 1959). Durch Inokulationsexperimente mit Schimpansen konnte bewiesen werden, dass die menschliche Form der Erkrankung auf infektiöses Hirngewebe zurückging. Hirn von Kuru-Opfern löste bei diesen Primaten die klassischen Symptome aus (Gajdusek et al., 1966).

### 1.2.2 Die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD)

Die älteste beschriebene und bestuntersuchte Form der humanen Prion-Erkrankungen ist die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (engl. Creutzfeldt-Jacob-Disease; CJD). Von ihr sind alle vier der eingangs beschriebenen Entstehungswege bekannt (Tabelle 2).

**Tabelle 2:** die verschiedenen Arten von CJD

<b>CJD-Typ</b>	<b>Bemerkungen</b>
sporadisch	zufällige und weltweite Verbreitung; Ursache unbekannt
genetisch	autosomal dominante Mutationen im Prion-Gen
iatrogen	unbeabsichtigte Übertragung bei ärztlichen Eingriffen
neue Variante	wahrscheinlich durch Infektion mit BSE verursacht

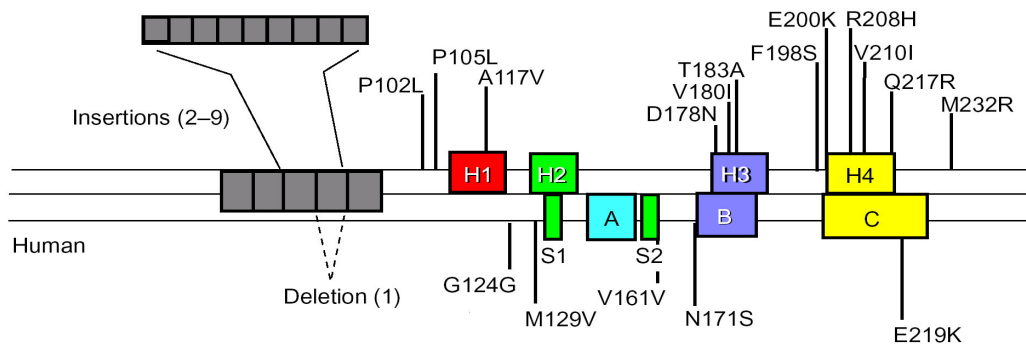
#### 1.2.2.1 Die sporadische Form von CJD

In den 1920'er Jahren wurde erstmals die neuronale Creutzfeldt-Jakob-Krankheit beschrieben (Creutzfeldt, 1920). Der betroffene Patient wies eine „eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems“ auf. Sporadische CJD-Fälle haben eine weltweite Inzidenz von 1:500.000-1.000.000 und Jahr (Masters et al., 1979). Typischerweise treten sie bei älteren Menschen ab dem 65. Lebensjahr auf, selten auch bei jüngeren Patienten. Nach dem Auftreten der ersten Symptome (Demenz) bis zum Tod vergehen meist 3-6 Monate. Die Opfer weisen keine Mutation in der Sequenz des Prion-Gens auf und es ist nicht genau bekannt, ob weitere genetische Faktoren außerhalb dieses Gens zum Auftreten der Erkrankung beitragen. Die Ähnlichkeit von CJD zu der bereits als Infektionskrankheit beschriebenen Kuru-Krankheit wurde von Igor Klatzo erstmals öffentlich diskutiert (Klatzo et al., 1959). 1968, zwei Jahre nach der erfolgreichen Infektion von Schimpansen mit Kuru konnte gezeigt werden, dass die sporadische Form von CJD ebenfalls auf Primaten übertragbar und damit infektiös ist (Gibbs, Jr. et al., 1968). Der

Ursprung von Kuru könnte daher ein in der Fore-Population spontan aufgetretener CJD-Fall sein, der durch den Verzehr des Hirns zu einer Verbreitung der Krankheit führte.

### 1.2.2.2 Genetische Fälle von CJD

Etwa 10 % aller CJD-Fälle treten familiär gehäuft auf. Daraus ließ sich bereits früh eine genetische Veranlagung für diese Krankheit vermuten. Mittlerweile sind mehrere verschiedene Mutationen im PrP-Gen identifiziert worden, die alle autosomal dominant vererbt werden (Abbildung 3). Dabei verursachen verschiedene Mutationen unterschiedlich verlaufende Krankheitsbilder. Nicht alle Mutationen führen zu klinischen Symptomen, es gibt auch apathogene Polymorphismen im Prion-Gen.



**Abbildung 3:** die bislang entdeckten Mutationen und Polymorphismen im humanen Prion-Protein (entnommen aus Prusiner et al., 1998). Über der schematisch angedeuteten PrP-Sekundärstruktur mit den 5 Octapeptid-Repeats (graue Blöcke) und den errechneten helikalen Regionen (H1 bis H4) sind die pathogenen Mutationen dargestellt. A, B und C bezeichnen die tatsächlich nachgewiesenen  $\alpha$ -Helices, darunter sind die entdeckten apathogenen Polymorphismen aufgeführt.

Meistens sind Punktmutationen, die zu einem Austausch einer Aminosäure führen, die Ursache der vererbaren Form von CJD. Es gibt aber auch Varianten, bei denen Insertionen im Bereich der Octarepeats für das Auftreten der Krankheit verantwortlich sind. Diese Insertionen entsprechen der Octarepeat-Sequenz und die Anwesenheit von 2 bis 9 zusätzlichen Octapeptiden führt zu CJD. Die Deletion eines Octarepeats führt nicht zu einer pathogenen Veränderung.

### 1.2.2.3 Iatrogene Fälle von CJD

Außer über die kannibalistischen Rituale bei Kuru erfolgte eine direkte Übertragung von Mensch zu Mensch auch unbeabsichtigt durch iatrogene Eingriffe. So wurden Fälle beschrieben, die nach Hirnhauttransplantationen (Rappaport, 1987) oder auch nach Augenhornhautverpflanzungen auftraten (Duffy et al., 1974), wobei offenbar die Spender nicht symptomatisch an CJD erkrankt waren. Zahlreiche Empfänger von Präparaten, welche aus menschlichen Leichen gewonnen wurden, wie Wachstumshormone oder Gonadotropine, erkrankten ebenfalls an CJD. Es sind keine größeren Mengen infektiöses Material nötig, damit die Krankheit über diese Wege

übertragen werden kann. Es reichte beispielsweise aus, dass desinfizierte, intrazerebral applizierte Hirnelektroden an Patienten verwendet wurden, mit denen zuvor Creutzfeldt-Jakob-Patienten untersucht worden waren. Dabei wurden offenbar die Erreger durch die durchgeführten Sterilisierungsmaßnahmen nicht effizient inaktiviert. Prionen können an metallischen Oberflächen besonders gut persistieren, was die Inaktivierung zusätzlich erschwert (Flechsig et al., 2001).

### **1.2.2.4 Die neue Variante von CJD (vCJD)**

1996 wurde zu den seit längerem bekannten Formen von CJD eine neue Variante beschrieben, die einen anderen klinischen Verlauf hat (Will et al., 1996). Sie betrifft vor allem jüngere Patienten bis zum 40. Lebensjahr. Im Gegensatz zu den spontanen und erblichen Formen ist die Dauer der symptomatischen Phase bis zum Tod bei der neuen Variante von max. 6 Monaten auf 8-12 Monate verlängert. Die Patienten weisen darüber hinaus auch psychiatrische und Verhaltensstörungen vor Beginn der Demenz auf, welche bei den anderen CJD-Formen nicht beobachtbar sind. Im Hirn sind histologisch immer sogenannte floride Plaques nachweisbar. Inzwischen sind mehr als 120 Opfer zu beklagen (Stand Frühjahr 2002). Über 100 dieser vCJD-Fälle traten in Großbritannien auf, wo auch die meisten BSE-Fälle gezählt wurden. Einige vCJD-Patienten lebten in Kontinentaleuropa, z.B. Frankreich und Italien. Statistisch ist es nur eine Frage der Zeit, bis auch in Deutschland die ersten vCJD-Fälle diagnostiziert werden. Schon früh wurde ein Zusammenhang zwischen BSE und dem späteren Auftreten von vCJD postuliert., was mittlerweile durch Experimente untermauert werden konnte. Infektionsstudien an Mäusen, die mit BSE- bzw. vCJD-Hirnproben inokuliert wurden, wiesen einen ähnlichen Krankheitsverlauf und vergleichbare Inkubationszeiten auf (Hill et al., 1997). Es wurden auch biochemisch viele Ähnlichkeiten zwischen dem BSE- und vCJD-Erreger gefunden. So sind die Verhältnisse zwischen den drei Glycosylierungsformen von PrP<sup>Sc</sup> bei BSE und vCJD identisch, unterscheiden sich aber signifikant von den Mustern, die bei klassischer CJD oder Scrapie erhalten werden (Collinge et al., 1996).

Die Anfälligkeit gegenüber der neuen Variante von CJD scheint mit der Aminosäure an Codon 129 des Prion-Gens gekoppelt zu sein. 37 % der Bevölkerung sind an dieser Stelle homozygot für Methionin, 12 % sind homozygot für Valin und 51 % sind Met/Val heterozygot. Alle bisher aufgetretenen vCJD-Fälle sind an diesem Codon Methionin-homozygot.

### **1.2.3 Das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom**

Das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) wurde kurze Zeit nach den ersten publizierten Fällen von CJD erstmals von den namensgebenden Ärzten beschrieben (Gerstmann et al., 1936). Ein direkter Zusammenhang zwischen den beiden Krankheiten wurde zunächst

nicht gesehen. Erst nach Jahrzehnten konnte durch Sequenzierung des Prion-Gens der Patienten gezeigt werden, dass die Ursache eine autosomal dominant vererbte Mutation im Prion-Protein ist (Hsiao et al., 1989). Transgene Mäuse, welche die GSS-Mutation P102L überexprimieren, erkranken spontan an neurodegenerativen Symptomen (Hsiao et al., 1990). Diese Krankheit ist dann auf gesunde transgene Mäuse übertragbar. Dies ist ein starker Hinweis für die Übertragbarkeit einer spontan entstandenen Erkrankung ohne Beteiligung von Nukleinsäuren.

### 1.2.4 Die Fatale Familiäre Insomnie

Die jüngste entdeckte humane Prion-Erkrankung ist, neben der neuen Variante der „alten“ CJD, die Fatale Familiäre Insomnie (FFI). Sie wird durch eine Punktmutation im Codon 178 von PrP verursacht, die zu einem Austausch von Asp zu Asn führt (Goldfarb et al., 1992). Zugleich auf demselben PrP-Allel Methionin an Codon 129 codiert sein. Die betroffenen Patienten sind meist über 50 Jahre alt. Namensgebend sind die charakteristischen Schlafstörungen. Die symptomatische Phase bis zum Tod dauert ca. 1 Jahr. Neuere Daten deuten auch auf eine mögliche sporadische Entstehung hin (H. Kretzschmar, unveröffentlichte Daten).

### 1.3 Das Prion-Protein

Wegweisende prinzipielle Erkenntnisse über die Eigenschaften des TSE-Erregers wurden bereits vor der Isolierung des Prion-Proteins gewonnen. Neben der Übertragbarkeit der Krankheit von Tier zu Tier durch Hirngewebe ist die lange Inkubationszeit bis zum Auftreten klinischer Symptome charakteristisch, die zwischen 1 und 15 Jahren liegen kann. Dies führte zu der Hypothese eines sich sehr langsam vermehrenden Virus als Ursache („Slow Virus“-Hypothese) (Sigurdsson, 1954). Eine mögliche Erklärung für diese lange Zeitspanne ist, dass sich der Erreger zunächst in Reservoirs wie z.B. dem lymphoretikulären System oder dem peripheren Nervensystem vermehrt, bevor der Übertritt ins ZNS und damit die symptomatische Phase der Erkrankung beginnt. Es ist aus Island bekannt, dass der Auslöser von Scrapie auf den Schafswiden mehrere Jahre überdauerte, was ein Zeichen hoher Resistenz gegenüber Umwelteinflüssen ist. Der Scrapie-Erreger zeigte sich auch gegenüber herkömmlichen Sterilisierungsverfahren außerordentlich widerstandsfähig. Tikvah Alper führte Inaktivierungsversuche mit Scrapie-Material durch und testete dessen verbleibende Infektiosität im Tierversuch. Bestrahlung mit UV-Licht und Behandlung mit Nukleasen überstand es ebenso wie das Autoklavieren unter Standardbedingungen von 121° C für 20 min. Hingegen führte die Behandlung von Proben mit Protein-denaturierenden Agenzien, wie z.B. Harnstoff und Natronlauge, zu einem Verlust der Infektiosität (Alper et al., 1967). Zehn Jahre später wurde diese bemerkenswerte Resistenz auch bei dem Erreger von Kuru und CJD festgestellt (Gibbs et al., 1978). Die außergewöhnliche Resistenz gegenüber DNA-zerstörenden Verfahren führte

bereits früh zu der Hypothese, dass dieser Erreger kein gewöhnliches Virus, Bakterium oder Viroid ist, sondern sich ohne Nukleinsäure vermehren und verbreiten kann (Griffith, 1967).

Stanley Prusiner gelang es schließlich 1982 nach mehrjähriger Arbeit ein infektiöses Agens zu isolieren, das mit der infektiösen Fraktion in Tierversuchen cofraktionierte und offenbar ausschließlich aus Proteinbestandteilen aufgebaut war (Prusiner, 1982). Dieses Agens wurde „Prion“ (Kurzform für Proteinacious Infectious Particle) genannt, das korrespondierende Protein „Prion-Protein“, kurz PrP. Das Protein erwies sich als resistent gegenüber Proteinase K (PK) und hatte nach PK-Verdau eine Masse von 27-30 kDa. In Mäusen konnten experimentell Antikörper gegen Hamsterprionen erzeugt werden. Auch gegen das Prion-Protein aus diversen anderen Spezies wurden Antikörper gewonnen. Die Antiseren reagierten auch mit einem Protein aus nicht infizierten Geweben, sofern diese nicht mit Proteasen behandelt worden waren. Durch die N-terminale Sequenzierung und eine anschließende Suche mit degenerierten Primern gelang es schließlich, das codierende Gen zu finden, das den Namen *prnp* erhielt (Prusiner et al., 1984). Dies führte zur Identifizierung des natürlichen zellulären Homologs des infektiösen Prion-Proteins (Oesch et al., 1985) (Basler et al., 1986). Zur Unterscheidung bekam das zelluläre Protein den Namen PrP<sup>C</sup> (C für cellular) und die pathogene Isoform den Namen PrP<sup>Sc</sup> (Sc für Scrapie), die auch häufig PrP<sup>RES</sup> (Proteinase K-resistentes PrP) genannt wird. Der direkte Vergleich der Eigenschaften des zellulären und des pathogenen Prion-Proteins führte zur Aufdeckung einiger grundsätzlicher biochemischer und biophysikalischer Unterschiede zwischen den beiden Isoformen (Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Vergleich der Eigenschaften der zellulären und pathogenen PrP-Isoform

<i>Eigenschaft</i>	<i>PrP<sup>C</sup></i>	<i>PrP<sup>Sc</sup></i>
Infektiosität	keine	vorhanden
Sekundärstruktur	überwiegend $\alpha$ -Helices	überwiegend $\beta$ -Faltblatt
Halbwertszeit	kurz (2-4 h)	lang (> 24 h)
Proteinase K-Resistenz	sensitiv	teilweise resistent
Molekulargewicht (-/+PK)	33-35 kDa → degradiert	33-35 kDa → 27-30 kDa
Löslichkeit in Detergentien	löslich	unlöslich
Höchste Konzentration	Zelloberfläche	sekundäre Lysosomen, Ablagerungen

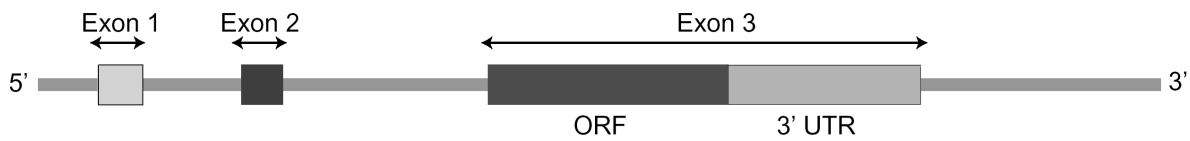
### 1.3.1 Genstruktur und Expression

Bereits früh wurde erkannt, dass einige Mäusestämme eine verlängerte Inkubationszeit bei Inokulation mit prion-infiziertem Hirngewebe aufwiesen. Dies führte schon vor der Entdeckung des Prion-Gens zur Identifizierung eines Gen-Locus auf dem Chromosom 2 der Maus, das den Namen *sinc* erhielt („slow incubation“) (Dickinson et al., 1968). Auch nach der Charakterisierung



des *prnp*-Gens wurde zunächst lediglich eine lokale Nähe der beiden Loci kartiert, bis schließlich durch gerichtete Mutagenese gezeigt werden konnte, dass die Loci *sin*c und *prnp* kongruent sind (Moore et al., 1998). Die beobachteten unterschiedlichen Inkubationszeiten werden folglich durch Sequenzunterschiede innerhalb des Prion-Gens verursacht.

Das Prion-Protein wird in allen bekannten Tierarten von einem einzelnen Gen codiert. Beim Menschen liegt es auf Chromosom 20 (Sparkes et al., 1986), bei der Maus auf Chromosom 2 (Abbildung 4). Je nach Tierart beinhaltet es zwei oder drei Exons, welche durch Introns getrennt sind.



**Abbildung 4:** der strukturelle Aufbau des *prnp*-Gens der Maus; das Gen liegt auf Chromosom 2 und beinhaltet drei Exons, wobei in Exon 3 der komplette Leserahmen (ORF) des Prion-Proteins und ein untranslatierter 3'-Bereich (3' UTR) liegt.

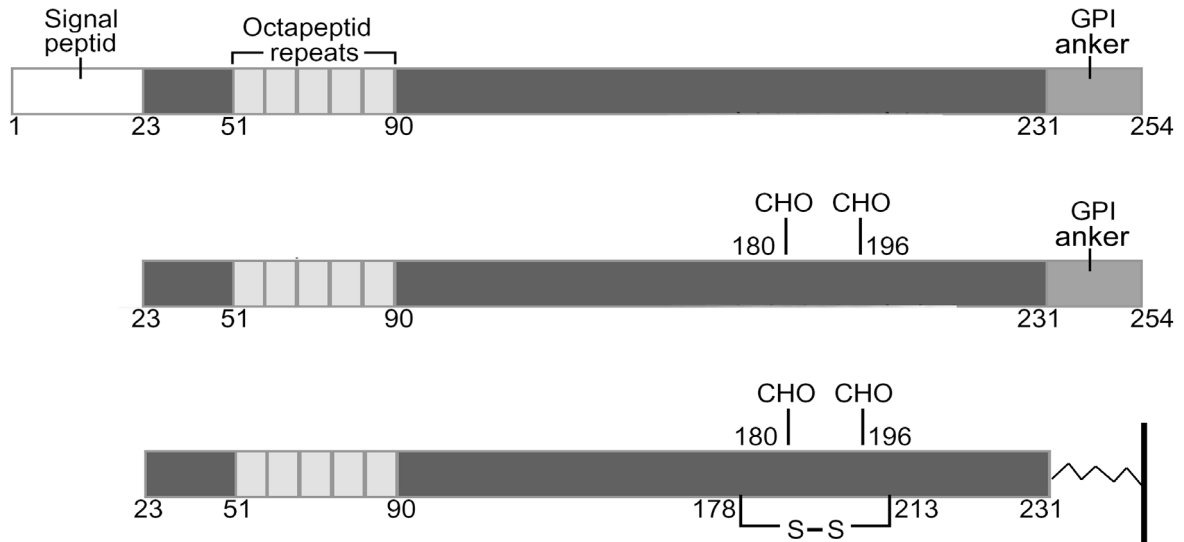
Der vollständige Leserahmen von PrP liegt im letzten Exon des *prnp*-Gens (Basler et al., 1986). Die Promotorregion enthält Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren Sp-1 und AP-1, sowie eine konservierte CCAAT-Box (Mahal et al., 2001). Eine TATA-Box ist nicht vorhanden. Die Transkription resultiert beim Menschen in einer mRNA der Länge von 2.1 bis 2.5 kb. Das Gen bzw. der proteincodierende Bereich ist innerhalb der Säugetiere hoch konserviert (Schätzl et al., 1995) und auch bei evolutiv weiter entfernten Tierarten, wie Vögeln, zeigt sich noch eine hohe Homologie (Wopfner et al., 1999). Dieser hohe Grad der Konservierung deutet auf eine wichtige Funktion des Proteins hin.

Im codierenden Bereich der mRNA tritt kein alternatives Splicing auf, das zu einer veränderten Proteinsequenz führen würde. Daher unterscheidet sich die Primärstruktur des Prion-Proteins nicht zwischen gesunden und an TSE erkrankten Individuen (mit Ausnahme der genetisch bedingten Fälle).

### 1.3.2 Reifung und Metabolismus des Prion-Proteins

Die Translation der PrP-mRNA ergibt ein Protein, das bei der Maus 253 Aminosäuren lang ist (Abbildung 5). Die ersten 22 Aminosäuren bilden ein Signalpeptid, wodurch die naszierende Polypeptidkette ins raue Endoplasmatische Retikulum translatiert wird (Oesch et al., 1985) (Basler et al., 1986). Am C-Terminus befindet sich ebenfalls ein Signalpeptid, welches für die spätere Verknüpfung von PrP<sup>C</sup> mit der Zellmembran mittels eines Lipidankers aus Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol-(GPI) verantwortlich ist (Stahl et al., 1987). Die beiden vorhandenen

Cysteine werden durch eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft (Hope et al., 1986). Zwei Asparaginreste an Position 181 und 197 werden fakultativ glycosyliert (Bolton et al., 1985) (Manuelidis et al., 1985), was in einem SDS-Gel zu einem charakterischen Dreibandenmuster aus doppelt, einfach und unglycosyliertem PrP führt. Sowohl das amino- als auch das carboxyterminale Signalpeptid wird co-translational abgespalten, so dass das resultierende PrP<sup>C</sup>-Protein eine Länge von 208 Aminosäuren aufweist.

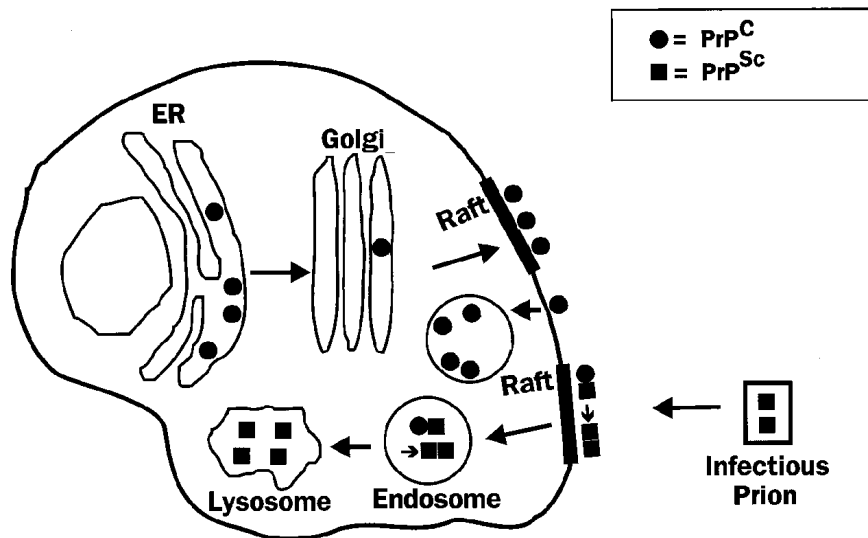


**Abbildung 5:** Reifung von PrP<sup>C</sup>: vom primären Translationsprodukt wird ein N- und C-terminales Signalpeptid abgespalten, zwei Zuckerreste (CHO) angeheftet und eine Disulfidbrücke (S-S) ausgebildet. Das nunmehr 209 AS lange reife Protein ist mittels eines GPI-Ankers an der Zellmembran befestigt.

Über den Golgiapparat gelangt PrP<sup>C</sup> an die Zelloberfläche, wo das Protein in cholesterinreichen Membranregionen (Rafts) vorliegt, die eventuell mit Caveolae assoziiert sind (Abbildung 6) (Vey et al., 1996). Die Internalisierung erfolgt wahrscheinlich über einen Clathrin-unabhängigen Weg über Endosomen. Von dort kann PrP<sup>C</sup> entweder wieder an die Membran zurückgeführt werden, oder es findet ein Abbau in Lysosomen statt. PrP<sup>C</sup> kann posttranslational durch einen noch nicht geklärten Mechanismus in die pathogene Isoform PrP<sup>Sc</sup> umgewandelt werden. Die Umwandlung geschieht, nachdem PrP<sup>C</sup> die Zelloberfläche erreicht hat, höchstwahrscheinlich in einem endocytotischen Kompartiment der Zelle (Borchelt et al., 1992). Während der Endocytose kann es zu einer Konvertierung eines Anteils von PrP<sup>C</sup> in PrP<sup>Sc</sup> kommen (Caughey und Raymond, 1991). PrP<sup>Sc</sup> kann nur in begrenztem Maße degradiert werden und lagert sich in sekundären Lysosomen ab. Ein Vorhandensein von PrP<sup>C</sup> an der Zelloberfläche ist für eine Konvertierung unbedingt notwendig. Wird die Menge an PrP<sup>C</sup> an der Zellmembran künstlich reduziert, so kann man eine Abnahme von PrP<sup>Sc</sup> im Laufe einiger Tage bis auf Null beobachten. Dies lässt sich mittels chemischer Substanzen, wie z.B. Suramin erreichen (Gilch et al., 2001). Dabei kommt es offenbar zu einer Umleitung von PrP<sup>C</sup> in endosomale Vesikel, noch bevor die Zelloberfläche

erreicht wird. Auch die enzymatische Abspaltung von PrP<sup>C</sup> von der Zelloberfläche führt zu einem allmählichen Verlust an PrP<sup>Sc</sup> (Borchelt et al., 1992). PrP<sup>C</sup>-spezifische Antikörper zeigten *in vitro* ebenfalls einen anti-prion Effekt, nachdem sie auf persistent mit PrP<sup>Sc</sup> infizierte neuronale Zellen gegeben wurden. Nach einigen Tagen reduziert sich sowohl die Menge an neu entstandenem, als auch die Gesamtmenge an PrP<sup>Sc</sup> (Peretz et al., 2001) (Enari et al., 2001). Dieser Effekt wird auf eine „Abschirmung“ von vorhandenen PrP<sup>C</sup>-Molekülen durch die Antikörper zurückgeführt, die dadurch nicht mehr mit PrP<sup>Sc</sup> bzw. einem für die Konvertierung essentiellen Faktor in direkten Kontakt treten können.

Offenbar sind neuronale Zellen in der Lage, eine gewisse Konzentration an PrP<sup>Sc</sup> zu tolerieren und auch abzubauen. Nur wenn eine kritische Menge an PrP<sup>Sc</sup> erreicht wird, kann keine effektive Degradation mehr erfolgen und PrP<sup>Sc</sup> akkumuliert.



**Abbildung 6:** Metabolismus von PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup>. PrP<sup>C</sup> (Kreis) gelangt im Verlauf seiner Reifung vom ER über den Golgiapparat an die Zelloberfläche, wo es in cholesterinreichen Membranabschnitten (Rafts) lokalisiert vorliegt. Von dort kann es über Endosomen wieder ins Zellinnere gelangen. Ein Teil wird abgebaut und ein Teil wieder an die Zelloberfläche zurückgebracht. Wenn infektiöse Prionen anwesend sind, so kommt es wahrscheinlich an der Oberfläche oder während der Endocytose zu einer Konvertierung von PrP<sup>C</sup> zu PrP<sup>Sc</sup> (Rechteck). Es erfolgt kein Recycling von PrP<sup>Sc</sup>, sondern eine Ablagerung in Lysosomen (modifiziert nach Harris, 1999).

Die höchste PrP<sup>C</sup>-Konzentration liegt in Neuronen vor (Kretzschmar et al., 1986), insbesondere an deren synaptischen Enden (Fournier et al., 1995), wohin das Protein über einen axonalen Transportweg gelangt (Borchelt et al., 1994). Die meisten ultrastrukturellen Daten weisen auf eine hauptsächlich präsynaptische Lokalisierung hin (Herms et al., 1999), allerdings wurden in Motoneuronen hohe postsynaptische PrP<sup>C</sup>-Konzentrationen gefunden (Askanas et al., 1993). Möglicherweise sind die Daten wegen unterschiedlicher Fixierungsmethoden der Gewebeschnitte

nicht direkt miteinander vergleichbar. Übereinstimmung besteht jedoch in der Beobachtung, dass synaptische Membranen die höchste messbare PrP-Konzentration aufweisen.

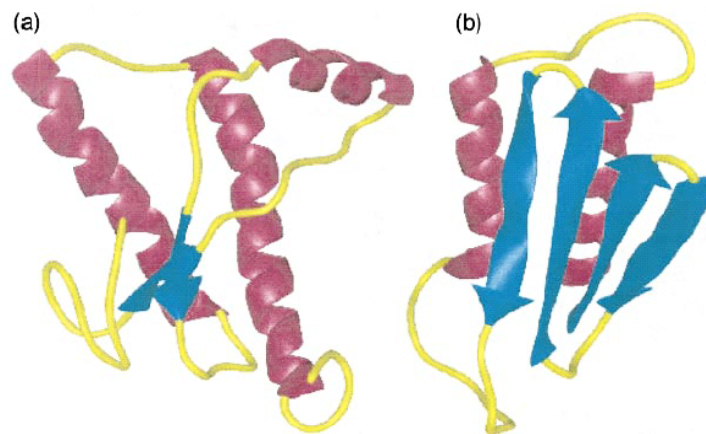
Auch in vielen nicht-neuronalen Geweben wurde PrP-Expression detektiert. Durch die Einbringung des Green-Fluorescent-Proteins (GFP) unter der Kontrolle des PrP-Promotors wurde gezeigt, dass viele Gewebe eine Grundexpression von PrP<sup>C</sup> aufweisen (Lemaire-Vieille et al., 2000). Dazu gehören einige Zelltypen im Gastrointestinaltrakt und der Niere. Auch durch klassische Immunoblots mit Antikörpern gegen PrP<sup>C</sup> wurde eine Vielzahl von Organen mit nachweisbarer PrP<sup>C</sup>-Menge entdeckt. Insbesondere in der Milz und den Tonsillen können erhebliche Mengen an PrP<sup>C</sup> vorhanden sein. Diese Gewebe werden in Mäusen bei dem Nachweis von PrP<sup>Sc</sup> nach gezielter Inokulation herangezogen, da die pathogene PrP-Isoform dort stark akkumulieren kann und daher leicht zu detektieren ist. Bei manchen vCJD-Patienten wurden auch PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen im Appendix festgestellt (Hilton et al., 1998). In einigen Zellen aus lymphatischem Gewebe, vor allem den follikulärendendritischen Zellen und Lymphozyten wird PrP<sup>C</sup> ebenfalls stark exprimiert (McBride et al., 1992).

Da PrP<sup>C</sup> in Säugetieren in fast allen Organen exprimiert wird und zwischen den Tierarten hoch konserviert ist, treten Probleme bei einer eventuellen Immunisierung mit gereinigtem PrP<sup>C</sup> auf, weil es aufgrund von Autotoleranz nicht als fremdes Antigen erkannt wird. Die Autotoleranz wird auch für das Ausbleiben einer entzündlichen Immunantwort bei einer Infektion mit exogenen Prionen verantwortlich gemacht. PrP-Knockout-Mäuse bilden zwar sehr effektiv Antikörper gegen inokuliertes PrP<sup>C</sup> bzw. PrP<sup>Sc</sup>, können aber prinzipiell nicht an Scrapie erkranken, da ihnen das Substrat fehlt. Vor kurzem gelang es, das Gen der schweren Ketten des PrP<sup>C</sup>-spezifischen monoklonalen Antikörpers 6H4, der von Hybridomazellen einer PrP<sup>0/0</sup>-Maus produziert wird, zu klonieren und anschließend transgen in das Genom einer PrP<sup>C</sup>-exprimierenden Maus einzuführen. Die so gezüchtete Maus war intraperitoneal nicht mit Prionen infizierbar und zeigte auch keine charakteristische Akkumulation von PrP<sup>RES</sup> in der Milz und im Hirn (Heppner et al., 2001). Bei diesen Mäusen wurden trotz des gleichzeitigen Vorhandenseins von PrP<sup>C</sup> und eines Antikörpers gegen PrP<sup>C</sup> keine pathologischen Veränderungen festgestellt, die auf eine Autoimmunreaktion hindeuten würden.

### 1.3.3 Struktur und Topologie von PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup>

Die Identifizierung des Leserahmens von PrP<sup>C</sup> ließ verschiedene Vorhersagen über die Sekundärstruktur des resultierenden Proteins zu. Für den N-terminalen Teil von PrP bis Aminosäure (AS) 90 konnte keine definierte Struktur vorhergesagt werden. In dieser Region befinden sich auch die PrP-charakteristischen Octapeptid-Wiederholungen („Octarepeats“), die je nach Tierart 2- bis 14-fach vorhanden sind. Für den C-Terminus von PrP wurden einige Strukturvorhersagen getroffen. So wurden vier  $\alpha$ -helikale Bereiche und einige sehr kurze

$\beta$ -Faltblatt-Strukturen errechnet (Huang et al., 1994). Nachdem die teilweise Aufreinigung von nativem PrP<sup>C</sup> bzw. PrP<sup>Sc</sup> gelang, kamen verschiedene Verfahren zur Strukturanalyse zur Anwendung. Dazu gehörten Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR) (Caughey et al., 1991), Massenspektroskopie (Stahl et al., 1993), sowie Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie. Der Anteil an  $\alpha$ -helikalen Bereichen liegt bei PrP<sup>C</sup> bei 42 %, nur 3 % sind  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen. Dieses Verhältnis verschiebt sich bei der Konversion in PrP<sup>Sc</sup> zu einer von  $\beta$ -Faltblättern dominierten Sekundärstruktur (30 %  $\alpha$ -helikal, 45 %  $\beta$ -Faltblatt) (Pan et al., 1993).



**Abbildung 7:** die errechneten 3-D Modelle der Tertiärstrukturen von PrP<sup>C</sup> (a) und PrP<sup>Sc</sup> (b); während PrP<sup>C</sup> drei  $\alpha$ -Helices aufweist (rot), hat PrP<sup>Sc</sup> mehrheitlich  $\beta$ -Faltblattstruktur (blau). Die Aminosäuresequenzen beider Isoformen sind identisch (entnommen aus Cohen, 1999).

Eine Kristallisierung von PrP<sup>C</sup> oder PrP<sup>Sc</sup> ist bislang nicht gelungen, so dass bislang nur Modelle der 3D-Strukturen existieren (Abbildung 7). Durch die Erzeugung und Aufreinigung von rekombinantem Prion-Protein der Maus (AS 121-231) in *E.coli* konnte dessen Struktur aber mittels Kernresonanz-Spektroskopie (NMR) aufgeklärt werden (Riek et al., 1996). Drei der vier vorhergesagten  $\alpha$ -Helices waren tatsächlich vorhanden. 1997 gelang es derselben Arbeitsgruppe, das Protein in voller Länge (AS 23-231) in Bakterien zu exprimieren und dessen Faltung ebenfalls mittels NMR zu charakterisieren (Riek et al., 1997). Die Struktur der C-terminalen Hälfte wurde dabei bestätigt, es konnte aber keine definierte Struktur für den N-Terminus bis AS 120 nachgewiesen werden, sondern lediglich das Vorliegen eines „random coil“. Daher geht man davon aus, dass dieser Bereich von PrP<sup>C</sup> flexibel ist. Methodisch bedingt kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass *in vivo* in diesem Bereich durchaus eine definierte Struktur vorliegt, möglicherweise im Komplex mit Ionen oder anderen Liganden. Für deren Bindung sind die sogenannten „Octarepeats“ verantwortlich, die fünffach zwischen AS 50 und 90 vorhanden sind und sehr viele Glycin- und Prolinreste sowie je ein Histidin enthalten. Eine weitere mögliche Struktur im N-Terminus könnte eine Poly-L-Prolin Typ-II-Helix (PPII-Helix) sein, deren

Existenz bereits 1997 postuliert wurde (Smith et al., 1997). Tatsächlich weisen neuere Daten darauf hin, dass eine PPII-Helix im PrP<sup>C</sup>-Molekül *in vivo* existiert (Gill et al., 2000). Damit ist zumindest eine Teilstruktur innerhalb des N-terminalen Bereiches von PrP beschrieben.

Mittlerweile wurde auch die NMR-Struktur von rekombinantem PrP anderer Spezies, wie Hamster (Donne et al., 1997), Mensch (Zahn et al., 2000) und Rind (Lopez et al., 2000) veröffentlicht. Obwohl einige Abweichungen in der Länge der  $\alpha$ -Helices bestehen, gibt es keinen prinzipiellen Unterschied zwischen den bekannten PrP<sup>C</sup>-Strukturen. Es existieren einige Variationen zwischen den Spezies, die für die beobachtete „Spezies-Barriere“ verantwortlich zu sein scheinen, welche die Übertragung von Prionen einer Tierart zur anderen erschwert. Da nach den derzeitigen Modellen der Prion-Replikation ein direkter Kontakt zwischen PrP<sup>Sc</sup> und PrP<sup>C</sup> nötig ist, könnten die Strukturunterschiede die Interaktion zwischen zwei heterologen PrP-Molekülen aus verschiedenen Spezies und damit die Umfaltungswahrscheinlichkeit verringern. Trotz intensiver Bemühungen wurden noch keine gesicherten 3D-Strukturdaten für die Scrapie-Isoform PrP<sup>Sc</sup> erhalten, so dass man noch immer auf computerberechnete Modelle angewiesen ist.

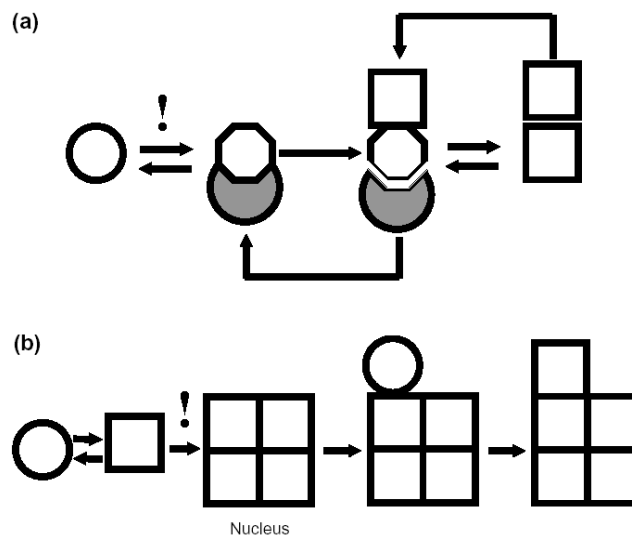
### 1.4 Modelle der Prion-Replikation

Da Prionen offenbar keine Nukleinsäure als Informationsträger besitzen/benutzen, müssen andere Faktoren für deren Vermehrung verantwortlich sein. Man geht davon aus, dass die „Information“ über die entsprechende Faltung, d.h. Tertiärstruktur des PrP<sup>Sc</sup>-Moleküls, durch eine Protein-Protein-Interaktion weitergegeben wird. Dabei wird die vorwiegende  $\beta$ -Faltblatt-Struktur von PrP<sup>Sc</sup> auf vorhandenes  $\alpha$ -helikales PrP<sup>C</sup> über einen nicht bekannten Mechanismus übertragen und es kommt zu einem direkten Kontakt zwischen PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup>. Zur Zeit gibt es mehrere Hypothesen, welche die Vermehrung bzw. Entstehung von Prionen zu erklären versuchen. Zwei davon haben die größte Anhängerschaft und werden im folgenden beschrieben (Abbildung 8).

#### 1.4.1 Heterodimer-Modell

Das Heterodimer-Modell wurde von Stanley Prusiner verfasst (Prusiner et al., 1990) und geht davon aus, dass PrP<sup>C</sup> im Gleichgewicht mit einer metastabilen Konformation (PrP<sup>\*</sup>) steht. Dabei ist der Übergang in den metastabilen Zustand energetisch stark erschwert. PrP<sup>\*</sup> bindet dann an einen unbekanntem Faktor, der Faktor X genannt wird, und den metastabilen Zustand stabilisiert. Mit dem PrP<sup>\*</sup> in diesem Komplex interagiert ein Molekül PrP<sup>Sc</sup> und es entsteht zunächst ein Heterodimer, das nach Konversion wieder in zwei PrP<sup>Sc</sup> Monomere zerfällt. Diese können wieder weiteres PrP<sup>C</sup> bzw. PrP<sup>\*</sup> konvertieren. Prinzipiell würde hierbei ein einziges Molekül PrP<sup>Sc</sup> ausreichen, um eine Kettenreaktion in Gang zu bringen. Die Beteiligung eines weiteren Faktors

ist eine gute Erklärung dafür, warum die Übertragung von Prionen einer Spezies auf eine andere erschwert ist. Wenn dieser Faktor präferenziell  $\text{PrP}^C$  der eigenen Spezies erkennt und in  $\text{PrP}^*$  überführt bzw. stabilisiert, kann  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  einer fremden Art u.U. schlechter binden. Das macht sich durch eine verlängerte Inkubationszeit bemerkbar. Danach ist genügend „neues“  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  vorhanden, um für die eigene Spezies infektiös zu sein: wenn Prionen aus solch einem Tier weiter passagiert werden, so sinkt die Zeit bis zur symptomatischen Phase wieder, da dann nur noch arteigenes  $\text{PrP}^C/\text{PrP}^{\text{Sc}}$  einschließlich arteigenem Faktor X beteiligt sind.



**Abbildung 8:** die beiden vorherrschenden Modelle der Prion-Replikation: **a)** das Heterodimer-Modell; **b)** das Keimbildungsmodell;  $\text{PrP}^C$  ist als Kreis dargestellt,  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  als Rechteck; das metastabile  $\text{PrP}^*$  ist achteckig abgebildet und der Faktor X grau unterlegt; der kinetisch entscheidende Vorgang ist jeweils mit (!) markiert. (modifiziert nach Harris, 1999)

### 1.4.2 Das Keimbildungs-Modell

Das Keimbildungs-Modell wurde von Lansbury verfasst und wird auch Nukleations- oder Polymerisationsmodell genannt (Jarrett und Lansbury, 1993). Hierbei wird davon ausgegangen, dass ein natürliches Gleichgewicht zwischen den Isoformen  $\text{PrP}^C$  und  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  besteht, d.h. die Konversionsreaktion ist reversibel, wobei im Normalzustand die  $\text{PrP}^C$ -Konformation stark begünstigt ist. Die  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ -Monomere können sich aber zusammenlagern und dadurch gegenseitig stabilisieren. Nur wenn eine kritische Masse an  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  gebildet wird (eine Art Kristallisationskeim), verschiebt sich das Gleichgewicht zu Gunsten von  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  und der „Kristall“ wächst durch stetige Anlagerung von  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ -Monomeren. Der kinetisch entscheidende Schritt ist hierbei nicht die Bildung eines  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ -Moleküls, sondern die Bildung des Keims.

Dieses Modell eignet sich gut zur Erklärung des Auftretens von „Strains“, d.h. Prion-Erkrankungen, die zwar *per se* aus denselben  $\text{PrP}^C$ -Vorläufermolekülen gebildet werden, aber biophysikalisch und pathologisch unterscheidbar sind. Dazu gehört, dass Ablagerungen in

unterschiedlichen Hirnregionen zu finden sind, was zu veränderten Symptomen führt. Auch das Glykosylierungsmuster von verschiedenen PrP<sup>Sc</sup>-Strains zeigt deutliche Unterschiede. Erklärbar ist dies durch die Bildung unterschiedlicher Kristallisationskeime, die zur Bildung verschiedenartiger PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen führen. Dies ist grob vergleichbar mit der unterschiedlichen Kristallbildung bei Schneeflocken.

Dadurch kann plausibel erklärt werden, dass ein Tier auch mit mehreren Strains gleichzeitig infiziert sein kann, da die unterschiedlichen Keime nebeneinander existieren können.

Beide Modelle konnten *in vivo* nicht bestätigt werden, da es noch immer nicht gelungen ist, infektiöses PrP<sup>Sc</sup> *de novo* zu erzeugen. Die *in vitro* Konversion von PrP<sup>C</sup> in PK-resistentes PrP (sog. PrP<sup>RES</sup>) wurde aber bereits erfolgreich durchgeführt (Kocisko et al., 1994). Dabei wird radioaktiv markiertes PrP<sup>C</sup> mit nicht radioaktivem PrP<sup>Sc</sup> co-inkubiert und anschließend mit Proteinase K behandelt. Die anschließend autoradiografisch detektierbaren Banden kommen ausschließlich vom zugegebenen Substrat. Da aber ein Überschuss an infektiösem PrP<sup>Sc</sup> von vornherein vorliegt, lassen sich diese Modelle nicht für Pathogenitätsstudien von so neu erzeugten Prionen in Tieren verwenden. Auch die rein chemische Konvertierung von rekombinantem PrP zu einer von  $\beta$ -Faltblättern dominierten Struktur ist möglich. Die so erzeugte PrP-Struktur zeigt zwar eine Resistenz gegenüber Proteinase K, ist aber in Tierversuchen nicht infektiös.

### 1.4.3 Der Faktor X und die Speziesbarriere

Es gibt starke Hinweise darauf, dass für die Konversion von PrP<sup>C</sup> in PrP<sup>Sc</sup> nicht nur eine direkte Interaktion der beiden Protein-Isoformen nötig ist, sondern weitere Faktoren im Spiel sind. Eine Maus, die mit Hamster-Prionen infiziert wird, erkrankt nicht, außer wenn von ihr zusätzlich transgenes Hamster-PrP<sup>C</sup> exprimiert wird (Scott et al., 1989). Daher scheint zumindest noch ein weiteres Protein an der Umfaltung beteiligt zu sein. Es scheint sogar eine Inhibition zu erfolgen, da transgene Mäuse, die neben endogenem murinem PrP noch zusätzlich menschliches PrP exprimieren, nicht erkranken, wenn sie mit CJD infiziert werden. Erfolgt aber eine Inokulation von human-transgenen Mäusen, die ausschließlich humanes ohne endogenes murines PrP<sup>C</sup> exprimieren, so werden sie krank. Daraus wurde gefolgert, dass ein Faktor existiert, welcher präferenziell an das Prion-Protein der eigenen Spezies bindet, und dieses dadurch vor der Konversion durch „artfremde“ Prionen schützt (Telling et al., 1995). Ist kein arteigenes PrP<sup>C</sup> vorhanden, hat dieser Faktor keinen Einfluss. Um die Bindungsregion näher einzugrenzen, wurden in Mäusen chimäre PrP-Konstrukte mit humanen und murinen Bereichen exprimiert und diese jeweils mit CJD infiziert. Dies ermöglichte die Eingrenzung des möglichen Bindeepitops für den Faktor X im C-terminalen Bereich von PrP (Kaneko et al., 1997). Ob es sich bei dem Faktor um ein Protein oder eine andere zelluläre Komponente handelt, ist nicht bekannt. Auf jeden Fall



scheint dieser Faktor aber hochspezifisch in der Lage zu sein, die relativ geringen Abweichungen zwischen den Aminosäuresequenzen von PrP<sup>C</sup> verschiedener Spezies zu erkennen, obwohl das Prion-Protein hoch konserviert ist. Möglicherweise ist dies auch der fehlende Faktor, der zur *in vitro* Erzeugung von infektiösem PrP<sup>Sc</sup> unbedingt nötig ist, aber bislang noch nicht identifiziert werden konnte.

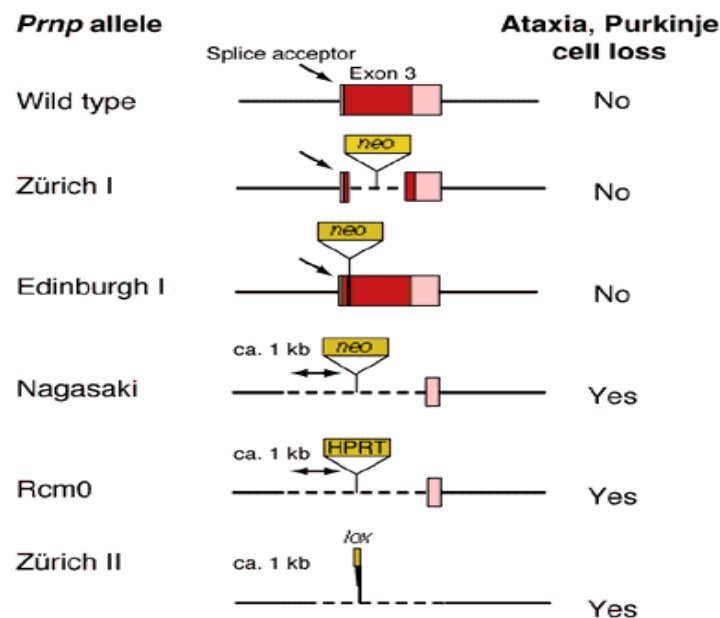
### 1.5 PrP-Knockout-Mäuse und Doppel

Das gezielte Deletieren eines Gens ist ein etablierter und oft erfolgreicher Weg, um die Funktion des codierten Proteins zu untersuchen. Nach der Identifizierung des *prnp*-Gens wurde daher von unabhängigen Forscherteams versucht, Mäuse ohne endogene Expression des Prion-Proteins zu erzeugen. Man ging davon aus, dass diese Mäuse einen beobachtbaren Phänotyp aufweisen, der Rückschlüsse auf die Funktion des Prion-Proteins zulässt. Der Arbeitsgruppe von Charles Weissmann gelang es 1992 erstmals, lebensfähige Mäuse ohne PrP<sup>C</sup>-Expression zu züchten (Bueler et al., 1992). Überraschenderweise lebten die Mäuse jedoch völlig normal. Unabhängig von der Inokulationsroute (oral, intraperitoneal oder intrazerebral) erkrankten sie jedoch nie an Scrapie (Bueler et al., 1993).

Dieser "Zürich I" genannte PrP<sup>0/0</sup>-Mäusestamm, wie auch der später in Schottland erzeugte "Edinburgh" PrP<sup>0/0</sup>-Stamm (Manson et al., 1994) waren klinisch unauffällig und zeigten nur in höherem Alter neurophysiologische Veränderungen und Demyelinisierung in peripheren Nerven. Ein dritter PrP<sup>0/0</sup>-Stamm aus Japan ("Nagasaki") entwickelte spontan nach 6-12 Monaten Ataxie und zeigte einen Verlust an Purkinje-Zellen im Kleinhirn (Sakaguchi et al., 1996). Durch die transgene Einführung eines Cosmids, welches für PrP<sup>C</sup> codierte, konnten die Symptome verhindert werden. Daraus wurde geschlossen, dass der beobachtete Phänotyp direkt mit dem Verlust von PrP<sup>C</sup> zusammenhängt (Nishida et al., 1999). Zwischenzeitlich wurden zwei weitere Knockout-Stämme erzeugt. Diese erhielten die Bezeichnung "Zürich II" (Rossi et al., 2001) und "Rcm0" (Moore et al., 1999). Auch diese zeigten Ataxie. Ein Vergleich zwischen den verschiedenen Knockout-Strategien (Abbildung 9) zeigt, dass bei den Zürich I und Edinburgh I Mäusen eine Neomycin-Resistenz-Cassette in den proteincodierenden Bereich von Exon 3 inseriert bzw. homolog rekombiniert wurde. Bei den restlichen Mäusestämmen wurde der komplette Leserahmen (ORF) von PrP und zusätzlich noch flankierende DNA-Bereiche deletiert. Alle die Stämme, bei denen auch flankierende Bereiche deletiert waren, zeigten pathologische Veränderungen. Daher führt offenbar nicht das Fehlen von PrP<sup>C</sup> zu den Symptomen, sondern ein anderer Mechanismus.

Die phänotypisch unauffälligen PrP<sup>0/0</sup>-Mäuse wurden mit verschiedenen Methoden auf physiologische Besonderheiten untersucht. Auf neuronaler Ebene wurde eine Beeinträchtigung von synaptischen GABA- und Dopamin-Rezeptoren beobachtet (Collinge et al., 1994). Die

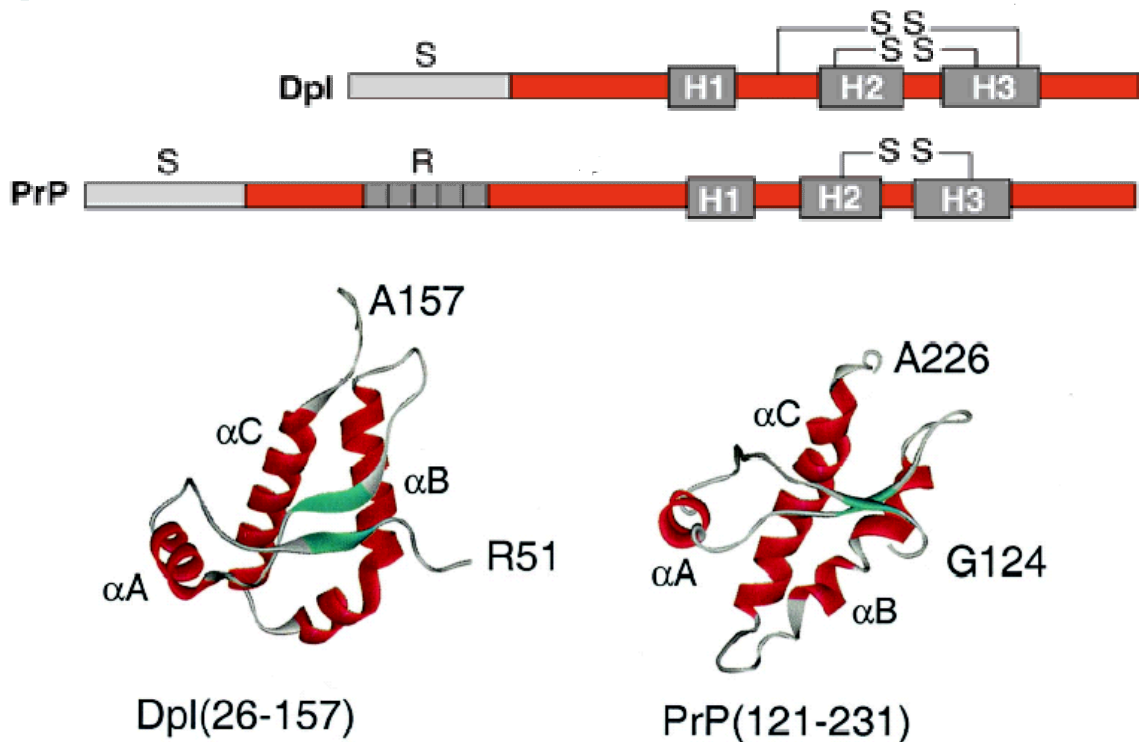
rezeptorvermittelte schnelle Hemmung war daher geschwächt, die langfristige Potenzierung (LTP) vermindert und  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte  $\text{K}^+$ -Ströme unterbrochen (Colling et al., 1996). Durch Einführung eines humanen PrP-Allels konnte die LTP wieder rekonstituiert werden (Whittington et al., 1995). Andere Gruppen konnten diese neurophysiologischen Beobachtungen allerdings nicht reproduzieren (Lledo et al., 1996). Der Nagasaki-Mausstamm zeigte koordinative Störungen in höherem Lebensalter (Sakaguchi et al., 1996). Die teilweise widersprüchlichen Resultate könnten an dem abweichenden genetischen Hintergrund oder dem unterschiedlichen Alter der Mäuse liegen. In den zuletzt beschriebenen Mäusen wurde ein Protein entdeckt, das durch die Art des PrP-Knockouts im Hirn überexprimiert wird, jedoch in Wildtyp-Mäusen dort nicht vorkommt. Nähere Analysen ergaben, dass bei den betroffenen Mausstämmen ein Splice-Akzeptor fehlte, was zur Bildung einer mRNA führte, durch die ein weiter 3' gelegenes Genprodukt unter der Kontrolle des PrP-Promotors exprimiert wurde. Weitere Untersuchungen ergaben, dass das entsprechende Protein auf Aminosäureebene eine Sequenzhomologie von 35 % zu  $\text{PrP}^{\text{C}}$  besitzt, weshalb es „Doppelgänger“ bzw. kurz Doppel (Dpl) genannt wurde. Das korrespondierende Gen *prnd* befindet sich ca. 16 kbp abwärts von *prnp*. Vermutlich entstanden diese beiden Proteine durch eine evolutiv frühe Duplikation eines *prnp/prnd*-Vorläufergens, das sich danach divergent entwickelte.



**Abbildung 9:** die verschiedenen Strategien zur Deletion des Prion-Gens in Mäusen. Die beiden Mausstämme Zürich I und Edinburgh I wurden durch Unterbrechung des PrP-Leserahmens erzeugt; bei den restlichen Stämmen wurden größere DNA-Fragmente mittels verschiedener experimenteller Ansätze deletiert. Diese zeigen Ataxie und Absterben von Purkinje-Zellen (entnommen aus Weissmann und Aguzzi, 1999)

Beide Proteine besitzen drei  $\alpha$ -Helices (Abbildung 10), wobei die für  $\text{PrP}^{\text{C}}$  charakteristischen Octarepeats bei Doppel fehlen und das Protein somit strukturell etwa dem C-Terminus von  $\text{PrP}^{\text{C}}$

entspricht. Ein N-terminales Signalpeptid zur Dirigierung der Translation ins Endoplasmatische Retikulum ist ebenso vorhanden wie eine C-terminale Sequenz, die zu einer GPI-Verankerung führt.



**Abbildung 10: oben** ein Vergleich der Sekundärstrukturen von Doppel (Dpl) und dem Prion-Protein (PrP) zeigt, dass Doppel prinzipiell wie der C-terminale Teil von PrP aufgebaut ist. Beide besitzen ein N-terminales Signalpeptid (S) und drei  $\alpha$ -Helices (H1-H3); Doppel ist in der Lage, zwei Disulfidbrücken (S-S) auszubilden und enthält keine Octapeptid-Repeats (R), die in PrP vorhanden sind. **unten** Die Tertiärstrukturen von Doppel und PrP weisen ebenfalls eine hohe strukturelle Ähnlichkeit auf (entnommen aus Mo et al., 2001).

Mittlerweile wurde Doppel rekombinant exprimiert und dessen Struktur mittels NMR untersucht (Lu et al., 2000). PrP und Dpl haben auch in ihrer Tertiärstruktur erhebliche Übereinstimmungen. Diese Ähnlichkeit könnte auch dazu führen, dass teilweise die gleichen Liganden mit den beiden Proteinen interagieren. Demnach wäre eine mögliche Erklärung der pathogenen Symptome bei den betroffenen PrP-Knockout-Mäusen, dass Doppel mit einem Prion-Bindungspartner interagiert, ohne dass Doppel die Funktion des abwesenden PrP<sup>C</sup> übernehmen kann.

Die Untersuchung der Doppel-Sequenz von sporadischen CJD-Patienten führte zur ersten Entdeckung eines Polymorphismus im Dpl-Gen (Peoc'h et al., 2000). Es besteht aber offenbar kein Zusammenhang mit dem Krankheitsverlauf (Mead et al., 2000). Ob Doppel auch eine Rolle bei der Pathogenese von Prion-Krankheiten spielt, wird zur Zeit mit Doppel-Knockout Mäusen untersucht. Vorläufige Ergebnisse wurden mittels „Neurografting“ von Dpl/PrP<sup>+</sup>-Zellen ins Gehirn von PrP<sup>0/0</sup>-Mäusen gewonnen. Bei intrazerebraler Inokulation weisen die Doppel-Knockout-Zellen die gleichen pathogenen Veränderungen auf, die auch bei PrP<sup>+/+</sup>-Neurografts

(siehe unten) in Knockout-Mäusen beobachtbar sind (Behrens et al., 2001). Dies deutet darauf hin, dass Doppel keinen inhibierenden Einfluss auf den Verlauf einer Prion-Infektion hat.

Der retrograde Transport von Prionen ins Zentralnervensystem (ZNS) und schließlich ins Gehirn ist ebenfalls auf PrP-exprimierendes Gewebe angewiesen. Dies konnte durch sog. „Grafting“ nachgewiesen werden. Dabei wurden einer PrP<sup>0/0</sup>-Maus Hirngewebe oder B/T-Zellen von Wildtyp-Mäusen eingepflanzt, wodurch eine lokale Expression von PrP<sup>C</sup> ausschließlich in den gewünschten Organen auftrat. Die intrazerebrale Inokulation mit Prionen von Knockout-Mäusen, denen ein zerebraler „Neurograft“ aus PrP<sup>+/+</sup>-Gewebe postnatal eingepflanzt worden war, führte zu den typischen Scrapie-Symptomen in dem PrP-exprimierenden Gewebe, ohne jedoch die umgebenden Bereiche zu betreffen (Brandner et al., 1996). Inokulation dieser Mäuse über die Peripherie (z.B. oral oder intraperitoneal) führt weder zu einer Erkrankung noch zu einer nachweisbaren Menge an Proteinase K-resistentem PrP<sup>Sc</sup> im ZNS.

Mittlerweile ist es möglich, auch in höheren Tieren wie Rindern und Schafen ausgesuchte Gene zu deletieren. Im Falle von PrP könnte dies zur Züchtung resistenter Nutztiere führen. Kürzlich gelang die erfolgreiche Erzeugung von PrP-Knockout-Schafen (Denning et al., 2001). Es sich noch herausstellen, ob sie tatsächlich gegen Scrapie resistent sind. Nach allen vorliegenden Daten, die allerdings alle mit Mäusen erhalten wurden, sollte dies der Fall sein.

### 1.6 Mögliche Funktionen des zellulären Prion-Proteins

Bei Untersuchungen von rekombinant exprimiertem PrP wurde festgestellt, dass das Prion-Protein in der Lage ist, Cu<sup>2+</sup>-Ionen zu binden (Hornshaw et al., 1995). Die Bindung von Kupfer an PrP konnte später auch *in vivo* gezeigt werden (Brown et al., 1997a). Weitere Experimente ergaben, dass die N-terminal vorliegenden „Octarepeats“, bzw. die dort gehäuft vorkommenden Histidine maßgeblich an der Kupfer-Bindung beteiligt sind (Stockel et al., 1998). Stöchiometrische Studien legen nahe, dass es sich um eine koordinative Bindung von 2 Cu<sup>2+</sup>-Ionen durch 4 Octarepeats handelt. Dabei vollzieht sich auch eine strukturelle Änderung des N-Terminus, der ohne Ionenbindung keine nachweisbare Struktur besitzt. Es ist allerdings noch nicht gelungen, genaue 3D-Daten mit gebundenen Cu<sup>2+</sup>-Ionen zu erhalten, da solche Ionen die Analyse mittels NMR verhindern. Kürzlich wurde auch eine Cu-Bindung des C-terminalen Teils von PrP<sup>C</sup> ab Aminosäure 90 festgestellt, jedoch mit weitaus geringerer Affinität (Cereghetti et al., 2001).

Neuronen von PrP<sup>0/0</sup>-Mäusen sind gegenüber oxidativem Stress empfindlicher als Wildtyp-Neuronen (Brown et al., 1997b). Sie weisen sowohl eine geringere Konzentration von Cu<sup>2+</sup>-Ionen an synaptischen Membranen, als auch eine reduzierte Cu/Zn Superoxid-Dismutase-(SOD)-Aktivität auf. Daraus wurde gefolgert, dass das Prion-Protein die Funktion einer SOD besitzt.

Dies könnte zum Schutz der Neuronen gegen eine zu hohe Cu-Konzentration an der Synapse und dadurch katalysierte freie Sauerstoffradikale dienen.

Ein gestörter zirkadianer Rhythmus wurde bei allen untersuchten PrP-Knockout Mäusestämmen beobachtet (Tobler et al., 1996), was auf eine regulatorische Funktion von PrP<sup>C</sup> für die Einstellung auf einen geregelten Tag-Nacht-Zyklus hindeutet. Welche weiteren Faktoren dabei involviert sind, konnte nicht geklärt werden.

**Tabelle 4:** Zusammenfassung der publizierten putativen PrP-Interaktoren

<i>Mit PrP interagierendes Protein (bzw. Homologie)</i>	<i>Referenz</i>
Pli 110 (PSF) Pli 45 (GFAP)	(Oesch et al., 1990)
Pli 110 Pli 125	(Oesch, 1994)
Bcl-2 PrP	(Kurschner und Morgan, 1996)
Hsp 60	(Edenhofer et al., 1996)
37 kD-LRP	(Rieger et al., 1997)
66 kDa-Membranprotein	(Martins et al., 1997)
Aplp-1 Nrf2	(Yehiely et al., 1997)
Caveolin-1	(Mouillet-Richard et al., 2000)
Laminin	(Graner et al., 2000)
Dystroglycan	(Keshet et al., 2000)

### 1.7 Beschriebene PrP-Interaktoren

Um etwas über den metabolischen Kontext des Prion-Proteins zu erfahren, wurde von vielen Arbeitsgruppen versucht, potentielle Interaktoren zu identifizieren. Diverse experimentelle Ansätze führten zur Entdeckung verschiedener mehr oder weniger gut charakterisierter Proteine, welche in Wechselwirkung mit PrP<sup>C</sup> bzw. PrP<sup>Sc</sup> treten können (Tabelle 4). Dabei wurde als Sonde entweder gereinigtes PrP<sup>Sc</sup> oder Fusionskonstrukte zwischen PrP und anderen Proteinanteilen verwendet (Tabelle 5).

Die Gruppe von Bruno Oesch konzentrierte sich auf biochemische Analysen, die mit teilweise gereinigten Hamster-Prionen durchgeführt wurden (Oesch et al., 1990). Hamster-PrP<sup>C</sup> und Hamster-PrP<sup>Sc</sup> wurden radioaktiv markiert und als Sonde auf einem Western Blot aus elektrophoretisch aufgetrennten Hamsterhirnproteinen verwendet. Zwei Proteine mit hoher Affinität zu beiden Isoformen von PrP wurden isoliert (Pli45 und Pli110) und N-terminal ansequenziert. Pli 45 wies ein Molekulargewicht von 45 kDa auf und hatte hohe Homologie zum

Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP). Dieses Protein wird zur histologischen Diagnose von Gliosen verwendet, da es bei diesen neuronalen Symptomen verstärkt detektierbar ist. Der Krankheitsverlauf von GFAP<sup>0/0</sup>-Mäusen nach Infektion mit Prionen unterscheidet sich allerdings nicht von dem bei Wildtyp-Mäusen. Dies deutet darauf hin, dass diese Interaktion zumindest für die Pathogenese keine Rolle spielt. Das Protein Pli110 war homolog zu dem PTP-assoziierten Splicefaktor (PSF). Nachdem solche Faktoren ausschließlich im Zellkern vorkommen ist zweifelhaft, ob die Interaktion auch *in vivo* zustande kommt. Welche Gene durch diese Interaktion reguliert wären, ist ebenfalls nicht bekannt.

Derselbe experimentelle Ansatz wurde von Bruno Oesch ein zweites Mal verwendet (Oesch, 1994), diesmal mit gereinigtem PrP<sup>C</sup> und synthetischen PrP-Peptiden. Diesmal wurden ein 110 kDa und ein 145 kDa Protein identifiziert, welche offenbar membranständig sind. Näheres ist über diese Proteine nicht bekannt.

Ein ähnliches Prinzip wurde von der Arbeitsgruppe von F. Yehiely (Yehiely et al., 1997) gewählt. Hier wurde ebenfalls ein Overlay-Assay verwendet, jedoch kam ein Fusionsprotein zwischen PrP und alkalischer Phosphatase zum Einsatz, was sowohl die Detektion als auch die Expression erleichterte. Darüber hinaus wurde nicht authentisches Hirnlysat verwendet, sondern eine cDNA-Bibliothek aus Hirn, die mittels eines „phage display“-Systems exprimiert wurde. Positive Signale bei der Hybridisierung führten zur Isolierung von mehreren cDNA-Klonen, von denen die meisten für unbekannte Proteinsequenzen codierten. Zwei der Liganden waren allerdings zu beschriebenen Proteinen homolog. Eines davon wurde als das Amyloid-Precursor-Like Protein 1 (Aplp-1) identifiziert. Dieses Protein ist einer der möglichen Vorläufer des Amyloid-Proteins, das bei der Alzheimer Erkrankung eine maßgebliche Rolle spielt. Da sowohl PrP<sup>C</sup>, als auch Aplp-1 membranständige Proteine sind, könnte eine Interaktion tatsächlich auch *in vivo* auftreten. Welche Funktion eine solche Interaktion hat, wurde nicht geklärt. Auch wurde keine Copräzipitation der beiden Proteine gezeigt. Der zweite identifizierte Interaktor war homolog für den p45-NF-E2 related factor (Nrf2). Dieses Protein ist ein Transkriptionsfaktor, der offenbar eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Genen entgiftender Proteine spielt (Chan und Kan, 1999). Dazu gehören die Superoxid-Dismutase (SOD), Katalase und Glutathion-S-Transferase (GST). Da für PrP<sup>C</sup> ebenfalls eine Schutzfunktion gegen oxidativen Stress postuliert wird, könnte durchaus auch *in vivo* ein Zusammenhang zwischen PrP und der Regulation dieser Proteine bestehen. Erneut ist aber fraglich wie und ob PrP in den Zellkern gelangt, bzw. ob Nrf2 außerhalb des Nucleus vorkommt. Eine Veröffentlichung berichtet von einer intrinsischen DNA-bindenden Eigenschaft von PrP<sup>C</sup> ohne zusätzliche Faktoren (Gabus et al., 2001). Ob PrP<sup>C</sup> in den Zellkern kommen kann, um dort transaktivierend zu wirken, konnte bei diesen Versuchen nicht gezeigt werden.

Zwei Arbeitsgruppen wählten einen Yeast-Two-Hybrid-Assay als Ansatz einer Interaktorensuche aus. Kurschner und Morgan suchten Bindungspartner von Bcl-2 in einer Kleinhirn-Proteinbank und fanden dabei das Prion-Protein (Kurschner und Morgan, 1996). Bcl-2 gehört zu einer Proteinfamilie, die eng mit Apoptose verknüpft ist. Bcl-x<sub>s</sub> wirkt proapoptotisch, wohingegen das identifizierte Bcl-2 einen anti-apoptotischen Effekt hat. Da prion-infizierte Zellen Apoptose zeigen, könnte daher PrP<sup>C</sup> eine antiapoptotische Funktion haben, die in infizierten Zellen nicht mehr ausgeübt werden kann. Bei weiteren Experimenten zeigte diese Arbeitsgruppe auch eine direkte Interaktion zwischen zwei PrP-Proteinen in Hefe.

Die Arbeitsgruppe von S. Weiss verwendete einen LexA-basierten Yeast-Two-Hybrid-Assay mit einem Fusionsprotein aus Glutathion-S-Transferase und Hamster-PrP, um Interaktoren in einer menschlichen HeLa cDNA-Bank zu isolieren. Dabei konnten sie das Chaperon Hsp60 (Edenhofer et al., 1996) und den 37 kDa-Laminin-Rezeptor-Vorläufer LRP (Rieger et al., 1997) als potentielle PrP-Bindungspartner ermitteln. Während Hsp60 ein Protein ist, das zu einer korrekten Faltung von Proteinen beiträgt, ist die Funktion des 37 kD-LRP nicht bekannt und es existieren auch keine Knockout-Modelle. Die Autoren postulieren eine mögliche Rezeptorfunktion des LRP bei der Aufnahme von Prionen in die Zelle. Interessanterweise wurde Laminin ebenfalls als möglicher Bindungspartner von PrP beschrieben und eine Rolle dieser Interaktion bei der Bildung von Neuriten postuliert (Graner et al., 2000). Dieselbe Arbeitsgruppe publizierte auch ein nicht näher charakterisiertes 60-kDa Membranprotein, das mittels komplementärer Hydrophathie als PrP-assoziiertes Protein entdeckt wurde (Martins et al., 1997). Auffällig ist, dass bei einigen Versuchsansätzen nicht darauf geachtet wurde, Gewebe zu untersuchen, in dem PrP tatsächlich stark exprimiert wird; zum Teil stammte auch die Kombination aus PrP und cDNA-Bibliothek nicht aus derselben Spezies.

**Tabelle 5:** Die in den publizierten Arbeiten verwendeten PrP-Konstrukte und cDNA/Protein-Banken

<i>Sonde bzw. „Köderprotein“</i>	<i>Protein-Bibliothek („Beute“)</i>	<i>Referenz</i>
Maus Bcl-2 (Maus PrP)*	Maus Kleinhirn cDNA	(Kurschner und Morgan, 1996)
GST::PrP Syrischer Hamster	HeLa (Human) cDNA	(Edenhofer et al., 1996)
Alk.Phosphatase::PrP Maus	Maus Hirn ( $\lambda$ -Bibliothek)	(Yehiely et al., 1997)
gereinigtes PrP 27-30 <sup>†</sup> aus Hamster	Hamster Hirnhomogenat	(Oesch et al., 1990)
synthetische PrP-Peptide	Hamster Hirnhomogenat	(Oesch, 1994)
PrP Maus	Maus Hirn cDNA	diese Arbeit

\* in diesem Versuch wurden Interaktoren von Bcl-2 gesucht und dabei PrP identifiziert

<sup>†</sup> diese Experimente wurden mit gereinigtem radioaktiv markiertem Hamster-Scrapie durchgeführt

### 1.8 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die Funktion des zellulären Prion-Proteins ist trotz zahlreicher biochemischer und genetischer Experimente noch immer nicht geklärt. Insbesondere der erfolglose Versuch, durch Deletion des PrP-Gens die Funktion des korrespondierenden Proteins herauszufinden, macht alternative Ansätze nötig.

Ein möglicher Weg ist die Identifizierung von Proteinen, welche mit dem zellulären Prion-Protein interagieren können. Dazu wurde in der vorliegenden Arbeit ein „Yeast-Two-Hybrid“-System verwendet, um eine Proteinbibliothek nach potenziellen PrP-Interaktoren zu durchsuchen. Um eine möglichst erfolgversprechende Kombination zu verwenden, wurden mehrere Faktoren berücksichtigt. Dazu gehörten:

- a) die Verwendung einer „homologen“ Kombination von Maus-PrP und Maus-cDNA-Bank
- b) die Verwendung einer cDNA-Bibliothek aus Mäusehirn, da PrP<sup>C</sup> in neuronalem Gewebe hoch exprimiert wird.
- c) der Verzicht auf zusätzliche Fusionsanteile, wie z.B. Glutathion-S-Transferase (GST) oder Alkalische Phosphatase (AP).

Die identifizierten Interaktionen mit PrP sollten daraufhin mittels alternativer experimenteller Ansätze in Säugetierzellen bestätigt werden. Desweiteren sollte die Bindungseigenschaften und mögliche physiologische Funktionen der PrP-Interaktoren untersucht und charakterisiert werden.



## 2 Material & Methoden

### 2.1 Kultivierung von Mikroorganismen und Säugetierzellen

#### 2.1.1 Bakterienkulturen

##### 2.1.1.1 Verwendete Bakterienstämme

Zur Plasmidamplifizierung wurden nach Bedarf die *E.coli*-Bakterienstämme XL1Blue, Top 10 und DH5 $\alpha$  verwendet. Die cDNA-Bank lag als Plasmide in transformierten DH5 $\alpha$  vor.

##### 2.1.1.2 Kultivierung von Bakterien

Die Aufzucht von Bakterien in Flüssigkultur erfolgte durch Animpfen einer Einzelkolonie in autoklaviertes LB-Medium, dem entsprechende Antibiotika zugesetzt wurde. Die Vermehrung bei 37° C wurde über Nacht bzw. für mindestens 8 Std. unter ständigem Schütteln bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0.6 bis 0.8 durchgeführt.

Zur Isolierung bzw. Erzeugung von Einzelkolonien wurden Bakteriensuspensionen mittels eines Glasspatels homogen in einer Petrischale mit LB-Festmedium mit geeignetem Antibiotikum verteilt oder mit Hilfe einer Impföse ein Reinigungsausstrich durchgeführt. LB-Agarplatten wurden nach demselben Rezept wie LB-Flüssigmedium hergestellt, jedoch der Suspension vor dem Autoklavieren 15g/l Agar zugesetzt.

##### **LB-Medium/Agar**

(Bacto Agar	15 g)
Bacto Trypton	10 g
Bacto Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
ad 1 l mit Aqua dest	

##### 2.1.1.3 Bestimmung der Zelldichte

Die Zellzahl in Flüssigmedium wurde photometrisch durch die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm ermittelt. Die Messung erfolgte in 1 ml Kuststoffküvetten. Als Leerwert wurde unbeimpftes Medium verwendet.

##### 2.1.1.4 Dauerkulturen

Zur Aufbewahrung der Bakterien wurden 1 ml Aliquots einer dichten Flüssigkultur (OD<sub>600</sub> über 0.8) mit 400  $\mu$ l sterilem Glycerin vermischt und in 1.5 ml Reaktionsgefäße mit Schraubdeckel überführt. Diese konnten für eine beliebige Zeit bei -80 ° C gelagert werden.

### 2.1.2 Hefekulturen

#### 2.1.2.1 Verwendete Hefestämme

Für die Durchführung des Yeast-Two-Hybrid-Screens wurde der *Saccharomyces cerevisiae* Hefestamm Y190 verwendet (Harper et al., 1993). Der Hefestamm trägt Mutationen in den Genen *trp1*, *leu2* und *his3*, wodurch er nicht in der Lage ist, die entsprechenden Aminosäuren Tryptophan, Leucin und Histidin *de novo* zu synthetisieren. Desweiteren besitzt der Stamm eine natürliche Resistenz gegenüber Cycloheximid. In sein Genom wurden ihm stabil Gene für die Expression von HIS3 und lacZ inseriert, die allerdings nicht unter der Kontrolle der entsprechenden Wildtyp-Promotoren stehen, sondern hinter einen durch die Wechselwirkung der untersuchten Proteine induzierbaren Gal4-Promotor kloniert wurden.

Zur Bestätigung der identifizierten Interaktionen, sowie zur direkten Testung einer definierten Protein-Protein-Wechselwirkung kam der Hefestamm Y187 zum Einsatz (Flick und Johnston, 1990). Dieser besitzt dieselben Auxotrophiemarker wie Y190, die Promotorregionen der Reportergene HIS3 und lacZ sind jedoch so modifiziert, dass deren Expression stringenter reguliert wird und keine Basalexpression auftritt.

#### 2.1.2.2 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Glycerinkulturen der verwendeten Hefestämme wurden zunächst auf YPD-Agarplatten ausgestrichen und bei 30° C bis zur Bildung von Kolonien mit ca. 2 mm Durchmesser inkubiert. Von diesen Platten erfolgte die Animpfung der Flüssigmedien. Die Anzucht von *S.cerevisiae* vor der Transformation mit DNA erfolgte in YPD-Medium.

##### **YPD-Vollmedium**

Pepton	20 g
Hefeextrakt	10 g
pH ad 5.8	
ad 1 l mit Aqua dest	

Für YPD-Festmedium wurde 2.5 % Bacto-Agar vor dem Autoklavieren hinzugegeben.

Nach dem Autoklavieren wurden 50 ml 40 % sterile Saccharoselösung ad 2 % zugegeben.

Die Selektion von Plasmiden in den auxotrophen *S.cerevisiae*-Stämmen erfolgte in synthetischem Mangelmedium (synthetic dropout Medium= SD-Medium).

Für SD-Festmedium wurde 2.5 % Bacto-Agar vor dem Autoklavieren hinzugegeben. In Abhängigkeit von den notwendigen Selektivbedingungen wurden die entsprechenden Aminosäuren (also Leu/His/Trp) ausgelassen.

Nach dem Autoklavieren wurde sterile Saccharoselösung ad 2 % zugegeben. Um Bakterienkontaminationen zu vermeiden, wurden dem Medium je 150 µg/ml Ampicillin und 150 µg/ml Kanamycin zugefügt.

**SD-Medium**

6.7 g Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren (Difco)  
 100 ml sterile 10x Dropout Lösung  
 pH ad 5.8  
 ad 1 l mit Aqua dest

**10x Dropout (DO) Lösung**

300 mg/l L-Isoleucin  
 1500 mg/l L-Valin  
 200 mg/l L-Adenin Hemisulfat  
 200 mg/l L-Arginin HCl  
 200 mg/l L-Histidin HCl Monohydrat  
 1000 mg/l L-Leucin  
 300 mg/l L-Lysin HCl  
 200 mg/l L-Methionin  
 500 mg/l L-Phenylalanin  
 2000 mg/l L-Threonin  
 200 mg/l L-Tryptophan  
 300 mg/l L-Tyrosin  
 200 mg/l L-Uracil  
 (alle Substanzen jeweils von Sigma)

**2.1.2.3 Bestimmung der Hefezelldichte in Flüssigkultur**

Die Zelldichte in Flüssigmedium wurde anhand der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm photometrisch bestimmt. Als Leerwert diente unbeimpftes Medium. Dabei entspricht eine OD<sub>600</sub> von 1 einer Zelldichte von ~ 3 x 10<sup>7</sup>/ml.

**2.1.3 Säugetierzelllinien**

**2.1.3.1 Verwendete Zelllinien**

Die Ursprungsgewebe der untersuchten Zelllinien sowie die entsprechenden Nährmedien (Gibco) sind im folgenden aufgeführt. Alle Medien enthielten 10 % fötales Kälberserum, das vor Verwendung bei 56° C für 30 min hitzeinaktiviert wurde, sowie Penicillin/Streptomycin zur Verhinderung von Bakterienkontaminationen. Zusätzlich wurde L-Glutamin ad 2 mM zugegeben.

Zell-Linie	Medium	Ursprungsspezies/-gewebe	Referenz bzw. Bezugsquelle
GT1 und ScGT1	MEM	Maus; Hypothalamus	(Schätzl et al., 1997)
N2a und ScN2a	DMEM	Maus; Neuroblastom	(Butler et al., 1988)
Rin2a	DMEM	Ratte; Insulinoma	ATCC
BHK (BSR)	BHK-21	Hamster; Niere	ATCC

MEM= Minimal Essential Medium; DMEM= Dulbecco's Modified Eagles Medium

### **2.1.3.2 Kultivierung**

Die Zell-Linien wurden in adäquatem Medium in Gewebekulturschalen (Nunc) bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt aufgezogen. Der Medienwechsel erfolgte alle 3-4 Tage. Bei Erreichen einer Konfluenz von über 80 % wurden die Zellen in PBS gewaschen, mit Trypsin überschichtet, das Trypsin abgesaugt und die Zellen gründlich in 10 ml Nährmedium suspendiert. Anschließend erfolgte eine Überführung in neue Gewebekulturschalen in einem Volumen-Verhältnis von 1:10.

### **2.1.3.3 Dauerkulturen**

Zur Aufbewahrung der Zellen wurden die adhärennten Zellen bei einer Konfluenz von ca. 75 % trypsiniert und anschließend in geeignetem Nährmedium mit 20 % FCS und 10 % DMSO suspendiert. 1 ml Aliquots wurden in 1.5 ml kaltebeständige Cryotubes (Nunc) überführt und für 24 Std. bei -80° C gelagert. Anschließend wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt, wo sie für unbegrenzte Zeit gelagert werden konnten.

Beim Auftauen wurden die Zellen schnell im Wasserbad auf 37° C erwärmt. Zur Entfernung des toxischen DMSO erfolgte eine Zentrifugation bei 1.000 g in 10 ml fötalem Kälberserum. Der flüssige Überstand wurde abgesaugt und die pelletierten Zellen konnten daraufhin in Nährmedium resuspendiert und in Kulturschalen ausgesät werden.

## **2.2 Nukleinsäurereinigung und -analyse**

### **2.2.1 Enzymatische Behandlung von DNA**

Die Behandlung von DNA mit Restriktionsenzymen (New England Biolabs oder Roche) erfolgte nach Herstellerangaben unter den empfohlenen Bedingungen. Linearisierte DNA-Fragmente wurden mittels T4-Ligase (Gibco) oder dem DNA Quick Ligation Kit (Roche) ligiert.

### **2.2.2 Plasmidisolierung aus Bakterien**

#### **2.2.2.1 Präparation im kleinen Maßstab (Miniprep)**

Die Isolierung von Plasmiden im kleinen Maßstab aus maximal 5 ml Flüssigkultur erfolgte mit einem kommerziellen Kit (GFX Mini Plasmid Prep Kit, Amersham Pharmacia). Die DNA wurde dabei in einem Volumen von 100 µl Aqua dest eluiert. Dabei ergaben sich Gesamtausbeuten zwischen 1 und 5 µg Plasmid-DNA pro Ansatz.

#### **2.2.2.2 Präparation im großen Maßstab (Maxiprep)**

Zur Isolierung von bis zu 500 µg Plasmid-DNA aus Bakterien wurden 500 ml LB-Medium mit Antibiotikazusatz mit 10 ml einer Übernacht-Kultur des gewünschten Bakterienklones angeimpft und über Nacht bei 37° C und 180 upm geschüttelt.

Nach dem Pelletieren der Bakterien bei 4.000 g und 4° C für 15 min wurde die Plasmid-DNA mittels einen kommerziell erhältlichen Kits (Qiagen Maxi-Prep Kit) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und abschließend in Aqua dest oder TE-Puffer aufgenommen.

### **TE-Puffer**

Tris/HCl pH 7.5	100 mM
EDTA	10 mM

### **2.2.3 Plasmidisolierung aus *S.cerevisiae***

Hefepasmide lassen sich wesentlich schwieriger und mit geringerer Ausbeute aufreinigen als Bakterienplasmide. Daher wurden die erhaltenen Hefepasmid-Lösungen lediglich für die Re-transformation von Bakterien oder für PCR-Analysen verwendet. Die eigentliche Sequenzierung und andere molekulare Verfahren wurden dann mit „Bakterien-Plasmiden“ vorgenommen.

Von einer stationären *S. cerevisiae*-Kultur in Flüssigmedium wurden 1.5 ml 5 min bei 2.000 g sedimentiert, der Überstand abgenommen und zu dem Zellpellet 200 µl Hefe-Aufschlußpuffer, 200 µl Glasperlen (Ø=0,5 mm; Sigma) und 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gegeben. Nach 2 min heftigem Mixen auf einem Vortex und 5 min Zentrifugation (14.000 upm) wurde der wässrige Überstand mit 1/10 Vol. 10 M NH<sub>4</sub>Acetat-Lösung und 2.5 Vol. 100 % Ethanol versetzt und die enthaltene DNA für 10 min auf Eis gefällt. Nach einer Sedimentation (10 min bei 2.000 g) wurde das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in Aqua dest resuspendiert. Diese Plasmidlösung wurde zur Transformation von *E.coli*-Zellen eingesetzt.

### **Hefe-Aufschlußpuffer**

Triton X-100	2 %
SDS	1 %
NaCl	100 mM
EDTA	1 mM
Tris/HCl pH 8.0	10 mM

### **2.2.4 Präparation von Nukleinsäuren aus Säugerzellen**

#### **2.2.4.1 Präparation genomischer DNA**

Zur Isolierung von genomischer DNA aus Säugetierzellen in Zellkultur wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

Die Zellen wurden trypsiniert, in PBS aufgenommen und 10 min bei 1.000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml DNA-Puffer I + 0.4 % SDS + 0.04 % Proteinase K über Nacht bei 37° C inkubiert.

Nach Mischung mit 1 Vol. DNA-Puffer II erfolgte die Zugabe von 2 Vol. Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (24:24:1). Für 5 min wurde die Mischung kräftig geschüttelt und anschließend 5 min zentrifugiert.

Der Überstand wurde zweimal mit 1 Vol. Chloroform:Isoamylalkohol gewaschen und anschließend mit 2.5 Vol. 100 % Ethanol für 30 min bei 4° C bei 2.500 g zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70 % eiskaltem Ethanol gewaschen und abschließend in 200 µl Aqua dest aufgenommen.

<b>DNA-Puffer I</b>		<b>DNA-Puffer II</b>	
NaCl	150 mM	NaCl	650 mM
EDTA	10 mM	EDTA	10 mM
Tris/HCl pH 7.5	10 mM	Tris/HCl pH 8.0	10 mM

### 2.2.4.2 Präparation von RNA

Zur Gewinnung von RNA aus kultivierten Zellen wurden 10 cm Zellkulturschalen mit Hilfe eines kommerziellen Kits (RNeasy RNA Preparation Kit, Qiagen) lysiert und daraus die RNA nach Herstellerangaben extrahiert. Die so präparierte RNA wurde in nucleasefreies Wasser eluiert und bei -20° C gelagert.

### 2.3 Reverse Transkription und RACE

Zur Erzeugung von cDNA aus Gesamt-RNA wurde als Vorlage RNA aus Zellkultur oder definierten Geweben verwendet und diese einer reversen Transkription mittels des SuperScript-Systems (Gibco) unterzogen. 2.5 µg RNA wurden nach Herstellerangaben mit Hexamer-Zufallsprimern vermischt und für 10 min auf 70° C erhitzt. Danach wurde die Probe sofort auf Eis gestellt und 1 µl Superscript-RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase (Gibco) zugegeben. Die Synthese der cDNA erfolgte anschließend bei 37° C für 90 min. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70° C für 15 min gestoppt. Ein Aliquot der Lösung konnte anschließend direkt für eine PCR-Reaktion mit spezifischen Primern verwendet werden.

Zur Durchführung einer RACE („Rapid Amplification of cDNA-Ends“) zur Isolierung von 5'-Enden ausgesuchter mRNAs wurde das kommerzielle Gene-RACER Kit (Invitrogen) verwendet. Als RNA-Vorlage diente dabei Gesamt-RNA aus Gewebekultur-Zellen bzw. mRNA aus Maus-Herz und -Hirn (jeweils von Ambion). Durch Behandlung mit einer Phosphatase wurden alle RNA-Moleküle ohne 5'-Cap degradiert, wohingegen intakte mRNA-Moleküle mit 5'-Cap resistent sind. Diese Moleküle wurden mit einem universellen 5'GeneRACER-RNA-Oligonucleotid ligiert und mittels Zufallsprimern in cDNA transkribiert. Für eine selektive PCR wurde die cDNA mit einem universellen 5'- GeneRACER-Primer und einem genspezifischen 3'-Primer amplifiziert.

## 2.4 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Zur Konzentrationsmessung von DNA bzw. RNA wurde die ein Aliquot 1:50 in 100 µl Aqua dest verdünnt und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD<sub>260</sub>) in einer Quarzküvette spektralphotometrisch bestimmt.

DNA weist bei einer Wellenlänge von 260 nm ein Absorptionsmaximum auf. Bei doppelsträngiger DNA wird bei einer OD<sub>260</sub> = 1.0 eine Konzentration von 50 µg/ml DNA bzw. 40 µg/ml RNA zugrunde gelegt (Maniatis et al., 1989). Durch Messung der OD<sub>280</sub> kann gleichzeitig der verunreinigende Proteingehalt der Nukleinsäure-Lösung ermittelt werden. Idealerweise ergibt sich ein Quotient von OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> von 2. Ein Ergebnis von weniger als 1.6 deutet auf eine starke Verunreinigung durch Proteine hin.

## 2.5 PCR-Amplifikation

Definierte DNA-Fragmente wurden mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit Hilfe geeigneter Primer amplifiziert. Zur Einführung von Restriktionsschnittstellen und Punktmutationen in diese DNA-Sequenzen wurden Primer mit den gewünschten zusätzlichen bzw. mutierten Nukleotidsequenzen verwendet. Als DNA-Polymerase wurden Taq (Perkin Elmer) oder Pfu (Stratagene) bzw. deren Analoge mit geringerer Fehlerwahrscheinlichkeit (TaqGold, TurboPfu) verwendet. 50 µl der PCR-Reaktion wurde in 0.5 ml Reagenzgefäßen gemischt und anschließend die automatisierte Reaktion in einem PE 9600 Thermocycler (Perkin Elmer) durchgeführt.

### PCR-Reaktionsmix

5 µl	10x PCR-Puffer
2.5 µl	dNTP-Mix (Amersham Pharmacia) (50 µM)
2.5 µl	5' Primer (100 nM)
2.5 µl	3' Primer (100 nM)
0.5 µl	DNA-Polymerase
0.1-1 µl	DNA-Vorlage (entspricht ca. 50-500 nM)
ad 50 µl	Aqua dest

Die Temperatur, bei der die Oligonukleotide mit der einzelsträngigen Parental-DNA hybridisiert („Annealing“), wurde zunächst pauschal auf 55° C eingestellt. Bei Bedarf wurde diese Annealingtemperatur bis auf 65° C erhöht bzw. auf 50° C erniedrigt, bis die PCR-Reaktion zu einer spezifischen Amplifikation der gewünschten DNA führte.

### Amplifikationsparameter

94° C	3 min	initiale Denaturierung der DNA
94° C	1 min	Amplifikationszyklus (25-35 mal)
55° C	1 min	Annealing
72° C	1.5 min	Elongation
72° C	8 min	finale Elongation
4° C	nach Bedarf	Kühlung

### 2.5.1 Verwendete PCR-Primer

Primer aus DNA-Oligomeren wurden für verschiedene Zwecke synthetisiert. Die eigentliche Synthese erfolgte durch kommerzielle Anbieter, wobei je nach Bedarf die Firmen Metabion, MWG und Amersham Pharmacia beauftragt wurden.

**Tabelle 6:** Bezeichnung und Sequenz der verwendeten Oligonukleotide

<b>Sequenzier-Primer</b>	<b>Sequenz (5'-3')</b>
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
T3	ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA
M 13 rev	CAG GAA ACA GCT ATG AC
M 13 fwd	GTA AAA CGA CGG CCA G
Gal4BD 5'	TCA TCG GAA GAG AGT AG
Gal4BD 3'	TTT TCG TTT TAA AAC CTA AGA GTC
Gal4AD 5'	GCG TTT GGA ATC ACT ACA GGG ATG
Gal4AD 3'	GCA CAG TTG AAG TGA ACT
pcDNA3.1 +	CTA TAT AAG CAG AGC TCT C
pcDNA3.1 -	TAG AAG GCA CAG TCG AGG
<b>Amplifizierungs-Primer</b>	
PrP 1 fwd Bam	GCG GAT CCG TCG CCA CCA TGG CGA ACC TTG GCT A
PrP 23 fwd Eco	CCG AAT TCA AAA AGC GGC CAA AGC CTG
PrP 23 fwd Bam	AAA GGA TCC AAA AAG CGG CCA AAG CCT
PrP 231 rev Eco	AAA GAA TTC GCT GCT GGA TCT TCT CCC
PrP 231 rev Bam	TAG GAT CCC TAG CTG GAT CTT CTC CCG
PrP 254 rev Eco	ATC GAA TTC ATC ATC CCA CGA TCA GGA AGA
PrP 90 fwd Eco	CAG AAT TCG GCC AAG GAG GGG GTA C
PrP 100 rev Eco	GGA ATT CCT AGT TCC ACT GAT TATG
PrP 100 rev Bam	GGG ATC CCT AGT TCC ACT GAT TAT G
Cav1 fwd Bam	AAG GAT CCA AGT CGC CAC CAT GTC TGG GGG CAA ATA CGT G
Cav1 rev Xho	AGT CTC GAG TCA TAC TCT TTC TGC GTG CTG ATG
Cav2 fwd Bam	AAG GAT CCA AGT CGC CAC ATC ATG GGG CTG GAG ACG GAG AAG
Cav2 rev Xho	AGT CTC GAG TCA ATC CTG GGC TCA GTT GCA G
Cav3 fwd Bam	AAG GAT CCA AGT CGC CAC CAT GAT GAC CGA AGA GCA CAC GG
Cav3 rev Xho	AGT CTC GAG TTA GCC TTC CCT TCG CAG CAC CAC C
Grb2 fwd Bam	AAG GAT CCG TCG CCA CAT CAT GGA AGC CAT CGC CAA ATA TG
Grb2 rev Xho	AAA CTC GAG TTA GAC GTT CCG GTT CAC TGG
Dpl fwd Bam	AAG GAT CCG TCG CCA CAT CAT GAA GAA CCG GCT GGG TAC
Dpl rev Pst	AGT CTG CAG TTA CTT CAC AAT GAA CCA AAC G
Dpl rev Eco	AGT GAA TTC TTA CTT CAC AAT GAA CCA AAC G
<b>Mutagenese-Primer</b>	
P102L fwd	TAA TCA GTG GAA CAA GCT CAG CAA AC
P102L rev	GTT TGC TGA GCT TGT TCC ACT GAT TA
P105L fwd	CAG CAA ACT AAA AAC CAA CCT CAA GC
P105L rev	GCT TGA GGT TGG TTT TTA GTT TGC TG
PrP HA 23 3'	TGT CCG GAT TAC GCT AAG AAG CGG CCA AAG CCT GG
PrP HA 23 5'	TAA TCC GGA ACA TCG TAT GGG TAG CAG AGG CCA ACA TCA GTC C
PrP HA 92 5'	TAA TCC GGA ACA TCG TAT GGG TAC CCT CCT TGG CCC CAT CC
PrP HA 92 3'	TGT TCC GGA TTA CGC TGG TAC CCA CAA TCA GTG G



<b>RACE-Primer</b>	
Generacer 5'-Primer	CGA CTG GAG CAC GAG GAC ACT GA
AJ1	GTA ATC CGC CAC TGG CAA GCC
AJ2	GCA CTG KCC RAG TGG RAG CAT GAC TTT
AJ3	GTG AGC TCT GTA CAG AAM GGG GTA AGC TGT
AJ4	AGC TTT CTG GTG GAT ATG GAG CAG AAC TCC
AJ5	GCA TTG AAC ATC CAG AAG CAC CTA AAA CTC
AJ6	AAC TCG GGC CCA TCC AAG TCC AGG
AJ7	ACA GCT TAC CCC ATT CTG TAC AGA GCT CAC

## 2.6 Gerichtete Mutagenese von DNA

### 2.6.1 Nukleotidsubstitution mittels "Mismatch-Overlap"

Zur Erzeugung von definierten Punktmutationen erwies sich das „Quick-Change-Site-Directed-Mutagenesis-Kit“ (Stratagene) als gut geeignet. Dabei wird eine long-range-PCR mit dem zu mutierenden Plasmid durchgeführt, bei dem die verwendeten Primer zueinander komplementär sind und die gewünschten Mutationen enthalten. Nach 18 Zyklen wurde die DNA mit dem Enzym *DpnI* über Nacht behandelt. Dieses Enzym erkennt und schneidet ausschließlich methylierte DNA. Da eine Methylierung nur in Bakterien erfolgt, nicht aber während einer PCR, verdaut dieses Enzym das ursprünglich eingesetzte (nicht mutierte) Plasmid. Die mittels PCR erzeugte (mutierte) DNA wird nicht angegriffen und kann anschließend direkt in Bakterien transformiert werden.

### 2.6.2 Epitop-Einführung mittels PCR-Primer

Zur Einführung von längeren Epitopen, wie z.B. dem Hämagglutinin (HA)-Epitop eignet sich die oben genannte Methode nicht. Daher wurden solche Sequenz-Insertionen mittels Ligation zweier PCR-Fragmente erzeugt. Die verwendeten Primer führten zu zwei Fragmenten mit je einem endständigen Anteil des Epitops und einer Restriktionsschnittstelle, über die die Fragmente „in frame“ ligiert werden konnten, so dass sich abschließend eine DNA-Sequenz ergab, in die das Insert im passenden Leserahmen an der gewünschten Stelle eingefügt war. Das resultierende DNA-Fragment konnte anschließend in geeignete Vektoren kloniert werden.

## 2.7 Northern-Blot

Zur Identifizierung von Geweben, die ein untersuchtes Gen exprimieren, kamen kommerzielle RNA-Blots zum Einsatz. Diese enthielten mRNA von unterschiedlichen Geweben der Maus, die auf Nylonmembranen transferiert worden waren. Auf dem murinen RNA-Masterblot (Clontech) war die RNA tropfenweise aufgebracht („Dot-Blot“), während die RNA des FirstChoice Northern Blot Mouse Blot I (Ambion) vor dem Transfer elektrophoretisch aufgetrennt worden war.

### 2.7.1 Präparation und Markierung von radioaktiven DNA-Sonden

Als Sonde für die Hybridisierung mit der RNA auf den Nylonmembranen wurden DNA-Fragmente mit  $^{32}\text{P}$ -Phosphat radioaktiv markiert. Diese Fragmente wurden durch Herausschneiden der gewünschten Inserts aus den entsprechenden Plasmiden mittels Restriktionsenzymen oder durch PCR erzeugt. Die Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt, mittels GFX-Säulchen gereinigt und anschließend 50 ng DNA mit Hilfe des „Megaprime“-Kits (Amersham Pharmacia) nach Herstellerangaben mit 3000 Ci/nm  $^{32}\text{P}$ -dCTP (Amersham Pharmacia) radioaktiv markiert. Nach Entfernung der uneingebauten Nukleotide mittels GFX-Säulchen (Amersham Pharmacia) wurde die Sonde in 20  $\mu\text{l}$  Aqua dest aufgenommen.

### 2.7.2 Hybridisierung

Die Membran mit den RNA-Proben wurde zunächst für 60 min in 10 ml ExpressHyb (Clontech) mit 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Lachs-Testes-DNA (Gibco) bei 65° C unter ständigem Schütteln prähybridisiert.

Die radioaktive DNA-Sonde wurde zwischenzeitlich mit 30 mg muriner Cot-1 DNA (Sigma), 150 mg Lachs-Testes-DNA (Gibco), und 50  $\mu\text{l}$  20x SSC in einem Gesamtvolumen von 200  $\mu\text{l}$  gemischt und 5 min bei 95° C denaturiert. Anschließend wurde die Sondenlösung für 30 min bei 68° C inkubiert.

Die Prähybridisierungslösung wurde verworfen und durch die Sondenlösung in 5 ml Prähybridisierungslösung ersetzt. Unter ständigem Rotieren erfolgte bei 65° C über Nacht die Hybridisierung zwischen Sonde und Membran.

Zum Waschen wurde die Membran vier mal mit 100 ml Waschlösung 1 für je 15 min bei 65° C gewaschen. Daraufhin erfolgten zwei weitere Waschschrte in 100 ml Waschlösung 2 für je 15 min bei 55° C. Abschließend wurde die Membran aus dem Hybridisierungsröhrchen entnommen, von überschüssiger Flüssigkeit befreit und in Klarsichtfolie eingeschlagen.

#### 20x SSC

NaCl	3 M
Na <sub>3</sub> Citrat*2 H <sub>2</sub> O	0.3 M
pH ad 7,0	

#### Waschlösung 1

SSC	2 x
SDS	1 %

#### Waschlösung 2

SSC	0.1x
SDS	0.5 %

### 2.7.3 Detektion und Auswertung der radioaktiven Signale

Die Detektion der radioaktiven Signale erfolgte entweder mittels eines Röntgenfilmes (Kodak Biomax XR) oder durch die Verwendung eines „Phosphoimager“-Schirms.

Bei der Verwendung eines Filmes wurde dieser zusammen mit einem Verstärkungsschirm in einer Filmcassette bei  $-80^{\circ}\text{C}$  belichtet, anschließend entwickelt und eingescannt.

Die Belichtung von Phosphoimager-Schirmen wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die so erhaltenen Signale wurden mit einem STORM-Phosphoimager (Amersham Pharmacia) detektiert und mit dem Programm Imagequant 4.0 (Molecular Dynamics) visualisiert.

### 2.7.4 Entfernung der radioaktiven Sonde von der Membran

Nach der Auswertung der Signale wurde die radioaktive DNA-Sonde wieder von der Membran entfernt. Dazu wurde die Membran aus der Klarsichtfolie entnommen und sofort in 250 ml kochende 0.5 % SDS-Lösung überführt und für 10 min gekocht. Anschließend wurde die Membran in Lösung für 10 min abgekühlt. Nach der Wiederholung der Prozedur konnte die Membran entweder erneut verwendet oder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in Frischhaltefolie gelagert werden.

## 2.8 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Je nach Größe der erwarteten DNA-Fragmente wurden 0.5 bis 2 % Agarose (Gibco) abgewogen und in TAE-Puffer suspendiert. Durch Aufkochen in der Mikrowelle wurde die Agarose gelöst. Nach Abkühlung auf ca.  $60^{\circ}\text{C}$  wurde Ethidiumbromid zugegeben ( $1\mu\text{l}/40\text{ ml}$  Agaroselösung) und die noch flüssige Lösung in geeignete Gelschlitten gegossen und bei Raumtemperatur ausgehärtet. Anschließend wurde das Gel in die Elektrophoreseapparatur überführt und mit TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 1/5 Auftragspuffer versetzt, in die Geltaschen pipettiert und bei 80-100 V elektrophoretisch aufgetrennt. Als Längenstandard wurde eine 100 bp-Leiter verwendet (Gibco). Nach der Elektrophorese konnten die aufgetrennten Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

#### 5x DNA-Auftragspuffer

Sucrose	40 %
SDS	0.1 %
Bromphenolblau	0.05 %
EDTA pH 8.0	1 mM

#### TAE-Puffer

Tris-Acetat	40 mM
EDTA	1 mM

## 2.9 Elution von DNA aus Agarosegelen

### 2.9.1 Elution mittels Glasmilch (Gene-Clean)

Nach dem Ausschneiden der Banden mittels eines sterilen Skalpells wurden die Agarosegelstückchen in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und bei 55° C in 3 Vol. 6 M NaI geschmolzen. Anschließend wurden 5 µl Glasmilch (Dianova) zugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Glasmilch mit der gebundenen DNA wurde bei 14.000 upm pelletiert und insgesamt 3 mal in 500 µl eiskalter GeneClean-Waschlösung resuspendiert/zentrifugiert. Die DNA wurde abschließend durch Resuspendierung der Glasmilch in 20 µl Aqua dest und Erhitzung auf 55° C in den wässrigen Überstand überführt.

#### GeneClean-Waschlösung

NaCl	50 mM
Tris/HCl pH 7.5	10 mM
EDTA	2.5 mM
Ethanol	50 %

### 2.9.2 Elution mittels Ionenaustauschersäulchen

Die ausgeschnittenen Agarosestücke wurden in 400 µl Capture-Buffer (GFX Gel Elution Kit, Amersham Pharmacia) bei 55° C gelöst und die Lösung anschließend durch ein Matrix-Säulchen zentrifugiert. Die Matrix wurde mit 500 µl Waschpuffer gewaschen und die gebundene DNA abschließend mit 20-50 µl Aqua dest eluiert.

## 2.10 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierungsreaktionen wurden mit dem 'ABI PRISM™ Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequenzierungs-Kit' (Perkin Elmer) nach Herstellerangaben durchgeführt. 100 ng isolierte PCR-Fragmente oder 1 µg Plasmid-DNA wurden in die PCR-Reaktion eingesetzt.

Die PCR erfolgte nach Herstellerangaben in dem PCR-Gerät PE 9600 (Perkin Elmer).

Dabei wurde folgendes Programm für 25 Zyklen verwendet:

#### Sequenzier-PCR-Programm

96° C	15 sec
50° C	15 sec
60° C	4 min

Die DNA wurde anschließend mit 1/10 Vol. 1.5 M Na-Acetat und 2.5 Vol. Ethanol absolut gefällt. Nach 30 min Zentrifugation bei 14.000 rpm wurde das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut für 10 min zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde in Sequenzierpuffer aufgenommen, elektrophoretisch mit dem ABI 373 DNA-Sequencer (Perkin Elmer) aufgetrennt und mit geeigneter Software analysiert.

## 2.11 Einführung von Plasmid-DNA in Mikroorganismen und Säugetierzellen

### 2.11.1 Transformation von Bakterien

#### 2.11.1.1 Elektroporation

##### 2.11.1.1.1 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Für die Elektroporation sind speziell präparierte „elektrokompetente“ Bakterien nötig, da störende Salze vor der Verwendung entfernt werden müssen. Die Bakterien wurden unter Verwendung des folgenden Protokolls hergestellt:

5 ml einer Übernachtskultur wurde in 500 ml LB-Medium überführt und bis zum Erreichen einer  $OD_{600}$  von 0.8 bei 37° C geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien für 30 min auf Eis gestellt und danach bei 3.000 g und 4° C in einer Beckman-Zentrifuge mit GS3-Rotor pelletiert. Nach zweimaliger Resuspendierung/Pelletierung in kaltem sterilem Aqua dest wurden die Bakterien in 5 ml sterilem 10 % Glycerin aufgenommen und zu je 100 µl in eiskalte Reaktionsgefäße überführt. Die Lagerung erfolgte bei -70° C. Unmittelbar vor Gebrauch wurden die Bakterien auf Eis aufgetaut.

##### 2.11.1.1.2 Elektroporation von Bakterien

Vor der Transformation der Bakterien wurde der verwendete Ligationsansatz mit der Plasmid-DNA zur Entfernung störender Ionen 30 min gegen Aqua dest dialysiert.

5 µl der dialysierten Reaktion wurde mit 100 µl elektrokompetenten Bakterien vermischt und in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte mit einem GENE-Pulser (Biorad) bei den Einstellungen 25µFd, 2.5 kV und 400 Ohm. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und für 1 Std. bei 37° C geschüttelt. 100 µl wurden anschließend auf Agarplatten mit Selektivmedium ausplattiert.

#### **SOC-Medium**

Trypton	2 %
Hefeextrakt	0.5 %
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
Glucose	20 mM

### 2.11.1.2 Transformation mittels Hitzeschock

#### 2.11.1.2.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Eine Einzelkolonie wurde von einer LB-Agarplatte gepickt und damit 200 ml LB-Vollmedium angeimpft. Die Bakterien wurden bei 37° C bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0.6-0.8 in einem Inkubator geschüttelt und anschließend 15 min auf Eis abgekühlt. Das Pelletieren erfolgte 10 min bei 4° C und 3.000 g. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml eiskalter 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und 30 min bei gelegentlichem Mischen auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die Bakterien in 5 ml 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen und über Nacht auf Eis inkubiert. Abschließend erfolgte eine Aliquotierung zu je 100 µl in 1.5 ml Reagenzgefäße. Die kompetenten Bakterien wurden bei -70° C aufbewahrt.

#### 2.11.1.2.2 Transformationsbedingungen

Zur Transformation von *E.coli* wurde Plasmid-DNA mit einem 100 µl Aliquot der auf Eis aufgetauten kompetenten Bakterien vermischt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 90 sec auf 42° C erwärmt, dann 1 min auf Eis abgekühlt, mit 500 µl SOC-Medium versetzt und 60 min bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl auf LB-Agarplatten mit dem Selektivantibiotikum ausgestrichen und über Nacht mit der Agarschicht nach oben bei 37° C inkubiert.

### 2.11.2 Transformation von Hefezellen

Die Transformation von *S. cerevisiae* mit Plasmiden erfolgte mittels einer modifizierten Lithium-Acetat-Methode (Gietz et al., 1992).

Dazu wurden einige Hefekolonien in 150 ml YPD-Medium angeimpft und für ca. 18 h bei 30° C und 250 upm bis zum Erreichen der stationären Phase (OD<sub>600</sub> > 1.5) geschüttelt. Aus dieser Übernachtskultur wurde 1 l YPD so angeimpft, dass sich eine OD<sub>600</sub> von 0.2 ergab. Dieser Ansatz wurde für weitere 3Std. geschüttelt. Die Zellen wurden zu je 50 ml bei Raumtemperatur und 1.000 g pelletiert und in jeweils 25 ml TE resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden alle Pellets in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen vereinigt und in 8 ml steriler TE/LiAc-Lösung aufgenommen.

1 mg des Plasmids pACT2 mit der enthaltenden cDNA-Bibliothek wurde mit 20 mg hitzedenaturierter Herings-Testes DNA (Gibco) vermischt und zu den Hefezellen gegeben. Nach Zugabe von 60 ml PEG/LiAc wurde die Mischung mit einem Vortex gründlich durchmischt und bei 30° C für 30 min geschüttelt. 8 ml DMSO wurden dazugegeben und vorsichtig mit der Zellsuspension vermennt. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock der Zellen in einem Wasserbad bei 42° C für 15 min, währenddessen die Suspension gelegentlich geschüttelt wurde.

Nach 2 min auf Eis wurden die Zellen bei 1.000 g pelletiert und der Überstand verworfen. Abschließend wurden das Hefezellpellet in 10 ml TE aufgenommen und auf geeignetes SD-Selektivmedium ausplattiert.

<b>10x TE</b>		<b>PEG/LiAc</b>	
Tris/HCl pH 7.5	0.1 M	PEG 4000	40 %
EDTA	10 mM	TE-Puffer	1x
		LiAc	1x
<b>10x LiAc</b>		<b>TE/LiAc</b>	
Lithiumacetat	1M	TE-Puffer	1x
pH ad 7.5		LiAc	1x

### 2.11.3 Transfektion von Säugetierzellen

#### 2.11.3.1 Transfektion mittels Calcium-Phosphat

Zur Transfektion von BHK-Zellen wurde das Mammalian Transfection Kit (Stratagene) verwendet. Dies beruht auf einem modifizierten Calcium-Phosphat-Protokoll. Dabei macht man sich zunutze, dass die Phosphatreste der Plasmid-DNA mit Calcium ein Präzipitat bildet, welches die Adsorption der DNA an Zellmembranen erleichtert und diese nach Aufnahme in die Zelle vor DNasen schützt.

Die Durchführung der Transfektion erfolgte nach Herstellerangaben. Dabei wurden je 2.5 µg Plasmid-DNA pro 6-cm Kulturschale verwendet.

#### 2.11.3.2 Transfektion mittels Superfect

Das Prinzip der Transfektion mittels Superfect (Qiagen) beruht auf der Verwendung von aktivierten Dendrimeren, die eine besondere Form von Polyamiden darstellen, als Trägermaterial zur Einschleusung von Plasmid-DNA durch die Zellmembran in Säugetierzellen. Dazu wurden Zellen so in 6-cm Schalen gesplittet, dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von etwa 50 % besaßen. Die Plasmid-DNA wurde nach Herstellerangaben vorbehandelt und auf die Zellen gegeben. Nach 4 Stunden erfolgte ein Medienwechsel und nach 3 Tagen eine Überführung in Selektionsmedium (im Falle stabil transfizierter Zellen) bzw. die Lyse der Zellen (bei transienten Transfektionen).

#### 2.11.3.3 Elektroporation

Eine Schale adhärenter Zellen mit einer Konfluenz von ca. 75 % wurde zunächst trypsiniert, mit 5 ml PBS von der Platte gespült und in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 1.000 g pelletiert und in 800 µl Optimem (Gibco) aufgenommen. Nach Zugabe von

10 µg Plasmid-DNA wurden die Zellen in eine eiskalte sterile Elektroporationsküvette überführt und für 5 min auf Eis inkubiert.

Die Elektroporation der Zellen mit DNA erfolgte anschließend bei 960 µF und 220 V.

Die transfizierten Zellen wurden in 5 ml Optimem aufgenommen und in 6 cm Gewebekulturschalen inkubiert. Nach 3 Tagen erfolgte ein Medienwechsel in Selektionsmedium mit 300µg/ml Zeocin (Invitrogen) bzw. die Lyse der Zellen.

### 2.12 Yeast-Two-Hybrid-Methoden

#### 2.12.1 Konstruktion der benötigten Plasmid-Vektoren

Zur Konstruktion der nötigen Plasmide wurden Vektoren des Matchmaker2-System (Clontech) mit den dazugehörigen Hefestämmen Y190 und Y187 verwendet. Das Interaktionsprinzip beruht auf einem Gal4-basierten Expressions- und Detektionssystem. Sowohl das „Köderprotein“, als auch die „Beute“-Proteinbibliothek werden in *S.cerevisiae* unter der Kontrolle des konstitutiven ADH1-Promotors gebildet, wodurch keine gesonderte Induktion der Expression der Proteine nötig ist.

##### 2.12.1.1 Konstruktion des „Köder“-Plasmids

Der codierende Bereich des Prion-Proteins der Maus von Codon 23 bis 231 (bezogen auf die humane Prion-Sequenz) wurde durch PCR aus genomischer DNA aus murinen N2a-Zellen amplifiziert. Mittels der Primer Eco23fwd und Bam231rev wurden dabei Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *BamHI* terminal eingeführt. Dies ermöglichte die gerichtete Klonierung in das Plasmid pAS2-1 (Abbildung 12). Das resultierende Plasmid pAS 23-231 wurde sequenziert, um die Richtigkeit der PrP-Sequenz sowie den korrekten Übergang des Leserahmens zwischen der DNA-Bindedomäne und dem PrP-Anteil zu überprüfen. Die Expression des Fusionsproteins in Hefe steht unter der Kontrolle des konstitutiven ADH1-Promotors, d.h. es ist keine spezielle Induktion nötig. Als Resultat wird in *S.cerevisiae* ein Fusionsprotein aus der Gal4-DNA-Bindedomäne und dem sich anschließenden PrP 23-231 exprimiert.

##### 2.12.1.2 Konstruktion und Amplifikation der cDNA-Bibliothek

Zum Einsatz kam eine cDNA-Bank, die aus Hirnen von 200 9-12 Wochen alten BALB/c Mäusen (Clontech) gewonnen worden war. Die mRNA wurde mit Hilfe von Oligo-dT<sub>15</sub>-Primern in cDNA umgeschrieben und über universelle Ligationsprimer, welche Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *XhoI* enthielten, in das Plasmid pACT2 eingeführt (Abbildung 13). In Hefe werden unter der Kontrolle des konstitutiven ADH1-Promotors Fusionsproteine gebildet, die aus der Gal4-Aktivierungsdomäne und einem Anteil muriner Hirnproteine besteht.



Zunächst wurde die Komplexität der in *E.coli* DH5 $\alpha$  vorliegenden cDNA-Bank, repräsentiert durch colony-forming-units, ausgetestet. Dies erfolgte durch Ausplattierung eines Aliquots der in Glycerin bei  $-80^{\circ}$  C gelagerten Bakterien in verschiedenen Verdünnungsstufen auf LB-Agarplatten mit Ampicillin. Durch Auszählung der Kolonien konnte eine Komplexität von  $8 \cdot 10^9$  cfu/ml Bakterien mit den Genbankplasmiden errechnet werden.

Anschließend erfolgte die Ausplattierung der Bakterien auf 50 15 cm-LB-Agarplatten mit Ampicillin, so dass ca. 20.000 Einzelkolonien pro Platte wuchsen. Diese Methode wurde der Anzucht in Flüssigmedium vorgezogen, weil ansonsten Bakterien, welche das Plasmid pACT ohne oder nur mit sehr kurzen cDNA-Inserts besitzen, einen Wachstumsvorteil erlangen, der zu einer Verzerrung der Vielfalt an cDNA-Plasmiden führen würde. Die Bakterienkolonien wurden von den Platten geschabt und für 2 Std. in LB-Medium inkubiert. Nach der Isolierung der Plasmide mittels Standardmethoden wurde eine Ausbeute von insgesamt 5 mg Plasmid-DNA erzielt. Diese DNA wies ein Verhältnis  $OD_{260/280}$  von 1.7 auf, was auf eine geringe Verunreinigung mit Proteinen schließen läßt.

### 2.12.2 $\beta$ -Galaktosidase Filter-Assay (Colony-Lift-Assay)

Zur Detektion einer vorhandenen intrazellulären  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität ten die Zellwände der Hefen aufgebrochen werden, um das Substrat X-Gal für das Enzym zugänglich zu machen. Dazu wurde folgende Methode verwendet: nach der Koloniebildung der Hefe auf SD-Agarplatten mit Selektivmedium wurde ein „Filterabklatsch“ der Platten durchgeführt. Dazu wurde steriles Filterpapier (Whatman 3MM) der passenden Größe auf die Agarseite der Petrischalen mit den Hefekolonien gelegt und mit einem Spatel sanft aufgedrückt. Nach einer Minute wurde das Filterpapier mit den anheftenden Hefekolonien abgezogen und in flüssigem Stickstoff 1 min schockgefroren. Nach dem Auftauen bei Raumtemperatur wurden die Filter mit der Kolonieseite nach oben in Petrischalen mit 5 ml Z-Puffer/X-Gal gelegt. Kolonien mit Expression von  $\beta$ -Galaktosidase wurden durch eine Blaufärbung auf dem Filter detektiert.

Zur weiteren Untersuchung wurden nur Klone berücksichtigt, bei denen die Blaufärbung innerhalb von 2 Std. auftrat. Diese Kolonien wurden von den Ursprungsplatten gepickt und in 50  $\mu$ l TE resuspendiert. Mit Hilfe einer Impföse wurde ein Reinigungsausstrich auf SD-Medium durchgeführt und der Filter-Test nach dem Wachstum so lange wiederholt, bis die ausgestrichenen Kolonien eine homogene Blaufärbung aufwiesen.

#### **Z-Puffer**

16.1 g/l	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
5.50 g/l	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
0.75 g/l	KCl
0.246 g/l	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
pH ad 7.0	

### **X-Gal Stammlösung**

20 mg/ml X-GAL (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-Galactopyranoside)  
gelöst in N,N-Dimethylformamide (DMF)

### **Z-Puffer/X-Gal**

10 ml Z-Puffer  
0.27 ml 2-Mercaptoethanol  
1.67 ml X-Gal Stammlösung

### **2.12.3 Experimentelles Vorgehen**

Für die Durchführung der Suche nach Interaktoren von PrP 23-231 der Maus wurde zunächst dessen ORF wie oben beschrieben in das Plasmid pAS2-1 kloniert. Die kommerziell erworbene Maus-Hirn-cDNA-Bibliothek lag in pACT2 vor und wurde nach Herstellerangaben amplifiziert.

Der Hefestamm Y190 wurde zunächst mit dem Plasmid pAS 23-231 transfiziert und auf SD-Medium ohne Trp selektiert. Darauf gewachsene Hefeklonen wurden in großem Maßstab in SD-Medium ohne Trp angezogen, um den Selektionsdruck für das PrP-enthaltende Plasmid pAS 23-231 aufrecht zu erhalten. Bei einer  $OD_{600}$  von 0.8 wurden die Zellen geerntet und anschließend mittels der LiAc-Methode in großem Maßstab mit 50  $\mu$ g Plasmid-DNA der pACT-cDNA-Bank transformiert. Aliquots der transformierten Zellen wurden in TE aufgenommen und zu je 250  $\mu$ l auf 30 15-cm Agarplatten mit SD-Medium ohne Trp, Leu, und His ausplattiert und bei 30° C inkubiert. Diese Bedingungen selektieren über Trp und Leu gezielt Hefezellen, die sowohl pAS2-1, als auch pACT2 enthalten. Die Abwesenheit von Histidin im Medium kann nur von Hefen komplementiert werden, in denen interagierende Fusionsproteine exprimiert werden, die zu einer HIS3-Expression führen. Nach 5 Tagen Inkubation wurden die auf SD-Medium gewachsenen Hefeklonen mittels eines  $\beta$ -Galaktosidase-Filter-Assays auf die Expression von lacZ getestet. Kolonien, die sich nach max. 2 Std. blau färbten, wurden mittels eines mehrfach durchgeführten Reinigungsausstrichs bis zur Reinkultur isoliert.

Dieses Verfahren wurde insgesamt fünf mal unabhängig voneinander durchgeführt, so dass insgesamt 150 Zellkulturschalen verwendet wurden, um Y190 mit dem Interaktionsansatz pAS 23-231 + pACT2-cDNA zu inkubieren und potentielle PrP-Interaktoren zu identifizieren.

### **2.12.4 Re-Isolierung der cDNA-Bibliotheksplasmide**

Nach der Identifizierung von Hefekolonien, die zu einer Blaufärbung führten, wurden die enthaltenen pACT-cDNA-Plasmide daraus isoliert. Dazu wurden die Hefen in SD-Medium ohne Leucin angezogen, das 10  $\mu$ g/ml Cycloheximid enthielt. Y190 besitzt eine natürliche Resistenz gegenüber diesem Antibiotikum, aber der Genmarker CYH2 auf dem Plasmid pAS 23-231 bewirkt eine Sensitivität. Nur wenn die Hefezellen dieses Plasmid nicht replizieren, können sie in

Medium mit Cycloheximid wachsen. Die gleichzeitige Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks für Leucin selektierte für das Plasmid pACT. Die so erhaltenen Kulturen enthielten nur noch das pACT-Bibliotheksplasmid ohne pAS PrP 23-231, d.h. nur noch die „Beute“ ohne den „Köder“.

Da die Plasmidausbeute in *S.cerevisiae* gering ist, wurden die Plasmide aus den Hefeklonen extrahiert und in *E.coli* transformiert, die in LB-Medium mit Ampicillin selektiert wurden. Aus diesen Bakterien konnten die Plasmide einfach in großem Maßstab isoliert werden.

### 2.12.5 Ausschluß von falsch positiven Interaktionssignalen

Um Proteine mit einer tatsächliche Interaktion zu PrP 23-231 von Proteinen bzw. Hefekolonien zu unterscheiden, die nur zufällig in dem durchgeführten Assay Blaufärbung erzeugten, wurden mehrere Kontrollversuche durchgeführt.

Zunächst wurden die isolierten pACT-cDNA-Plasmide mit dem Kontrollplasmid pLam5`-1 in Y190 kotransformiert. Dieses Plasmid entspricht pAS2 mit einem Fusionsprotein aus der Gal4-DNA-Bindedomäne und humanem Lamin C (anstelle von PrP 23-231). Dieses Protein dient als Negativkontrolle, mit der keine Wechselwirkung auftreten sollte, da Lamin in Hefe nur mit wenigen Proteinen Komplexe ausbildet (Ye und Worman, 1995). cDNA-Isolate, die auf Selektivmedium (-Trp/-His/-Leu) trotzdem zu einer Blaufärbung führten, wurden verworfen, weil dort die Interaktion zwischen dem Beuteprotein offenbar nicht mit dem PrP-Anteil, sondern mit der DNA-Bindedomäne des Fusionsproteins stattfand. Eine weitere Kontrolle erfolgte durch alleinige Transformation der cDNA-Plasmide auf Medium ohne Histidin und Leucin. Eine Blaufärbung dieser Interaktoren deutete auf eine DNA-Bindeeigenschaft der cDNA-Isolate hin, die prinzipiell einer Rekonstituierung des Wildtyp Gal4-Transkriptionsaktivators gleichkommt. Auch diese Kolonien wurden verworfen und nicht weiter untersucht.

Die verbliebenen potentiellen Interaktoren wurden abschließend zusammen mit PrP in den Hefestamm Y187 retransformiert. In diesem Stamm ist die Expression des HIS3-Gens stringenter reguliert als in Y190, so dass hier ein Wachstum auf Selektivmedium ohne Histidin nur auftritt, falls eine Interaktion zwischen PrP und den cDNA-Isolaten auftritt. Auch hier wurde auf Blaufärbung mittels eines Colony-Lift-Assays getestet.

Als Positivkontrolle wurden bei allen Transformationen die beiden Plasmide pVA3 und pTD1 verwendet. Diese entsprechen den Plasmiden pAS2 bzw. pACT2 und codieren jeweils für die Gal4-DNA-BD fusioniert mit p53 und Gal4-AD fusioniert mit dem SV40-T Antigen. Von diesen beiden Proteinen ist bekannt, dass sie interagieren und auch im Yeast-Two-Hybrid-System detektierbare Komplexe bilden können (Li und Fields, 1993).

## 2.13 Überexpression von Proteinen

### 2.13.1 Expression in Retikulozytenlysate

Zur zellfreien Herstellung von radioaktiv markierten Proteinen wurde das TNT<sup>®</sup> T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega) verwendet. Dieses System beruht auf Retikulozytenlysate aus Rattenzellen und enthält alle Faktoren, die für eine Transkription der eingesetzten DNA nötig sind, sowie die T7-RNA-Polymerase. Desweiteren sind auch alle Komponenten vorhanden, die die so erzeugte mRNA in Proteine translatieren. Damit können prinzipiell alle Plasmide bzw. DNA-Fragmente, welche einen T7-Promotor besitzen, als Grundlage einer gekoppelten Transkription/Translation verwendet werden. Folgender Ansatz wurde benutzt:

#### **T7-Quick-Reaktion**

20 µl	TNT-Quick Master-Mix
1 µl	<sup>35</sup> S-Cys/Met Promix (> 3000µCi/mmol; Amersham)
1 µg	Plasmid-DNA
ad 25 µl	Nuclease-freies Wasser

Die Proben wurden für 90 min bei 30° C inkubiert und die Reaktion mit 1 µg/ml Puromycin gestoppt.

### 2.13.2 Vaccinia-Virus induzierte Überexpression

BHK-Zellen wurden mit dem Vaccinia-Virusstamm vT7-3 infiziert (Fuerst et al., 1986). Dessen Genom codiert neben den Virusproteinen zusätzlich für die T7-RNA-Polymerase. Ein großer Vorteil der Vaccinia-Viren ist, dass sie einen breiten Wirtstropismus besitzen, d.h. viele Zell-Linien infizieren können. Eine Infektion von Säugetierzellen mit diesem Stamm führt zu einer stark erhöhten Expression von Genen, die unter der Kontrolle eines T7-Promotors stehen. Dieser ist in vielen Plasmiden vorhanden, so auch in pcDNA 3.1 (Invitrogen) und in den Vektoren pGADT7 und pGBKT7 des Yeast-Matchmaker3 Systems (Clontech).

Einen Tag vor der Infektion/Transfektion wurden BHK-Zellen in BHK-21 Medium (Gibco) mit 10 % Kälberserum so in 6-cm Schalen ausgesät, dass am Folgetag die Zelldichte bei ca. 80 % lag. Die Zellen wurden unmittelbar vor der Infektion zwei mal mit PBS gewaschen und mit 2.5 ml DMEM-Medium (Gibco) ohne Serum und Antibiotika überschichtet. Danach wurde die Vaccinia-Virus-Stammlösung (mind. 1 x 10<sup>8</sup> Partikel bzw. m.o.i. 3-5) tröpfchenweise zugegeben und für 45 min bei 37° C inkubiert. Nach Wechseln des Mediums erfolgte die Transfektion der Zellen mit den gewünschten Plasmiden mittels einer modifizierten Calcium-Phosphat-Methode mit dem „Mammalian Transfection Kit“ (Stratagene).

Je 5 µg Plasmid-DNA wurde auf Eis in 250 µl Aqua dest aufgenommen und 25 µl Lösung 1 hinzugefügt. 250 µl Lösung 2 wurde ebenfalls auf Eis dazugemischt. Die DNA-Lösung wurde 20

min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend tröpfchenweise auf die Zellen gegeben und für 3.5 Std bei 37° C im Inkubator auf den Zellen belassen.

Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen mit 5 ml BHK-21 Medium incl. 10 % FCS und Antibiotika überschichtet und für weitere 24-48 Std. inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Plasmid mit GFP (Green Fluorescent Protein) unter der Kontrolle des T7-Promotors verwendet.

### 2.14 Immunpräzipitation von Proteinen

#### 2.14.1 Co-Immunpräzipitation aus Retikulozyten-Lysat

Die zu untersuchenden Proteine wurden in getrennten Ansätzen mit dem TNT-T7-Quick-Retikulozyten-System (Promega) exprimiert, anschließend je 5+5 µl Lysat in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß gemischt und für 60 min bei 30° C unter gelegentlichem Schütteln co-inkubiert. Anschließend wurden 470 µl TNT-Co-Immunpräzipitationspuffer und 20 µl Protein A-Sepharose sowie spezifische Antikörper (1:200) zugegeben und für 2 Std. bei 4° C unter ständigem Schütteln inkubiert.

Die Probenansätze wurden für 2 min in einer Tischzentrifuge bei 14.000 upm zentrifugiert, die radioaktiven Überstände entsorgt und das Protein A-Sepharosepellet drei mal mit TNT-Co-Immunpräzipitationspuffer gewaschen. Nach dem restlosen Entfernen des flüssigen Überstandes wurde die Sepharose in SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95° C inkubiert. Anschließend erfolgte eine SDS-PAGE. Danach wurde das Gel zwei mal je 15 min in Gelfixierlösung geschwenkt und anschließen auf Filterpapier in einem Gelrockner unter Vakuum getrocknet. Die Auswertung der Signale erfolgte mittels eines Phosphoimagers oder durch Exposition eines Röntgenfilms.

#### **TNT-Co-Immunpräzipitationspuffer**

20 mM	Tris/HCl pH 7.5
150 mM	NaCl
1 mM	DTT
5 mg/ml	Aprotinin
0.5 mM	PMSF
0.1 %	Tween 20

#### **Gelfixierlösung**

20 % Methanol
10 % Essigsäure

#### **Protein A-Sepharose**

10 g Protein A-Sepharose (Amersham Pharmacia) wurde in 10 ml Aqua dest für 15 min gequollen und anschließend zwei mal mit 1 Vol. Aqua dest gewaschen.

Die Sepharose wurde mit 1 Vol. Aqua dest vermischt und aliquotiert bei 4° C gelagert.

Unmittelbar vor Gebrauch wurde die Sepharose zwei mal in dem verwendeten Puffer äquilibriert und in 1 Vol. Puffer aufgenommen.

### 2.14.2 Co-Immunpräzipitation aus Zellkultur

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und auf Eis in 1 ml Lysepuffer B für 10 min lysiert. Das Lysat wurde für 10 min bei 14.000 upm zentrifugiert und das Pellet verworfen. Zur Entfernung von Proteinen mit unspezifischer Bindung zu Protein A-Sepharose wurde das Lysat für 1 Std. mit 50 µl äquilibrierter Protein A-Sepharose bei 4° C geschüttelt und das Pellet nach Zentrifugation verworfen. Anschließend wurden zum Überstand 5 µl Antikörper pipettiert und über Nacht bei 4° C rotiert. Nach Zugabe von 50 µl äquilibrierter Protein A-Sepharose wurden die Proben noch für 1 Std. weiter rotiert. Das resultierende Pellet mit gebundenen Proteinen wurde dreimal mit Vaccinia-Lysepuffer gewaschen und in 30 µl SDS-Probenpuffer aufgekocht. Anschließend erfolgte eine SDS-Gelelektrophorese und die Analyse der Proteine mittels Western-Blot.

#### **Lysepuffer B**

100 mM	Tris/HCl pH 8.0
1 %	Triton-X 100
2 mM	EDTA
150 mM	NaCl
4 µl	Protease-Inhibitor-Stammlösung (1%) pro 10 ml Puffer

### 2.15 Präparation von postnukleären Überständen

Zur Herstellung von postnukleären Überständen wurden adhärente Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Lysepuffer für 5 min überschichtet. Nach der Überführung des Rohlysats in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß wurden die Zelltrümmer durch 2 min Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei 14.000 upm pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 10 Vol. Methanol über Nacht bei -20° C oder für 1 Std. bei -80° C gefällt. Nach der Zentrifugation bei 2.500 g und 4° C für 30 min wurde das resultierende Proteinpellet in TNE resuspendiert.

#### **Lysepuffer für postnukleäre Überstände**

10 mM	Tris/HCl pH 7.5
100 mM	NaCl
10 mM	EDTA
0.5 %	Triton X-100
0.5 %	Desoxycholol (DOC)

#### **TNE**

50 mM	Tris/HCl pH 7.5
150 mM	NaCl
5 mM	EDTA

### 2.16 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsmessung von Proteinen in Lösung wurde photometrisch durchgeführt. Dabei wurde das Coomassie-Protein-Assay-Kit (Pierce) verwendet. Ein Aliquot der Proteinlösung wurde mit 1 ml Probenlösung gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der optischen Dichte bei 595 nm. Als Leerwert wurde TNE in 1 ml Probenlösung gemessen. Als Proteinstandard dienten definierte Mengen Rinderserumalbumin (Merck) in TNE.

### 2.17 SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen wurden denaturierende SDS-Gele mit einem Acrylamid-Gehalt von 12.5 % verwendet (Laemmli, 1970). Dazu wurden die untersuchten Protein-Proben zunächst mit 1/3 Vol. SDS-Probenpuffer gemischt, bei 95° C für 5 min inkubiert und anschließend in die Sammeltaschen der polymerisierten Acrylamidgele pipettiert. Zum Einsatz kamen Gele bzw. Gelapparturen von Owl-Scientific (Penguin-Midisystem) bzw. Pharmacia (TallMighty Small). Die Elektrophorese erfolgte unter Verwendung von 1x SDS-Laufpuffer bei 50-75 mA bis die blaue Lauffront des Probenpuffers das Gelende erreicht hatte.

	<b>Trenngellösung</b>	<b>Sammelgellösung</b>
Tris	18.2 g (= 1.5 M)	6.05 g (= 0.5 M)
SDS	0.4 g	0.4 g
pH ad	8.8	6.8
Aqua dest	ad 100	ad 100

#### **Trenngel (12.5 % Acrylamid)**

30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37.5:1)	25.9 ml
4x Trenngellösung	15.4 ml
Aqua dest	20.3 ml
TEMED	90 µl
10 % APS	192 µl

#### **Sammelgel (5 % Acrylamid)**

30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37.5:1)	2.8 ml
4x Sammelgellösung	4.2 ml
Aqua dest	9.9 ml
TEMED	30 µl
10 % APS	168 µl

#### **SDS-Probenpuffer (4x)**

SDS	7 %
Glycerin	30 %
2-Mercaptoethanol	20 %
Bromphenolblau	0.01 %
In Tris/HCl pH 6.8	90 mM

**SDS-Laufpuffer (10x)**

Tris	30 g
Glycin	144 g
SDS	1 %

**2.18 Western-Blot**

Die elektrophoretisch nach Masse aufgetrennten Proteine wurden mittels einer Semi-Dry-Methode aus den SDS-Polyacrylamidgelen auf eine Membran aus PVDF (Amersham Pharmacia) oder Nitrocellulose (Schleicher & Schuell) elektrisch transferiert. Die Membran wurde vor dem Transfer mit Methanol benetzt und mit dem Acrylamid-Gel zwischen 6 Lagen Whatman-Filterpapier plziert, welche mit Blotting-Puffer getränkt waren. Der Transfer erfolgte mit den Einstellungen 18 V bei 2 A für 45 min unter Verwendung eines Transblot SemiDry-Gerätes (Biorad).

Die PVDF-Membran wurde anschließend mit 5 % Magermilchpulver (Merck) in TBST für 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungskapazitäten der Membran abzusättigen.

**Blotting-Puffer**

Methanol	20 %
Tris	3 g
Glycin	14.5 g
ad 1 l	Aqua dest

**TBST**

Tween 20	0.05 %
NaCl	100 mM
Tris/HCl pH 7.4	10 mM

Die mit Magermilchpulver abgesättigte PVDF-Membran mit den Proteinproben wurde über Nacht bei 4° C mit spezifischen primären Antikörpern in TBST geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen in TBST wurde ein entsprechender Peroxidase-gekoppelter Sekundäantikörper (Amersham Pharmacia) in einer Verdünnung von 1:10.000 in TBST für 30-60 min zugegeben. Abschließend erfolgten erneut drei Waschschritte in TBST und ein letzter in Aqua dest. Die Detektion der gebundenen Antikörper wurden mittels der Chemilumineszenz-Kits ECL oder ECLplus (Amersham Pharmacia) durchgeführt. Dazu wurde die Membran für 1 min in ECL-Lösung geschwenkt, die Flüssigkeit durch Abtupfen mit Filterpapier entfernt und die Lumineszenz durch Exposition auf einem Films (Kodak Biomax XS) detektiert.



## 2.19 Verwendete Antikörper

Zur Durchführung von Immunpräzipitationen und Detektion von Proteinen auf Immunoblots wurden Antikörper verwendet, deren Herkunft, Bezugsquelle und Spezifität in Tabelle 7 zusammengefasst sind.

**Tabelle 7:** verwendete Antikörper

Name	Spezifität	Antikörperherkunft und Typ	Bezugsquelle
β-Actin	β-Actin	Maus monoklonal	Sigma
3F4	3F4-Epitop von PrP (in Hamster/Mensch vorhanden)	Maus monoklonal	Signet Pathology Systems
4F2	N-Terminus von PrP	Maus monoklonal	Prof. Hunsmann (Deutsches Primatenzentrum Göttingen)
Rab6 C-19	Rab6; C-Terminus	Kaninchen polyklonal	Santa Cruz
Calnexin	Alle Spezies	Kaninchen polyklonal	Stressgen
3F2	Grb2; N-Terminus	Maus monoklonal	Upstate
Grb2	Grb2; C-Terminus	Kaninchen polyklonal	Stressgen
Grb2	Grb2; C-Terminus	Kaninchen polyklonal	A. Ullrich (MPI Martinsried)
A10C	Synapsin I; C-Terminus	Maus monoklonal	Biozym
SynI	Synapsin I; gesamtes Protein	Kaninchen polyklonal	Sigma
3F10	HA-Epitop	Ratte monoklonal	Roche
Y-11	HA-Epitop	Kaninchen polyklonal	Santa Cruz
F-7	HA-Epitop	Maus monoklonal	Santa Cruz
9E10	c-Myc-Epitop	Maus monoklonal	Santa Cruz
Anti-Maus IgG	peroxidasegekoppelter Sekundärantikörper	Schaf polyklonal	Amersham Pharmacia
Anti-Kaninchen IgG	peroxidasegekoppelter Sekundärantikörper	Esel polyklonal	Amersham Pharmacia

## 2.20 Löslichkeitsassays

### 2.20.1 Ultrazentrifugation in Sarcosyl

Ein wesentliches Charakteristikum, das PrP<sup>C</sup> von PrP<sup>Sc</sup> biochemisch unterscheidet, ist das Löslichkeitsverhalten in nichtionischen Detergenzien. PrP<sup>Sc</sup> ist darin unlöslich und kann pelletiert werden, wohingegen PrP<sup>C</sup> löslich im Überstand verbleibt.

Zur Durchführung eines Löslichkeitsassays wurden zunächst 1 ml postnukleäre Zell-Lysate hergestellt und mit Proteinaseinhibitoren und 1 % N-Laurylsarcosin (Sarcosyl) versetzt.

Die Ultrazentrifugation erfolgte in einer Beckman-Zentrifuge mit dem Rotor TL-100 für 1 Std. bei 100.000 g und 4° C. Das Pellet (unlösliche Fraktion) wurde in 50 µl TNE resuspendiert. Der

Überstand (lösliche Fraktion) wurde zunächst mit 10 Vol. Methanol gefällt und nach der Zentrifugation bei 2.500 g in 150 µl TNE aufgenommen.

### 2.20.2 Fällung mit Phosphowolframsäure

Eine weitere Methode, die sich zur Unterscheidung zwischen PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> eignet, ist die Fällung der Proteine mit Phosphowolframsäure (engl. Phospho-Tungstic-Acid, kurz PTA). PrP<sup>Sc</sup> wird durch die Säure gefällt und somit unlöslich, PrP<sup>C</sup> hingegen nicht.

Dazu wurden zu den postnukleären Zell-Lysaten 2 % Sarcosyl und 0,2 % PTA-Stammlösung zugegeben und über Nacht bei 37° C in einem Heizblock geschüttelt. PrP<sup>Sc</sup> konnte durch Zentrifugieren bei 4° C in einer Tischzentrifuge für 30 min bei 14.000 upm pelletiert werden. Die weitere Behandlung der Proben erfolgte wie nach der Ultrazentrifugation in Sarcosyl.

#### **PTA-Stammlösung**

4 %	NaPTA
170 mM	MgCl <sub>2</sub>
pH ad 7.4	

### 2.21 Proteinase K-Verdau

Ein wesentliches biochemisches Charakteristikum von PrP<sup>Sc</sup> ist seine partielle Resistenz gegenüber proteolytischen Enzymen, die die zelluläre Isoform PrP<sup>C</sup> nicht besitzt. Daher kann man diese Eigenschaft als diagnostische Methode zur Differenzierung zwischen der zellulären und der pathogenen Isoform ausnützen, da PrP<sup>C</sup> von Proteinase K völlig abgedaut wird.

1 ml postnukleärer Überstand wurde zu je 500 µl aliquotiert. Ein Aliquot wurde mit 20 µg/ml Proteinase K (Roche) versetzt und für 30 min bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit einer Mischung aus Proteinaseinhibitoren (Roche) unterbrochen. Das Aliquot ohne Proteinase wurde sofort mit Inhibitoren behandelt. Beide Ansätze wurden mit 10 Vol. Methanol bei -20° C über Nacht gefällt. Die gefällten Proteine wurden bei 2.500 g für 30 min bei 4° C pelletiert, in TNE resuspendiert und mit SDS-Probenpuffer aufgekocht.

### 2.22 Herstellung von Antiseren

Die Erzeugung von Antiseren gegen ein Peptid aus der bekannten Pint1-Sequenz erfolgte kommerziell durch die Firma GENOSYS. Als Immunogen wurde zunächst ein Peptid synthetisiert und an KLH gekoppelt. Bei zwei Kaninchen wurde Serum vor der Immunisierung abgenommen (Präimmunserum) und anschließend das Peptid injiziert. Im Abstand von je 21 Tagen erfolgten zwei weitere Immunisierungen mit dem Peptid, nachdem jeweils Antiseren abgenommen wurden. Das endgültige Ausbluten erfolgte nach 12 Wochen.

### 2.23 Präparation von Mikrosomen

Mikrosomen repräsentieren intrazelluläre Vesikel, welche beim Transport von Proteinen vom endoplasmatischen Retikulum über den Golgiapparat zur Zelloberfläche und zurück in endosomale Kompartimente zu finden sind. Da sich die Vesikel in der Größe und Dichte unterscheiden, können sie mittels eines Gradienten in Vesikel des ER und Golgiapparates getrennt werden (Tabas und Kornfeld, 1979). Dazu kam ein „Flow-up“ Gradient aus Sucrose zum Einsatz.

Ca.  $2 \cdot 10^8$  adhärenente Zellen (5 Schalen) wurden zunächst in PBS gewaschen und mit Puffer A (0.5 M Sucrose) überschichtet. Mit Hilfe eines Gummischabers wurden die Zellen abgelöst und mittels eines Douncers auf Eis zerstört. Die Effizienz wurde unter dem Mikroskop mittels Trypanblau-Färbung überprüft. Dabei erschienen die toten, d.h. aufgeschlossenen Zellen blau, während sich die intakten Zellen nicht anfärben. Anschließend wurde der Sucrosegehalt der Puffer A-Lösung auf 1.2 M erhöht und durch Überschichtung ein Gradient mit unterschiedlichen Sucrosekonzentrationen in SW-41-Zentrifugenröhrchen (Beckman) auf Eis hergestellt: 4 ml der Probenlösung (mit 1.2 M Sucrose) wurden mit 3 ml 1.1 M Sucrose, 2 ml 1.0 M Sucrose und 5 ml 0.5 M Sucrose überschichtet. Die Zentrifugation erfolgte bei 4° C für 2 Std. bei 100.000 g in einer Beckman L8-80 Ultrazentrifuge mit SW 41 Swing-Out Rotor.

Bei 0.8 M (Golgi-Fraktion) und ca. 1.15 M (ER-Fraktion) Sucrose waren zwei opaque Banden sichtbar. Diese wurden mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgenommen und bis zur Analyse aliquotiert bei -80° C gelagert.

<b>Puffer A:</b>	0.5 M	Sucrose
	10 mM	Tris/HCl pH 7.4
	5 mM	EDTA
<b>Sucrose-Lösungen:</b>	10 mM	Tris/HCl pH 7.4
und je	2.4 M	Sucrose
	1.1 M	
	1.0 M	
	0.5 M	

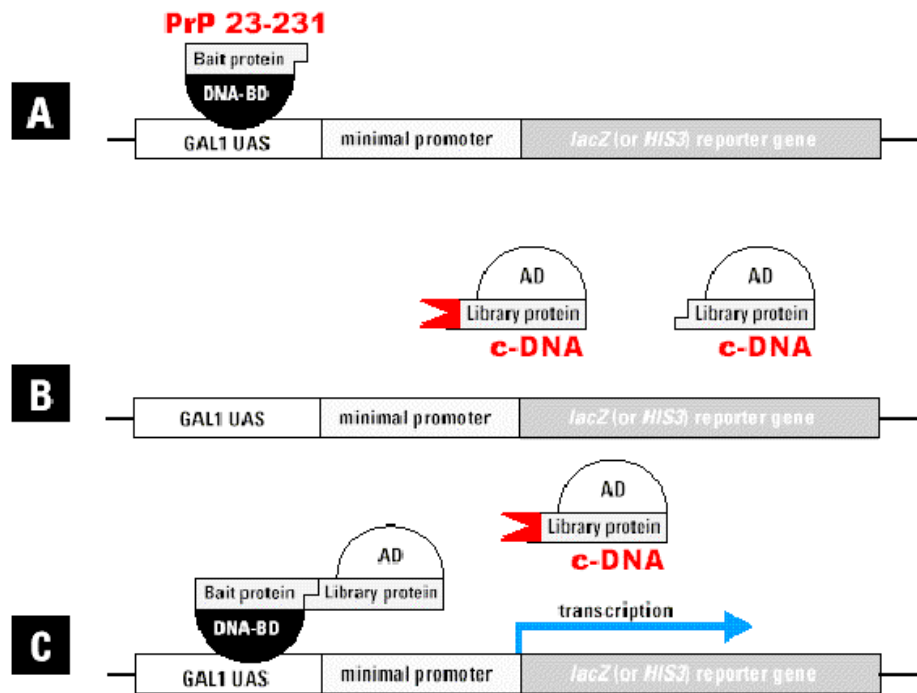
### 3 Ergebnisse

Die zentrale Zielsetzung dieser Arbeit war die Identifizierung noch nicht bekannter Interaktionspartner des zellulären Prion-Proteins, um einen Einblick bzw. Hinweis auf dessen Rolle im Zellmetabolismus zu erlangen. Zu diesem Zweck kam ein Gal4-basiertes Yeast-Two-Hybrid-System zum Einsatz. Dabei wurde darauf geachtet, dass sowohl das „Köder“-Protein (im vorliegenden Fall Maus PrP 23-231), als auch die „Beute“-cDNA-Bank aus Maus stammte. Zusätzlich wurde eine cDNA-Bank aus Gewebe gewählt, in dem eine hohe PrP<sup>C</sup>-Expression vorliegt. Beide Voraussetzungen sind bei einer Maus-Hirn-cDNA-Bank gegeben. Weitere Vorteile der Verwendung eines Maus-basierten Systems sind, dass diese Spezies anschließend sowohl für die Durchführung von Prion-Infektionsversuchen nutzbar ist, als auch für die Erzeugung von Knockout-Mutanten eines gewünschten Genes herangezogen werden kann, wenn diese nicht ohnehin schon verfügbar sind.

#### 3.1 Das Prinzip der Yeast-Two-Hybrid-Interaktion

Fields und Song beschrieben 1989 erstmals eine neue Methode, um Protein-Protein-Interaktionen zu testen (Fields und Song, 1989). Bei dem Prinzip dieser „Yeast-Two-Hybrid“-Interaktion macht man sich zu Nutze, dass der Gal4-Transkriptionsaktivator aus zwei klar definierten Domänen aufgebaut ist. Eine Domäne ist für die DNA-Bindung an die Gal-Promotorregion verantwortlich (Gal4-DNA-Binding Domain; DNA-BD) während die zweite Domäne zur Transkriptionsaktivierung führt (Activation Domain; AD), indem sie der RNA-Polymerase eine effiziente Anlagerung an der DNA ermöglicht. Im Normalzustand werden beide Funktionen von einem einzigen Protein übernommen, das an den Promotor bindet und zugleich zur korrekten Transkriptionsaktivierung führt. Genetisch lassen sich aber beide Domänen trennen und auch getrennt exprimieren. Bei einer Coexpression der getrennten Domänen kommt es zu keiner effektiven Transkriptionsinitiation, da sich zwar die DNA-Bindedomäne an die Promotorregion anlagern kann, nicht aber die Aktivierungsdomäne. Die für die Komplexbildung nötige Nähe kann über Fusionsanteile erreicht werden, die an die entsprechenden Domänen ligiert werden. So entsteht ein Fusionsprotein aus der DNA-BD mit dem Protein, mit dem gesucht werden soll („Bait“=Köder-Protein) und eine Bibliothek aus Proteinen, die im untersuchten Gewebe exprimiert werden und mit der Aktivierungsdomäne fusioniert sind („Prey“=Beute-Protein). Nur wenn die Fusionsanteile des Beute- und Köderproteins miteinander interagieren, führt dies über eine Brückenbildung zu der nötigen Nähe der DNA-BD- und AD-Domänen: es kommt zu einer effizienten Heranführung und Anlagerung der RNA-Polymerase und damit zur Transkriptionsaktivierung des dahinterliegenden Gens. Um aus einer Protein-Bibliothek aktiv nur auf interagierende Proteine selektieren zu können, werden Reportergene verwendet, die stabil in das Genom eines geeigneten Hefestammes integriert sind. Im Falle des

verwendeten Matchmaker2-Systems werden zwei Reportergene benutzt, die unabhängig voneinander im Hefegenom vorliegen: das His3-Gen ermöglicht den verwendeten auxotrophen Hefestämmen Y190 und Y187 das Wachstum auf Medium ohne Histidin. Das zweite Reportergen codiert für  $\beta$ -Galaktosidase, deren Expression bzw. Aktivität farblich nachgewiesen werden kann.

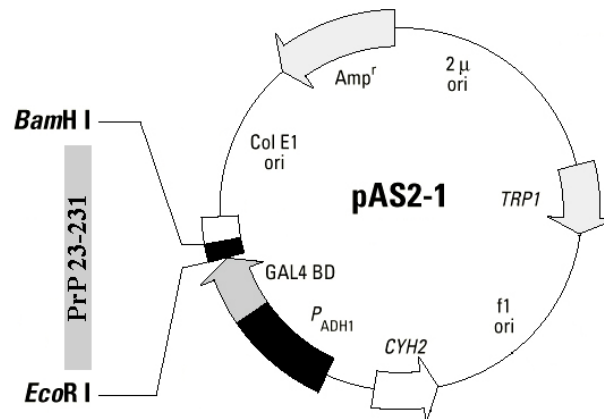


**Abbildung 11:** das Prinzip des Yeast-Two-Hybrid Systems (auch „Interaction-Trap“ genannt). Das System besteht aus drei Komponenten in einem geeigneten Hefestamm. Zwei Plasmide kodieren für Fusionsproteine mit der Gal4-DNA-bindenden Domäne („Bait“) bzw. der Gal4-transaktivierenden Domäne („Prey“). Im Falle einer Interaktion der Fusionsanteile wird im Zellkern ein Reportergen aktiviert, das im Hefegenom stabil integriert ist. Die Expression des/der Reportergene führt zu einer Komplementation einer Auxotrophie und/oder zur Bildung eines colorimetrisch messbaren Proteins. **A:** Bindung des Gal4 DNA-BD::PrP-Fusionsproteins an die upstream-activation-site (UAS) des Minimalpromotors. **B:** Fusionsproteine aus der Gal4-AD und den Bibliotheksproteinen können alleine weder an DNA binden, noch eine Transkription induzieren. **C:** nur wenn eine Interaktion zwischen dem Köder-Protein (Bait) und einem AD::Bibliotheksprotein stattfindet, führt dies zur Expression des Reportergens. Die meisten AD-Fusionsproteine interagieren nicht, daher können alle Hefen, in denen keine Expression des HIS3-Gens erfolgt nicht auf Histidin-Mangelmedium wachsen (modifiziert nach dem Matchmaker2-Manual, Clontech).

Ein großer Vorteil der Untersuchung einer Protein-Bibliothek mittels der Yeast-Two-Hybrid-Methode besteht darin, dass über die zu identifizierenden Interaktoren nichts bekannt sein . Trotzdem müssen einige Voraussetzungen erfüllt werden, damit die Suche erfolgversprechend verläuft. Dazu gehört, dass das sogenannte „Köder“-Plasmid in Hefe exprimiert werden kann, d.h. nicht toxisch auf den Hefemetabolismus wirkt. Des weiteren darf das Fusionsprotein aus der Gal4-DNA-Bindedomäne und dem Köder-Protein nicht selbstständig eine Transkriptionsaktivierung auslösen.

### 3.2 Vorversuche

Wie bereits beschrieben, darf die alleinige Expression des Beuteproteins aus DNA-BD und PrP 23-231 weder zu einer Transkriptionsaktivierung des Reportergens führen, noch toxisch für Hefezellen sein. Um dies zu überprüfen, wurde der Hefestamm Y190 mit dem PrP-codierenden Plasmid pAS 23-231 (Abbildung 12) transformiert und auf SD-Selektivmedium ohne Trp und His ausplattiert. Nach 5 Tagen waren Kolonien sichtbar, die aber in einem  $\beta$ -Galaktosidase Filter-Assay keine Blaufärbung ergaben. Als Positivkontrolle diente das Plasmid pCL1, das für den kompletten Gal4-Transkriptionsaktivator (das Holoenzym aus DNA-Binde- und Aktivierungsdomäne) codiert. Dieses wurde ebenfalls in Y190 transformiert und auf SD-Medium ohne His und Leu selektiert. Ein Test dieser Kolonien auf  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität führte nach kurzer Zeit zu einer intensiven Blaufärbung.

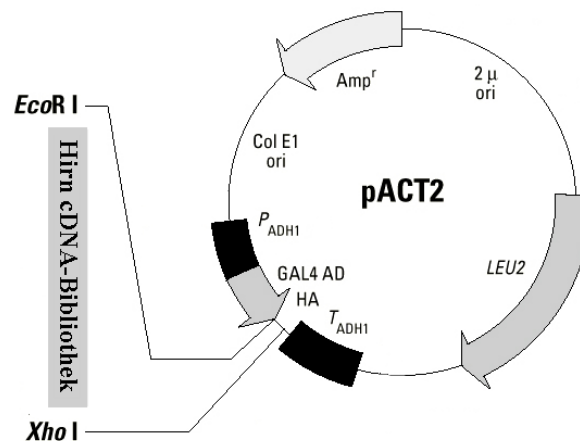


**Abbildung 12:** Aufbau des PrP-codierenden Köder-Plasmids pAS 23-231. Das Plasmid beinhaltet den konstitutiven ADH1-Promotor, der in Hefe zu einer Expression der DNA-Bindedomäne plus PrP-Anteil führt. Da sowohl ein bakterieller ColE1 ori, als auch ein hefespezifischer 2 $\mu$  Replikationsursprung vorhanden sind, kann das Plasmid sowohl in Hefe, als auch in *E.coli* replizieren. Als Selektionsmarker sind eine Ampicillinresistenz (für Bakterien) und TRP1, ein Protein für Tryptophan-Autotrophie (für Hefen) vorhanden. Das CYH2-Genprodukt führt zu einer Wiederherstellung der Empfindlichkeit gegenüber Cycloheximid in dem resistenten Hefestamm Y190.

Dieser Vorversuch zeigt, dass die Expression des BD-PrP-Fusionsproteins *per se* nicht toxisch auf den Hefestamm Y190 ist und die alleinige Expression von BD-PrP 23-231 nicht zu einer Aktivierung des  $\beta$ -Galaktosidase-Reportergens führt. Dies machte das Konstrukt geeignet für die Verwendung bei der Suche nach Interaktoren in einer cDNA-Bank mit dem verwendeten Selektionssystem.

### 3.3 Durchführung der Interaktorensuche mittels der Yeast-Two-Hybrid-Methode

Um eine möglichst hohe Anzahl von Hefezellen zu erhalten, die sowohl das Köder- als auch Beute-Plasmide enthielten, wurde eine sequenzielle Transformation gewählt. Das bedeutet, dass der Hefestamm Y190 zunächst mit dem Köder-Plasmid pAS 23-231 stabil transfiziert wurde. Erst anschließend erfolgte die Transformation mit den Plasmiden der cDNA-Bibliothek in pACT2 (Abbildung 13). Dieses Verfahren führt zu einer höheren Wahrscheinlichkeit, dass beide Plasmide in den Hefen vorliegen.



**Abbildung 13:** Aufbau des Plasmids pACT2 mit den klonierten cDNA-Inserts aus Mäusehirn. Es ist ein Selektionsmarker für Bakterien (Amp<sup>R</sup>) sowie Hefen (LEU2) vorhanden. Die beiden Replikationsursprünge ColE1 und 2µ ermöglichen die Vermehrung in Bakterien und Hefen. Der konstitutive ADH1-Promotor führt zu einer Expression eines Fusionsproteins, welches aus der Gal4-Transkriptionsaktivator-domäne (Gal4 AD), gefolgt von einem Hämagglutinin-Epitop (HA) und den cDNA-codierten Anteilen besteht. Die cDNA wurde über die Schnittstellen *EcoRI* und *XhoI* in die Plasmide eingeführt.

Das HIS3-Gen unter der Kontrolle des Gal4-Promotors, dessen Genprodukt neben der  $\beta$ -Galaktosidase in dem Hefestamm Y190 als Reporter dient, weist in Y190 eine relativ hohe Basalexpression auf. Das bedeutet, dass teilweise auch Hefeklonen auf His-Mangelmedium wachsen können, in denen keine Aktivierung des Reportergens durch eine Interaktion der Beute/Köder-Proteine vorliegt. Dies kann prinzipiell durch die Zugabe von 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT) unterdrückt werden. Nachteilig dabei ist, dass dadurch gleichzeitig eine Aktivierung durch schwache Interaktionen zwischen PrP und den Beuteproteinen reprimiert wird. Das zweite Reportergen, das für  $\beta$ -Galaktosidase codiert, zeigt keine Basalexpression, d.h. der Promotor ist stringent reguliert und nur eine tatsächliche Transkriptionsaktivierung durch Protein-Protein-Wechselwirkungen führt zu einer Blaufärbung mittels X-Gal.

Um auch schwache Interaktionen zu identifizieren, wurde auf die Verwendung von 3-AT verzichtet und das Wachstum von „falsch positiven“ Y190-Hefekolonien ohne eigentliche HIS3-Aktivierung in Kauf genommen.

Die Suche nach PrP-interagierenden Proteinen mittels des Yeast-Two-Hybrid-Assays führte zur Isolierung von ca. 50 Hefekolonien, welche zu einer Blaufärbung im  $\beta$ -Galaktosidase-Filtertest führten. Aus diesen Hefeklonen wurden die korrespondierenden pACT-Bibliotheksplasmide isoliert und für mehrere Kontrollexperimente eingesetzt.

Zum einen wurden die Isolate mit dem Plasmid pLam5-1 in Y190 cotransformiert, welches für Lamin C in Fusion mit Gal4-DNA-BD codiert. Dieses Protein verhält sich inert, d.h. es geht keine bekannten Bindungen in Hefe ein. Dabei dennoch beobachtete positive Interaktionen kamen offenbar durch die Wechselwirkung der Fusionsproteine mit dem Gal4-BD-Anteil zustande und nicht durch Interaktionen mit dem PrP-Anteil. Als weitere Kontrolle wurden die pACT-Bibliotheksplasmide alleine in Hefe transfiziert. Kolonien, welche anschließend eine Blaufärbung zeigten exprimierten wahrscheinlich Fusionsproteine, welche neben der AD-Domäne eine DNA-bindende Eigenschaft aufwiesen und somit funktionell zur Rekonstituierung eines Wildtyp-Gal4-Transkriptionsaktivators führten. Alle diese Isolate wurden verworfen und nicht näher untersucht.

### 3.4 PrP interagiert in Hefe mit diversen Proteinen unterschiedlicher Proteinklassen

Die meisten der anfänglich  $\beta$ -Gal-positiven Hefeisolate konnten durch die durchgeführten Kontrollexperimente als Artefakte identifiziert werden. Es verblieben jedoch noch einige Isolate, die alle Selektionskriterien überstanden. Die Plasmide dieser potentiellen PrP-Interaktoren wurden sequenziert und einer Homologiesuche zu bekannten Proteinsequenzen in der Genbank mittels des BLAST-Algorithmus (Altschul et al., 1997) unterzogen. Das Ergebnis der Suche ist in Tabelle 8 zusammengefasst.

**Tabelle 8:** das Ergebnis der Homologiesuche mit den isolierten putativen PrP-Interaktoren

Homologie zu	Funktion	Kommentar
TIM 17	Präprotein: Bestandteil der Importmaschinerie in der inneren Mitochondrienmembran	falsch positiv
Murines mitochondriales Genomfragment	???	falsch positiv
MHC locus class III region Hsc70t	???	falsch positiv
Isocitrat-Dehydrogenase Untereinheit 3	Zitronensäurezyklus	falsch positiv
Lmp3	$\beta$ -Proteasomen Untereinheit	falsch positiv
CDR 34	cerebellar degeneration related antigen	Multirepeatprotein
MDJ	Säugetierhomolog zu DnaJ Chaperon	falsch positiv Hohe Homologie
RBP	Retinol-bindendes Protein	Hohe Homologie
EST-Klon AAC19158 und andere	???	Hohe Homologie
Grb2	Growthfactor receptor-bound protein 2	Hohe Homologie
Synapsin Ib	neuronaes Phosphoprotein	Hohe Homologie



Neben den aufgeführten Proteinen wurden noch einige weitere Proteine entdeckt, deren Sequenzen zu keinem Genbankeintrag signifikante Homologien aufwiesen und daher nicht weiter untersucht wurden. Es wurden keine bereits als PrP-Interaktoren beschriebenen Proteine gefunden.

Die meisten der identifizierten Interaktoren sind bereits bekannte und charakterisierte Proteine. Viele von ihnen können aber der Gruppe der bekannten falsch positiven Bindungspartner zugerechnet werden. Diese führen in Hefe häufig zur Aktivierung der Reportergene, ohne dass eine tatsächliche physiologische Interaktion mit dem Köder-Protein auftritt (Luban und Goff, 1995). So zählt TIM17 zu mitochondrialen Proteinen, die regelmäßig in hoher Zahl in Yeast-Two-Hybrid-Assays mit ganz unterschiedlichen Köderproteinen isoliert werden. Auch Proteine aus dem Zitronensäurezyklus und MHC-Loci sind oft an einer unspezifischen Aktivierung des Reportergens beteiligt und wurden deswegen in den Folgeexperimenten nicht näher untersucht.

Einige weitere Proteine sind ebenfalls mit hoher Wahrscheinlichkeit keine spezifischen Interaktoren des Prion-Proteins, wie z.B. das Proteasomenprotein Lmp3. Proteasomen spielen zwar unter Umständen beim Abbau von PrP<sup>C</sup> eine Rolle (Yedidia et al., 2001), sind aber nicht unmittelbar mit der physiologischen Funktion des Prion-Proteins korreliert. Das Auffinden eines Chaperones (MDJ) scheint zunächst von Interesse zu sein, da PrP oft in den Zusammenhang mit solchen Proteinen gebracht wird und der Faktor X (siehe Einleitung) möglicherweise solch ein Chaperon ist. Die Grundfunktion dieser Proteinklasse ist die Katalyse einer korrekten Faltung von Proteinen. Hsp60 gehört ebenfalls zu dieser Proteinfamilie und wurde von Edenhofer et al. in einem Y2H-Assay als Interaktor eines GST-fusionierten Hamster-PrP beschrieben (Edenhofer et al., 1996). Allerdings sind Heatshockproteine sehr häufig auftretende falsch positive Interaktoren in Hefe. Das in der vorliegenden Arbeit identifizierte Chaperon MDJ wurde auch von anderen Gruppen gefunden, die weder mit PrP noch mit einer neuronalen cDNA-Bank nach Interaktoren suchten (Michael Wolff, unveröffentlichte Daten). Daher wurde dieses Protein nicht als spezifischer Interaktor des Prion-Proteins angesehen.

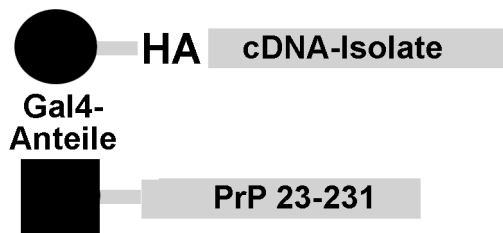
Mittels der in Hefe durchgeführten Suche nach Interaktoren des murinen Prion-Proteins PrP 23-231 konnten eine Anzahl von noch nicht beschriebenen potentiellen Bindungspartnern aus einer exprimierten Hirn-Protein-Bibliothek identifiziert werden.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden drei Proteine mit einem langen Bereich hoher Homologie zu Genbankeinträgen für weitere Untersuchungen herangezogen. Dies waren ein Protein mit starker Ähnlichkeit zu mehreren EST-Sequenzen (Expressed Sequence Tags), das von uns den Namen Pint1 (für Prion-Interaktor 1) erhielt. Das zweite Protein war das Adaptorprotein Grb2 und das dritte das neuronale Phosphoprotein Synapsin Ib.

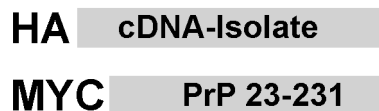
### 3.5 Bestätigung der Wechselwirkungen durch alternative Interaktionsassays

Die Suche nach Interaktoren in einem hefebasierten System war der erste Schritt, um *in vivo* auftretende physiologische Wechselwirkungen aufzudecken. Viele der zunächst identifizierten möglichen Interaktionen treten eher unwahrscheinlich im zellulären Kontext einer Säugetierzelle auf. Daher sollte im Folgenden geklärt werden, ob der Nachweis einer Interaktion von PrP mit den drei Isolaten auch außerhalb eines hefebasierten experimentellen Ansatzes geführt werden kann. Dazu te ein System gefunden werden, das die kontrollierte Expression und Detektion der untersuchten Proteine ermöglicht. Dies lässt sich mittels definierter Promotoren erzielen, deren Aktivierung bzw. Verwendung gesteuert werden kann, wie z.B. der T7-Promotor. Dieser DNA-Abschnitt wird spezifisch von der T7-RNA-Polymerase erkannt und die nachfolgende DNA-Sequenz in mRNA transkribiert. Daher eignen sich Systeme mit einer T7-basierten Expression gut für die Erzeugung von Proteinen für weitere *in vitro* Untersuchungen.

#### Hefe



#### T7-System



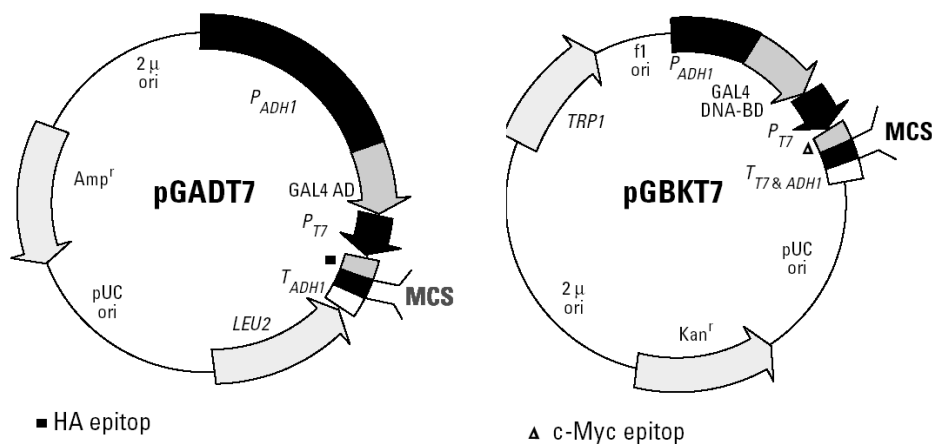
**Abbildung 14:** schematischer Vergleich der in Hefe exprimierten Fusionsproteine des Matchmaker2-Systems mit einem T7-Polymerase-basierten Expressionssystem. In *S.cerevisiae* werden Proteine gebildet, die N-terminal mit der Gal4-DNA-Bindedomäne bzw. Aktivierungsdomäne beginnen (Kreis bzw. Rechteck) und an die sich die gewünschten Proteine anschließen; die Bibliotheksisolate enthalten zwischen der Gal4-AD und der codierenden Sequenz ein HA-Epitop. Außerhalb der Hefe führt die Verwendung eines T7-Promotors zur Bildung von Proteinen, die keine Gal4-Anteile mehr besitzen, sondern mit einem HA- bzw. c-Myc-Epitop beginnen, gefolgt von dem codierenden Bereich der untersuchten Proteine.

#### 3.5.1 Klonierung von PrP und der PrP-Interaktoren in Plasmide mit T7-Promotor

Die ursprünglich verwendeten Plasmide pAS2-1 und pACT2 des Matchmaker2-Systems besitzen keinen T7-Promotor oder andere kontrollierbare Promotoren, d.h. sie sind für eine gezielte *in vitro* Transkription nicht geeignet. Die Plasmide pGADT7 und pGBKT7 des Matchmaker3-Systems (Clontech) sind dahingegen optimiert, dass sie diesen Promotor zwischen den codierenden Bereichen der Gal4-Domänen und der Multiple Cloning Site enthalten. Ein weiterer

Vorteil dieser Plasmide besteht darin, dass die resultierenden Proteine ohne den „Hefeanteil“ gebildet werden, d.h. die Gal4-Domänen für DNA-Bindung und Transkriptionsaktivierung werden nicht transkribiert (Abbildung 14).

Zusätzlich ist ein N-terminales Epitop aus c-Myc vor der PrP-Sequenz bzw. ein Hämagglutinin-Epitop (HA) vor den PrP-Interaktoren vorhanden, worüber die Proteine mit den entsprechenden Epitop-Antikörpern leicht detektiert bzw. präzipitiert werden können. Daher wurden die drei näher untersuchten PrP-Interaktoren Synapsin, Pint1 und Grb2, sowie PrP 23-231 aus pAS2 bzw. pACT in die Vektoren pGADT7 bzw. pGBKT7 so umklontiert, dass keine Verschiebung des Leserahmens auftrat. Dies erfolgte über die Restriktionsschnittstellen für *EcoRI* und *XhoI*.



**Abbildung 15:** die beiden Plasmide pGADT7 und pGBKT7 des Matchmaker3-Systems besitzen beide einen T7-Promotor (P<sub>T7</sub>). Die ursprünglich in pAS bzw. pACT vorliegenden Interaktoren wurden mittels geeigneter Restriktionsenzyme in die Multiple-Cloning-Sites (MCS) dieser Zielpasmide kloniert. Die Benutzung des T7-Promotors zur Expression führt zu Proteinen, die N-terminal mit einem HA-Epitop (pGADT7, Rechteck) bzw. einem c-Myc Epitop (pGBKT7, Dreieck) markiert sind und keine Hefe-Gal4-Anteile besitzen.

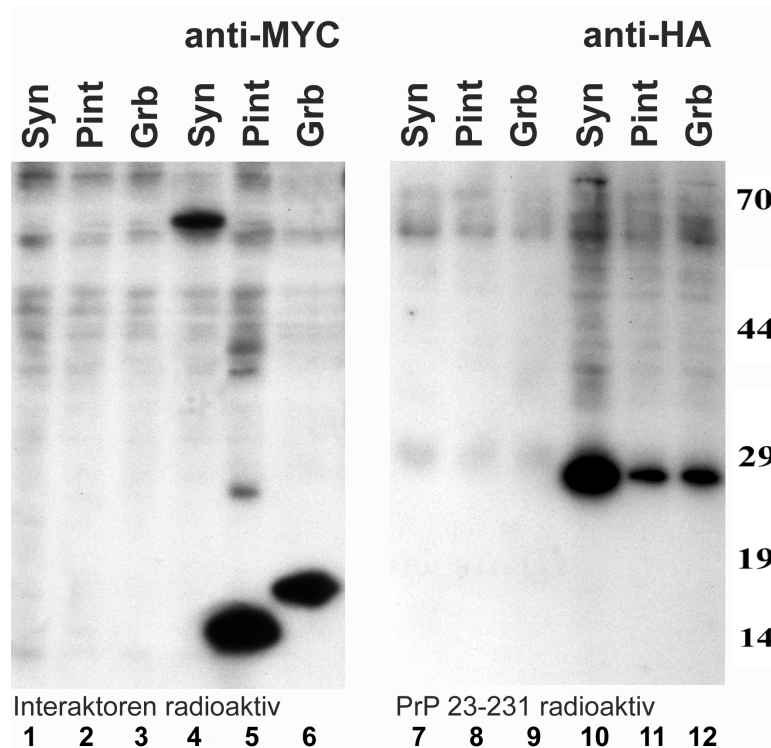
### 3.5.2 Co-Präzipitation von PrP 23-231 mit den PrP-Interaktoren in Retikulozytenlysat

Zellfreies Lysat aus Retikulozyten der Ratte enthält alle notwendigen Enzyme und Faktoren, um eine effiziente *in vitro* Translation zu ermöglichen. Durch Zugabe von T7-Polymerase kann man eine gekoppelte Transkription/Translation von DNA erzielen, sofern diese einen T7-Promotor enthält. Da das Lysat keine störende Fremd-DNA enthält, kann durch Zugabe von radioaktivem <sup>35</sup>S-Cystein/Methionin zur Translationsreaktion eine spezifische Markierung des gewünschten Proteins erreicht werden.

Nach einer Coinkubation der getrennt exprimierten Proteine wurde versucht, möglicherweise gebildete Komplexe mittels Antikörper zu präzipitieren.

Als DNA-Vorlage diente das Plasmid pGADT7 jeweils mit den cDNA-Inserts der PrP-Interaktoren Synapsin, Pint1 und Grb2 bzw. pGBKT7 23-231 mit murinem PrP. Auf diese Weise wurden die drei Hefe-Isolate als radioaktiv markierte (und HA-getaggte) Proteine exprimiert und

mit nicht radioaktivem c-Myc PrP 23-231, das über dasselbe Verfahren hergestellt wurde, für eine Stunde co-inkubiert. Diese Ansätze wurden in 1 ml TNT-Co-IP-Puffer mittels des monoklonalen c-Myc-Antikörpers 9E10 einer Präzipitation mit Protein A- Sepharose unterzogen. Die gewaschene Sepharose wurde in SDS-Probenpuffer gekocht und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Trocknung des Gels wurden die radioaktiven Signale mittels eines Röntgenfilms ausgewertet (Abbildung 16).



**Abbildung 16:** Co-Präzipitation der mittels T7-Retikulozytenlysat *in vitro* erzeugten Proteine. **links:** die drei radioaktiv markierten HA-PrP-Interaktoren Synapsin, Pint1 und Grb2 wurden mit unmarkiertem c-Myc PrP 23-231 co-inkubiert und der Komplex mit einem anti-Myc Antikörper co-präzipitiert (Spur 4-6). Zur Kontrolle wurden identische Ansätze ohne Antikörper inkubiert (Spur 1-3) **rechts:** c-Myc PrP 23-231 wurde radioaktiv markiert und eine Präzipitation der Komplexe mit den unmarkierten HA-PrP-Interaktoren mittels eines HA-Antikörpers durchgeführt (Spur 10-12) bzw. ohne Antikörper inkubiert (Spur 7-9). (Abkürzungen: Syn=Synapsin I; Pint=Pint1; Grb=Grb2)

Sowohl Synapsin I, als auch Pint1 und Grb2 co-präzipitieren mit c-Myc PrP 23-231 (Spuren 4-6), wohingegen in den Kontrollansätzen ohne c-Myc-Antikörper kein Signal sichtbar ist (Spur 1-3). Alle drei Proteine zeigen eine Affinität zu PrP 23-231, die nicht durch eine unspezifische Bindung an die Protein A-Sepharose zustande kommt.

Ein homologes Verfahren wurde angewendet, um radioaktiv markiertes c-Myc PrP 23-231 mit den drei nicht radioaktiven HA-PrP-Interaktoren zu co-inkubieren. Diese Ansätze wurden mit einem monoklonalen HA-Antikörper inkubiert, mittels Protein A-Sepharose präzipitiert und die radioaktiven Präzipitate mittels SDS-PAGE analysiert. Hierbei zeigte sich bei allen drei Isolaten eine gleich große Bande, deren Masse dem von c-Myc PrP 23-231 entspricht (Spuren 10-12).

Wieder sind keine spezifischen Banden in den Negativkontrollen sichtbar, die jeweils ohne HA-Antikörper inkubiert und präzipitiert wurden (Spuren 7-9). In einem weiteren Kontrollversuch wurden die radioaktiven HA-PrP-Interaktoren mit dem c-Myc-Antikörper und radioaktives c-Myc PrP 23-231 mit dem HA-Antikörper co-inkubiert, um eine unspezifische Bindung zu testen. Nach Präzipitation mit Protein A-Sepharose waren dort ebenfalls keine Banden sichtbar, die auf eine unspezifische Bindung hindeuteten (Daten nicht gezeigt).

Die beobachteten Banden sind folglich das Resultat einer spezifischen Komplexbildung zwischen PrP 23-231 und den drei PrP-Interaktoren.

Durch diesen experimentellen Ansatz ist es also möglich, die *in vitro* gebildeten Proteinkomplexe sowohl über den PrP-Anteil (mittels des c-Myc-Epitops) als auch über den cDNA-Isolat-Anteil (mittels des HA-Epitops) zu präzipitieren. In den folgenden Experimenten wurde daher die Methode gewählt, bei der die Interaktoren mit HA-Antikörpern präzipitiert werden und versucht wird, c-Myc-PrP im Präzipitat nachzuweisen.

Durch die Verwendung von Retikulozytenlysate als Expressionssystem konnte gezeigt werden, dass PrP 23-231 nicht nur in *S. cerevisiae* mit den drei Proteinen Synapsin I, Grb2 und Pint1 interagiert. Die Co-Präzipitation der *in vitro* translatierten Proteine deutet darauf hin, dass außerhalb eines hefebasierten Systems ebenfalls eine Komplexbildung stattfindet. Folglich erfolgt die Interaktion von PrP 23-231 mit den neu isolierten Proteinen definitiv nicht über die Gal4-Domänen oder andere hefespezifische Faktoren, sondern ist auf eine spezifische Wechselwirkung zurückzuführen.

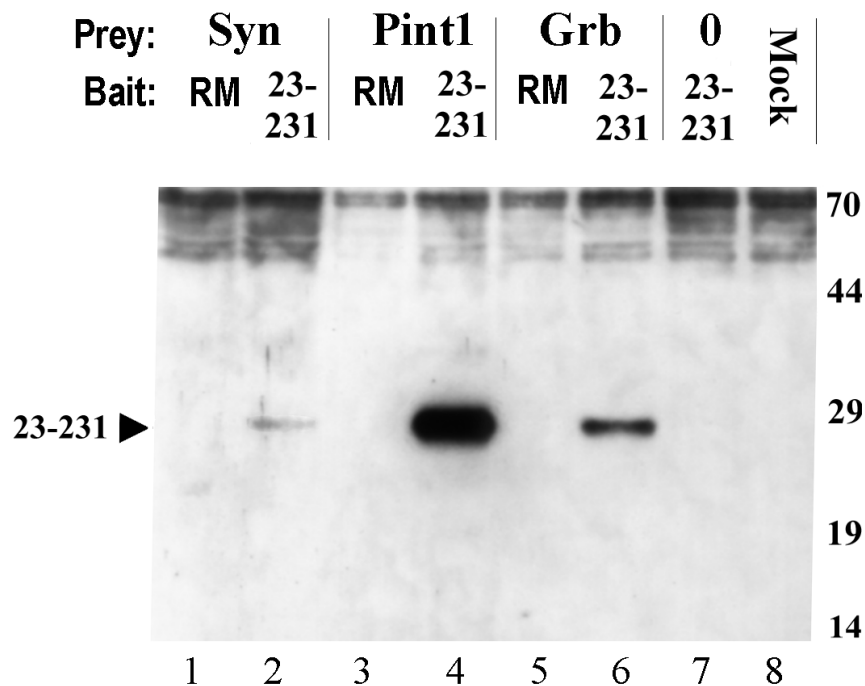
### **3.5.3 Expression der PrP-Interaktoren in Vaccinia-vT7-infizierten Säugetierzellen**

Einen Schritt weiter als die zellfreie Expression der Proteine mittels Retikulozytenlysate geht der folgende experimentelle Ansatz. Dabei werden BHK-Zellen mit Plasmiden transfiziert, die eine zelluläre Expression der zu untersuchenden Proteine unter der Kontrolle eines T7-Promotors in intakten Säugetierzellen ermöglichen. Um eine hohe Expressionsrate zu erreichen, wurden die Zellen anschließend mit dem Vaccinia-Virusstamm vT7-3 infiziert. Das Genom dieses Virusstammes enthält zusätzlich zu den viralen Genen die T7-RNA-Polymerase. Eine effektive Infektion führt zu einem „Abschalten“ der Translation der meisten Proteine der Wirtszelle. Vaccinia-Proteine, sowie Proteine deren Expression unter der Kontrolle des T7-Promotors stehen, sind davon nicht betroffen und werden in hohem Maße cytosolisch exprimiert. Dies machte die Verwendung einer radioaktiven Markierung für die folgenden Experimente unnötig. Nach 24-48 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Lysate einer Co-Präzipitation unterzogen. Da die Proteine wie in der Retikulozyten-basierten Translation ein N-terminales c-Myc bzw. HA-

Epitop besitzen (siehe Abbildung 14), kann in diesem System ebenfalls über Antikörper gegen diese Epitope präzipitiert und detektiert werden.

### 3.5.3.1 PrP 23-231 co-präzipitiert in BHK-Zellen mit Synapsin I, Pint1 und Grb2

Das Plasmid pGBKT7 PrP 23-231 wurde mit den Plasmiden pGADT7 Syn, pGADT7 Pint und pGADT7 Grb jeweils mittels einer Calcium-Phosphat-basierten Methode in BHK-Zellen transfiziert, die zuvor mit dem Vaccinia-Virusstamm vT7-3 infiziert worden waren. Als Negativkontrolle diente c-Myc-Rabies-Virus M-Protein im Plasmid pGBKT7 (zur Verfügung gestellt von M. Wolff), das ebenfalls mit den drei PrP-Interaktoren coexprimiert wurde. Nach 24 Std. wurden die Zellen lysiert und die Lysate mit dem polyklonalen HA-Antikörper Y-11 (1:200) über Nacht bei 4° C inkubiert und anschließend die gebundenen Proteinkomplexe mittels Protein A-Sepharose präzipitiert. Die Analyse erfolgte auf 12.5 % Acrylamidgelen und anschließendem Western-Blot mit dem monoklonalen c-Myc-Antikörper 9E10 (1:2.500), um präzipitiertes c-Myc-PrP 23-231 nachzuweisen.

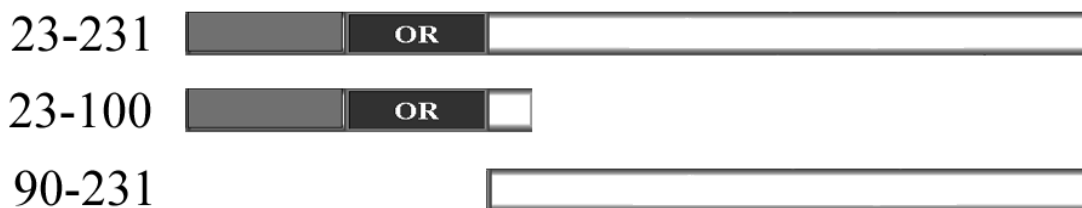


**Abbildung 17:** Co-Immünpräzipitation der Interaktoren aus Vaccinia-infizierten BHK-Zellen; c-Myc-PrP 23-231 bzw. c-Myc-Rabies M (RM) wurde mit den HA-getaggten Interaktoren Synapsin (Syn), Pint1 (Pint1) und Grb2 (Grb) coexprimiert. Nach 24 Std. erfolgte eine Lyse und Immunpräzipitation mit einem anti-HA-Antikörper. Die Präzipitate wurden mittels Western-Blot mit einem c-Myc Antikörper analysiert. c-Myc PrP 23-231 resultiert in einer Bande der Masse von 29 kDa (mit einem Pfeil gekennzeichnet).

In allen Proben von Zellen, die PrP 23-231 gemeinsam mit den PrP-Interaktoren exprimierten, war eine Bande sichtbar, deren Größe der Masse von c-Myc PrP 23-231 entspricht (Spuren 2, 4 und 6) und erwartungsgemäß identisch zu der aus Retikulozytenlysat präzipitierten ist (siehe Abbildung 16). Keine Signale sind in Zellen nachweisbar, die die PrP-Interaktoren mit c-Myc Rabies M coexprimieren (Spuren 1, 3 und 5) oder nur c-Myc PrP 23-231 ohne Interaktoren (Spur 7). Die nicht transfizierte Leerkontrolle (Spur 8) weist ebenfalls kein PrP-Signal auf.

Demnach sind die erhaltenen Signale das Resultat einer spezifischen Interaktion von PrP 23-231 mit den PrP-Interaktoren in den BHK-Zellen und nicht auf die Bindung von PrP bzw. der Interaktoren an Protein A-Sepharose zurückzuführen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass nicht nur in Zell-Lysaten, sondern auch in intakten Säugetierzellen ein präzipitierbarer Komplex zwischen PrP 23-231 und den drei PrP-Interaktoren Synapsin I, Pint1 und Grb2 gebildet wird.

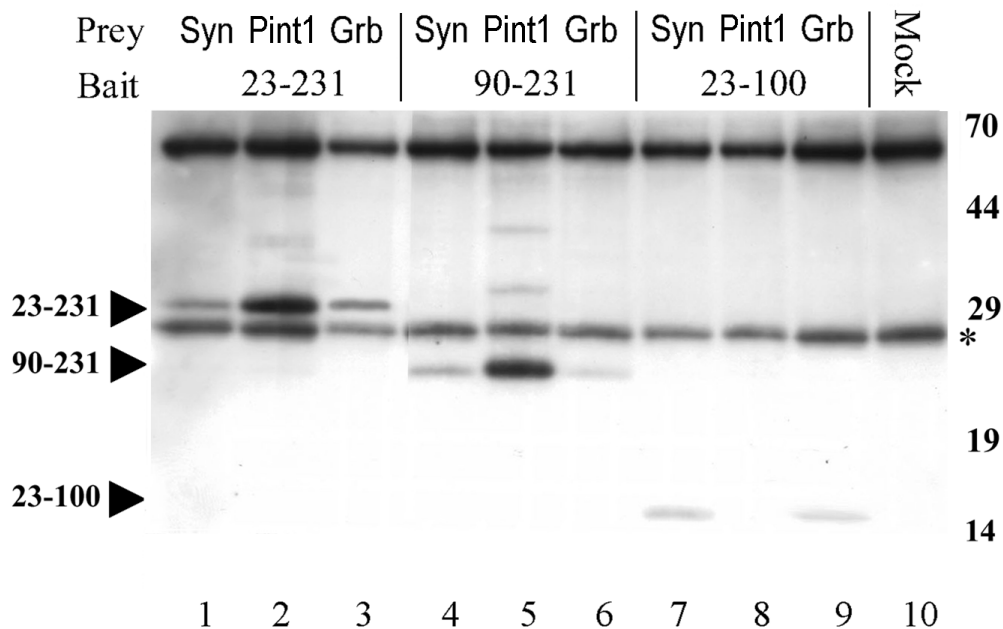


**Abbildung 18:** schematische Darstellung der im folgenden verwendeten PrP-Konstrukte; PrP 23-231 wurde für die groß angelegte Suche nach Interaktoren verwendet; die N- bzw. C-terminal verkürzten PrP-Formen PrP 23-100 und PrP 90-231 dienten in den Folgeversuchen zur Eingrenzung der Bindedomänen.

### 3.5.3.2 Co-Präzipitation von N- und C-terminal trunziertem PrP mit den identifizierten PrP-Interaktoren

Um die Domäne innerhalb des Prion-Proteins eingrenzen zu können, welche mit den drei Interaktoren wechselwirkt, wurden weitere Präzipitationsversuche unternommen. Da PrP<sup>C</sup> eine N-terminale Hälfte ohne bekannte Sekundärstruktur und eine C-terminale Hälfte mit definierter Sekundärstruktur besitzt, wurden diese getrennt voneinander kloniert und exprimiert (Abbildung 18). Dazu wurde der codierende Bereich von Aminosäure 23-100, sowie 90-231 des murinen Prion-Proteins aus pAS jeweils in das Plasmid pGBKT7 kloniert, was in den Plasmiden pGBKT7 23-100 und pGBKT7 90-231 resultierte. Diese wurden jeweils mit den drei pGADT7-Interaktor-Plasmiden in  $\nu$ T7-infizierten BHK-Zellen co-transfiziert. Die Präzipitation erfolgte mit dem monoklonalen HA-Antikörper F-7 (1:200) und die Detektion der PrP-Fragmente mittels des monoklonalen c-Myc-Antikörpers 9E10 (1:2500).

Als Positivkontrolle wurde eine Präzipitation der PrP-Interaktoren mit PrP 23-231 der vollen Länge durchgeführt, für die bereits in den vorherigen Versuchen eine effiziente Co-Präzipitation mit den Interaktoren gezeigt werden konnte. Erwartungsgemäß war PrP 23-231 mit allen drei Interaktoren präzipitierbar (Spuren 1-3). Eine Interaktion des C-terminalen PrP-Fragments 90-231 war ebenfalls mit allen drei Proteinen feststellbar (Spuren 4-6). Das N-terminale PrP-Konstrukt von AS 23-100 präzipitierte mit Synapsin I und Grb2 (Spur 7 und 9), nicht aber mit Pint1 (Spur 8). Kein Präzipitat ist in der untransfizierten Negativkontrolle (Spur 10) beobachtbar. Im Gegensatz zum vorangegangenen Experiment wurde sowohl bei der Präzipitation, als auch bei der Detektion ein monoklonaler Maus-Antikörper verwendet, was im Western-Blot bei der Detektion durch einen anti-Maus-Sekundärantikörper in allen Proben zu einer Bande bei ca. 28 kDa führt, die der leichten Kette des Präzipitierungs-Antikörpers entspricht.



**Abbildung 19:** Western-Blot einer Immunpräzipitation aus BHK-Zellen, die c-Myc-markierte PrP-Fragmente mit den HA-markierten PrP-Interaktoren coexprimierten. Die Präzipitation erfolgte mit einem monoklonalen HA-Antikörper. Co-präzipitierte PrP-Fragmente wurden mittels eines c-Myc Antikörper detektiert. Spur 1-3: Coexpression der Interaktoren Synapsin (Syn), Pint1 (Pint1) und Grb2 (Grb) mit PrP 23-231; Spur 4-6: Coexpression der Interaktoren mit dem C-terminalen PrP-Konstrukt 90-231; Spur 7-9: Coexpression mit dem N-terminalen PrP-Konstrukt. Spur 10: untransfizierte Leerkontrolle. Die den drei PrP-Fragmenten entsprechenden Banden sind seitlich durch Pfeile markiert. Eine Bande von ca. 28 kDa (\*) ist in allen Spuren sichtbar und repräsentiert die leichte Kette des für die Präzipitation verwendeten Antikörpers. Bei ca. 70 kDa ist die schwere Kette sichtbar.

Diese Ergebnisse deutet darauf hin, dass sowohl in dem (strukturell flexiblen) N-Terminus von PrP bis AS 100, als auch im (strukturierten) C-terminalen Bereich von PrP Bindungsstellen für Grb2 und Synapsin I existieren. Eine Interaktion mit Pint1 erfolgt offenbar über eine Domäne, die im C-Terminus von PrP lokalisiert ist.



### 3.6 Weitere Charakterisierung der drei neu identifizierten PrP-Interaktoren

Die in Hefe entdeckten Interaktionen von PrP 23-231 mit Pint1, Synapsin Ib und Grb2 konnten durch die vorangegangenen Experimente sowohl in Retikulozyten-Lysaten als auch in Säugetierzellen bestätigt werden. Im folgenden soll individuell auf die einzelnen Interaktoren eingegangen werden.

### 3.7 Der Prion-Interaktor 1 (Pint1)

Die subjektiv stärkste Interaktion mit PrP zeigte ein Protein, das zuvor noch nicht näher beschrieben und charakterisiert worden ist. Da es sich um eine neue Sequenz handelte, die nicht in der Genbank enthalten war, wurde sie dort publiziert und erhielt die Genbank-Zugriffsnummer AY029599. Zugleich wurde dem Protein von uns der Name Pint1 gegeben, was für Prion-Interaktor 1 steht. Vom Jackson Laboratory, dem Sitz des Maus-Genom-Projekts, wurde nach Veröffentlichung vorgeschlagen, das Protein Prnpip1 (prion protein interacting protein 1) zu benennen. Beide Namen können synonym verwendet werden, so dass im Folgenden nur die Bezeichnung Pint1 verwendet wird.

#### 3.7.1 Sequenz und mögliche Eigenschaften des identifizierten Pint1-Fragments

Das identifizierte Proteinfragment von Pint1 weist bei Expression über den T7-Promotor eine Länge von 161 Aminosäuren auf (Abbildung 20). Dabei entfallen die ersten 35 Aminosäuren auf vektorcodierte Anteile wie das HA-Epitop (YPYDVPDYA) gefolgt von Aminosäuren, die durch die Multiple Cloning Site codiert werden.

```
1    MEYPYDVPDY AHMAMEASEF HPGGHRYGIR IRGRVDHPQL TPFCTELTGI 50
51    IQAMVDGQPS LQQVLERVDE WMAKEGLLDP NVKSIFVTCG DWDLKVMLPG 100
101   QCQYLGLPVA DYFKQWINLK KVPLSSSQGL WFSCPSPPPP TLVSFCFFSQ 150
151   YSPFSSLGNL Y
```

**Abbildung 20:** die Aminosäuresequenz von Pint1 nach einer T7-gesteuerten Expression. Das Protein besitzt ein N-terminales HA-Epitop, welches vektorcodiert ist (fett dargestellt). Der gesamte vektorcodierte Anteil ist kursiv dargestellt.

Die Suche nach konservierten Motiven in der Prosite-Datenbank ([www.expasy.ch](http://www.expasy.ch)) ergab, dass eine mögliche Phosphorylierungsstelle für Casein-Kinase II bei AS 88 vorhanden ist (Motiv: TCGD). Des weiteren werden drei potentielle N-Myristylierungsstellen angezeigt, die aber wegen der Häufigkeit des zugrundeliegenden Konsensus-Motivs nicht signifikant sein müssen. Transmembrane Bereiche wurden mittels des Programms TMpred vorhergesagt (Hofmann und

Stoffel, 1993). Der C-Terminus von AS 145 bis 161 ist ein sehr hydrophober Bereich, der mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Transmembrandomäne darstellt. Da der N-Terminus des Proteins nicht bekannt ist, kann keine Vorhersage über die Orientierung des restlichen Proteins (d.h. luminal oder cytosolisch) getroffen werden.

### 3.7.2 Pint1 besitzt eine teilweise Homologie zu publizierten Proteinsequenzen

Die Homologie von Pint1 zu veröffentlichten Proteinsequenzen in der Genbank wurde mittels des BLAST-Algorithmus (Altschul et al., 1997) untersucht. Dabei zeigte sich, dass eine etwa 60 AS lange Region von Pint1 eine hohe Homologie zu einigen anderen Proteinsequenzen aus verschiedenen Organismen aufweist (Abbildung 21). Dieser hoch homologe Bereich schließt sich unmittelbar an den Vektoranteil an. Alle homologen Sequenzen codieren für hypothetische Proteine bzw. ESTs (Expressed Sequence Tags). Keine dieser Aminosäuresequenzen entspricht einem kompletten Protein bzw. ORF, sondern alle sind bruchstückhaft. Daher fehlt überall das Start-Codons bzw. N-Terminus. Dies resultiert wahrscheinlich aus der zufälligen und ungezielten Sequenzierung der DNA-Fragmente, die im Verlauf eines Genom-Sequenzierprojektes (von Mensch, Maus und *C.elegans*) anfallen. Auch die cDNA-Synthese mittels Oligo-dT-Primern begünstigt vermehrt die Erzeugung von Sequenzen, die den 3'-Regionen einer mRNA entsprechen.

Die stärkste Homologie von Pint1 besteht zu zwei Proteinen, die in menschlichem Hirn bzw. Herz exprimiert werden. Auffällig ist die hohe Konservierung der Kernregion von Pint1 zwischen verschiedenen Spezies, die auch noch zu Proteinen aus evolutiv weit entfernten Organismen wie *C.elegans* eine signifikante Homologie zeigt. Möglicherweise gehören Proteine, die diese konservierte Domäne besitzen, zu einer gemeinsamen Familie.

Die Sequenz FxQWINLKK im äußersten C-terminalen Bereich der konservierten Region kommt in der Genbank häufiger vor (Daten nicht gezeigt). Die sich anschließenden 40 Aminosäuren des C-Terminus von Pint1 sind zu keinen bekannten Sequenzen homolog. Dies ist nicht das Resultat einer Leserahmenverschiebung, da in diesem Bereich auch auf DNA-Ebene keine Homologie vorliegt.

Pint1	//VDHPQLTPFC TELTGIIQAM VDGQPSLQQV 30	Maus
AAC19158	//.V.....	Mensch (Hirn)
AAH01072	. ....	Mensch (Herz)
AAC04618	//.V.....	Mensch
CAB55430		Mensch
T15066	//.R..S.. .S.....E. ..EK.T.P..	<i>C.elegans</i>
T2990	//.R..S.. .S...R...E. ..EK.K.PE.	<i>C.elegans</i>
T28707	//.R..S.. .S.....E. ..EK.T.P..	<i>C.elegans</i>

Pint1	LERVDEWMAK EGLLDPNVKS IFVTCGDWDL	<b>60</b>
AAC19158	.....	
AAH01072	.....	
AAC04618	.....	
CAB55430		
T15066	.SEF.S.LKE DSR.EKG-.F A.....	
T2990	.SEF.S.LKE DSR.KQGN-F A.....	
T28707	.SEF.S.LKE DSR.EKG-.F A.....	
Pint1	KVMLPGQCQY LGLPVADYFK QWINLKK//	<b>120</b>
AAC19158	.....//	
AAH01072	.....//	
AAC04618	..	
CAB55430	.....//	
T15066	..A..NEAKF KNIGIPE..N ....V..//	
T2990	..A..SEAKF KNIEIPE..N ....V..//	
T28707	..A..NEAKF KNIGIPE	

**Abbildung 21:** Sequenzvergleich von Pint1 mit Proteinen hoher Homologie. Die Proteine sind durch ihre Genbank-Nummern benannt. Die Ursprungsspezies ist rechts neben der Sequenz angegeben. Punkte (.) markieren identische Aminosäuren; Doppelstriche (//) bedeuten, dass die entsprechende Sequenz dort nicht endet, sondern nur der zu Pint1 homologe Bereich.

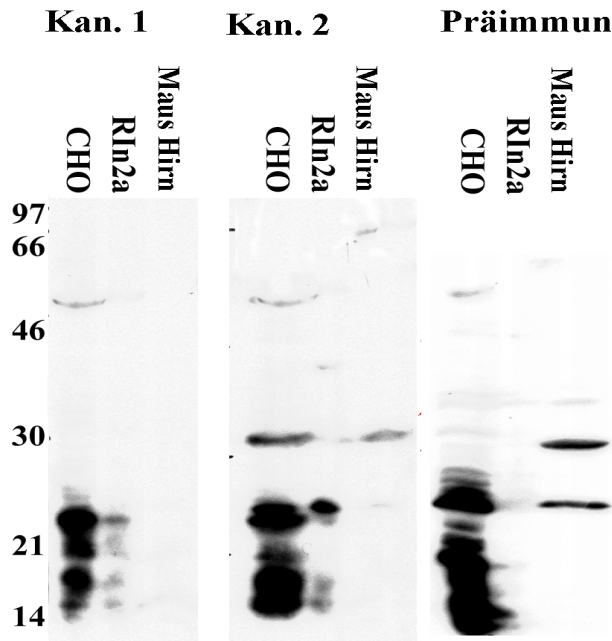
### 3.7.3 Erzeugung und Analyse polyklonaler Antikörper gegen ein Pint1-Peptid

Zur Erzeugung von polyklonalen Antikörpern gegen Pint1 wurden zwei Kaninchen mit einem KLH-gekoppelten synthetischen Peptid aus der Pint1-Sequenz (QVLERVDEMAKEG) immunisiert. Die erhaltenen Antiseren wurden dazu verwendet, einen Western-Blot mit diversen Zell-Lysaten zu untersuchen. Aus diesem Versuch sollte sowohl die molekulare Masse des Proteins ersichtlich sein als auch dessen Expression in Zelltypen/Organen. Da sowohl Pint1, als auch das Protein mit der stärksten Homologie aus Hirn stammte, wurde Homogenat aus Mäusehirn ebenfalls untersucht.

Um die Spezifität der erhaltenen Signale beurteilen zu können, wurden Parallelansätze zum einen mit Präimmunserum und den Kaninchenseren der finalen Blutung hybridisiert und analysiert (Verdünnung je 1:2.000). Dabei ergaben sich zwar deutlich sichtbare Proteinbanden, jedoch war kein Unterschied zwischen den Präimmun- und finalen Antiseren feststellbar (Abbildung 22).

Offenbar sind die erhaltenen Antiseren nicht in der Lage, in den untersuchten Proben ein spezifisches Protein auf einem denaturierenden Gel zu detektieren.

Beide erhaltenen polyklonalen Antiseren gegen ein Pint1-Peptid eignen sich nicht für eine Analyse von denaturierten Proteinen mittels SDS-PAGE. Somit kann damit keine Aussage über die Gewebeverteilung und molekulare Masse von Pint1 getroffen werden.



**Abbildung 22:** Vergleich zwischen der Immunreaktivität von Seren der Pint1-Peptid-immunisierten Kaninchen 1 und 2 mit dem Präimmunsrum; exemplarisch wurden hier Lysate von RIn2a und CHO-Zellen, sowie Maus-Hirnhomogenat mittels Western-Blot untersucht.

### 3.7.4 Identifizierung von Geweben mit Pint1-mRNA-Expression

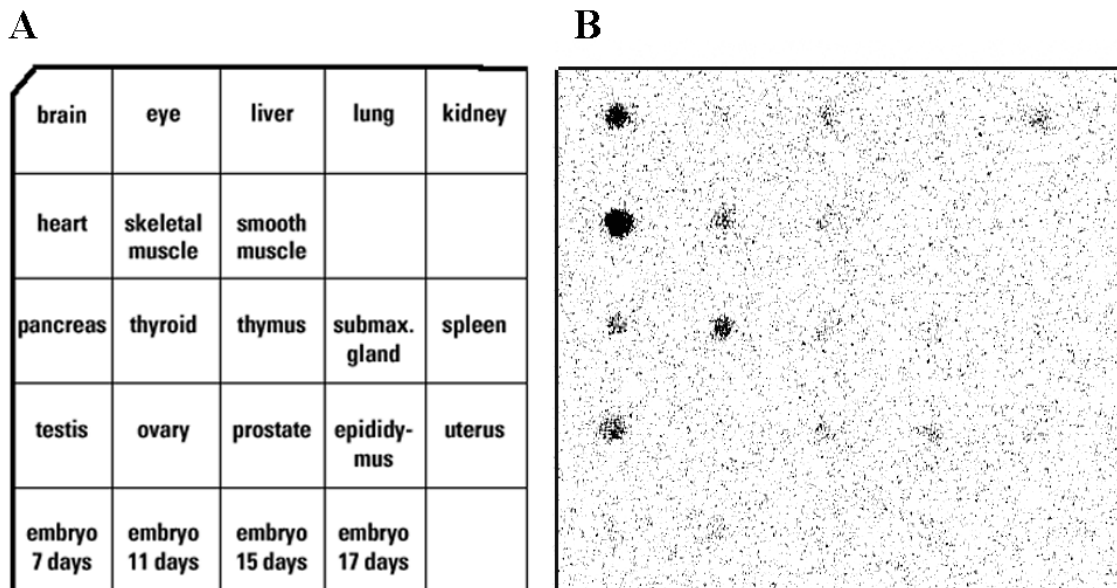
Da die Erzeugung von Antiseren nicht zu aussagekräftigen Ergebnissen führte, wurde die Proteinexpression nicht nur auf Translations- sondern auch auf Transkriptionsebene untersucht. Meist korreliert die Menge an mRNA-Molekülen mit der Menge an gebildetem Protein, wodurch die Gewebe mit signifikanter Pint1-mRNA auch die sein sollte, in denen Pint1 in der höchsten Konzentration vorliegt.

Um dies zu untersuchen, wurde ein kommerzieller mRNA-Dot-Blot (Clontech) verwendet, auf dem mRNA aus vielen verschiedenen Maus-Geweben punktförmig aufgetragen war.

Diese Membran wurde mit einer radioaktiven Pint1-DNA-Sonde hybridisiert, welche folgendermaßen hergestellt wurde:

Das cDNA-Fragment mit der Sequenz von Pint1 wurde mittels der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Xho*I aus dem ursprünglichen Vektor pACT2 herausgeschnitten und mittels des Megaprime-DNA-Labeling-Kits (Amersham Pharmacia) mit <sup>32</sup>P-Phosphat radioaktiv markiert. Nach der Hybridisierung der Membran mit dieser Sonde und dem Waschen wurden die resultierenden

Signale mit einem Phosphoimager nach 48 Std. Exposition elektronisch ausgewertet (Abbildung 23).



**Abbildung 23:** ein RNA-Dot-Blot mit Proben aus verschiedenen Maus-Geweben wurde mit einer Pint1-Sonde hybridisiert und autoradiographisch ausgewertet; links ist das Auftragsschema dargestellt; rechts ist das erhaltene Expressionsmuster sichtbar.

Die stärkste Expression von Pint1 ist in Hirn, Herz und Schilddrüse zu beobachten. Leber, Nieren, Bauchspeicheldrüse, Muskeln und Hoden ergeben ein schwächeres Signal. Nahezu keine Pint1-RNA ist in den murinen Embryonalstadien, sowie Eierstöcken, Gebärmutter, Auge und Lunge detektierbar.

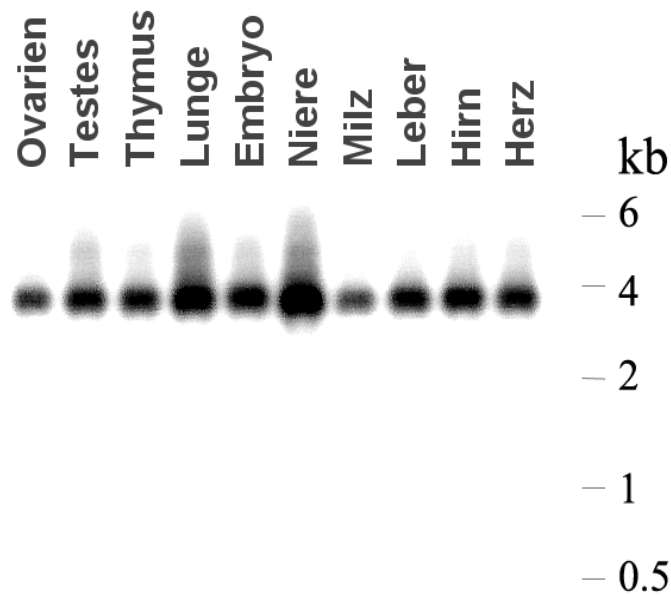
Die Hybridisierung der Pint1-Sonde mit einem mRNA-Dot-Blot mit murinen Geweben zeigt deutlich, dass Pint1-mRNA nicht nur im Hirn gebildet wird, sondern auch in anderen Geweben exprimiert wird.

### 3.7.5 Untersuchung der mRNA-Transkriptlänge von Pint1

Der anfangs verwendete Dot-Blot ermöglichte es, eine Vielzahl von Geweben gleichzeitig auf das Vorkommen von Pint1 zu untersuchen. Dabei kann aber keine Aussage über die Länge der mRNA-Moleküle gemacht werden, sondern lediglich eine quantitative Beurteilung. So kann damit z.B. nicht zwischen eventuell auftretenden alternativen Spliceformen unterschieden werden.

Um die Länge der mRNA des Pint1-Proteins zu erfahren, wurde ein klassischer mRNA-Northern-Blot verwendet (Ambion). Dieser enthielt elektrophoretisch aufgetrennte hochreine mRNA aus diversen Mausgeweben, die auf eine Nylonmembran geblottet wurde. In Analogie zu der anfangs verwendeten Dot-Blot-Analyse wurde eine radioaktive Pint1-Sonde erzeugt und mit

der Membran hybridisiert. Die erhaltenen Signale wurden mit Hilfe eines Phosphorimager-Schirms detektiert (Abbildung 24).



**Abbildung 24:** ein Northern-Blot mit mRNA aus verschiedenen Mäusegeweben wurde mit einer radioaktiven Pint1-Sonde hybridisiert und autoradiografisch ausgewertet. Die Gewebe, aus denen die RNA gewonnen wurde, sind über den Spuren dargestellt; rechts ist die Lage des Größenmarkes angezeichnet.

Die Auswertung der Signale zeigt deutlich, dass die Pint1-mRNA eine homogene Länge von ca. 3.8 kb besitzt. Offenbar liegen in den verschiedenen Geweben keine alternativen Spliceformen vor, die zu unterschiedlich langen Transkripten führen.

### 3.7.6 Suche nach dem N-Terminus von Pint1 mittels RACE

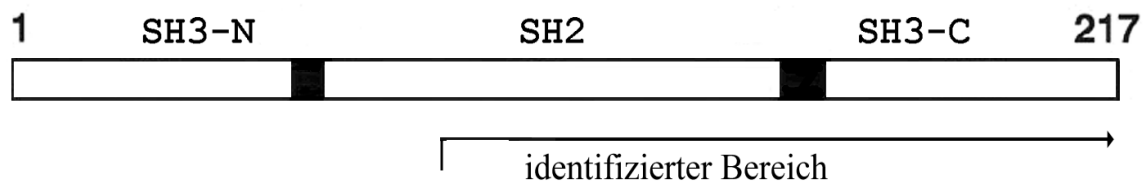
Die DNA-Sequenz von Pint1 enthält kein „natives“ Startcodon, sondern das Protein wird in den verwendeten Systemen mittels eines im Vektor vorhandenen Start-ATG translatiert. Um die 5'-Region der mRNA und damit den tatsächlichen Beginn des Leserahmens des Proteins aufzuklären, wurde ein RACE-Ansatz gewählt („Rapid Amplification of cDNA Ends“). Das zum Einsatz gekommene Generacer-Kit (Invitrogen) ermöglicht es, spezifisch 5'-Enden von mRNA zu amplifizieren, wobei deren genaue Sequenz nicht bekannt sein muß. Zur Verwendung kam mRNA aus Hirn und Herz (jeweils von Ambion), da diese beiden Gewebe das stärkste Pint1-Expressionssignal auf dem RNA-Dot-Blot aufwiesen. Die mRNA wurde nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Diese enthält eine bekannte 5'-DNA-Sequenz, die als Priming-Site genutzt werden kann. Die 3'-Primer wurden aus verschiedenen Abschnitten der bekannten Pint1-Sequenz gewählt. Nach Durchführung der Prozedur und einer PCR mit dem 5'-Generacer-Primer und einem reversen Pint1-spezifischen Primer, welcher komplementär zu den ersten 27 Basen der isolierten Pint1-Sequenz war, wurden DNA-Fragmente erhalten. Diese hatten

unterschiedliche Längen, deren Nukleotidsequenz waren aber komplett in der Sequenz des Genbank-Eintrags AAC19158 enthalten. Eine „Verlängerung“ des 5`-Bereiches über die bekannte Region hinaus bis zu einem möglichen Start-Codon wurde nicht erreicht.

### 3.8 Das Adaptor-Protein Grb2

#### 3.8.1 Lokalisation der identifizierten Region innerhalb von Grb2

Das Adaptor-Protein Grb2 besteht aus 3 SH-Domänen, die mit flexiblen Linkerregionen miteinander verbunden sind. Es besitzt eine Länge von 217 Aminosäuren. N- und C-terminal sind zwei SH3-Domänen (Src-Homology 3) vorhanden, die eine zentrale SH2-Domäne flankieren (Abbildung 25).



**Abbildung 25:** schematische Struktur von Grb2; das Protein ist in zwei N- bzw C-terminale SH3-Domänen (N-SH3 und C-SH3), sowie eine zentrale SH2-Domäne unterteilt, die durch flexible Linkerregionen verbunden sind. Der in dem Hirn-cDNA-Isolat identifizierte PrP-interagierende Bereich ist markiert.

Der mittels des Yeast-Two-Hybrid-Assays identifizierte Bereich codiert nicht für das vollständige Protein, sondern beginnt bei AS 85 und endet am STOP-Codon nach AS 217 (Abbildung 26). Strukturell entspricht dies der kompletten C-terminalen SH3-Domäne und Teilen der SH2-Domäne.

```

1    meaiakydfk ataddelsfk rgdilkvlne ecdqnwykae lngkdgfipk 50
51   nyiemkphpw ffgkipraka eemlskqrhd gaflireses apgdflsvk 100
101  fgndvqhfkv lrdgagkyfl wvvkfnslne lvdyhrstsv srnqqiflrd 150
151  ieqmpqqpty vqalfdfdpq edgelgfrrg dfihvmdnsd pnwwkgachg 200
201  qtgmfprnyv tpvnrnv

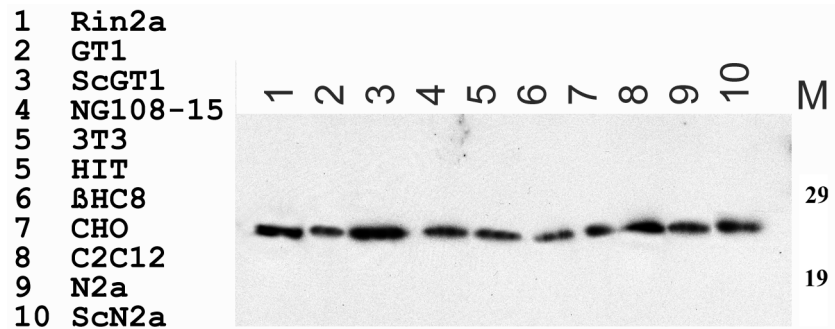
```

Abbildung 26: die komplette Aminosäuresequenz des murinen Adaptorproteins Grb2. Der aus *S.cerevisiae* isolierte Anteil, welcher mit PrP 23-231 interagiert codiert für den Bereich von AS 85-217 (fett dargestellt).

#### 3.8.2 Untersuchung der endogenen Expression von Grb2 in diversen Zell-Linien

Um herauszufinden, in welchen Zell-Linien Grb2 exprimiert wird, wurden Zell-Lysate aus verschiedenen kultivierten Zell-Linien (zur Verfügung gestellt von S. Gilch) mittels Western-Blot mit einem polyklonalen Grb2-Antikörper (1:2500; Stressgen) untersucht. Dabei zeigte sich, dass

Grb2 in allen untersuchten Zellen vorhanden war und die erwartete Größe von 24 kDa aufwies (Abbildung 27). Keine der Zelltypen weist eine signifikant erhöhte oder erniedrigte Grb2-Expression auf. Zellen ohne Grb2 wurden nicht detektiert und sind in der Literatur auch nicht beschrieben worden. Der Vergleich zwischen nicht infizierten GT1 und N2a-Zellen (Spur 2 und 9) mit deren Prion-infizierten Zellklonen (Spur 3 und 10) zeigt, dass keine Beeinflussung der Grb2-Expression durch den Infektionsstatus der Zellen vorliegt.



**Abbildung 27:** Analyse verschiedener Zell-Lysate auf die Expression von Grb2. Diverse Zell-Lysate wurden mittels SDS-PAGE getrennt und ein Western-Blot mit dem Grb2-spezifischen Antikörper 3F2 analysiert. Die Herkunft der Zell-Lysate ist rechts neben den Spuren dargestellt. Grb2 resultiert in einer Bande mit einem Molekulargewicht von 24 kDa.

Diese Untersuchungen zeigen, dass Grb2 ein ubiquitär exprimiertes Protein ist, das in allen Zelltypen, auch unterschiedlicher Spezies, nachweisbar ist.

### 3.8.3 Die PrP-Mutationen P102L und P105L beeinflussen die Interaktion mit Grb2 nicht

Viele Mutationen im Prion-Protein sind die Ursache einer erblichen Form von Prion-Krankheiten. Die meisten dieser Mutationen resultieren in Aminosäuresubstitutionen. Einige davon sind möglicherweise auf den Verlust einer nötigen Interaktion von PrP mit zellulären Faktoren zurückzuführen. SH3-Domänen, von denen zwei im vollständigen Grb2-Protein und eine im isolierten cDNA-Fragment vorkommen, interagieren mit prolinreichen Proteinen, die das Konsensus-Motiv xPxxP besitzen. In der PrP-Sequenz ist dieses Motiv ab Position 102 zu finden. Genau diese beiden Proline sind in den erblichen PrP-Mutationen P102L und P105L betroffen, die im Menschen das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom auslösen. Diese beiden Mutationen wurden von uns daraufhin untersucht, ob sie *in vitro* zu einer Veränderung der Bindung zwischen PrP und Grb2 führen.

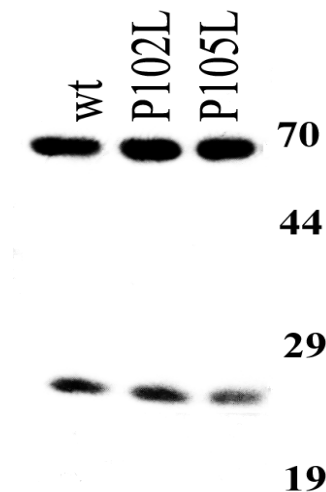
Anstelle von PrP 23-231 der vollen Länge wurde für dieses Experiment die C-terminale Hälfte von PrP gewählt, da die vorangegangenen Experimente gezeigt hatten, dass auch eine Grb2-Bindungsstelle im N-terminalen Bereich von PrP zwischen AS 23 und 100 existiert. Da nur eine



Bindungsstelle gleichzeitig untersucht werden sollte, wurde das N-terminal verkürzte PrP-Konstrukt von AS 90-231 verwendet.

Als Vorlage diente das Plasmid pGBKT7 90-231 mit der Wildtyp-Sequenz. In diese wurden mittels des Quick-Change-Mutagenesis-Kits (Stratagene) und geeigneter Mutagenese-Primer die Mutationen in getrennten Ansätzen eingeführt. Das Resultat waren Plasmide, welche für PrP 90-231/P102L bzw. PrP 90-231/P105L codierten.

Die mutierten Plasmide wurden zusammen mit pGADT7-Grb2 in einer Vaccinia-vT7-induzierten Expression/Co-Präzipitation in BHK-Zellen verwendet. Als Kontrolle diente PrP 90-231 ohne die Mutationen. Das Grb2-Fragment wurde mittels des polyklonalen HA-Antikörpers Y-11 (1:200) präzipitiert und das Präzipitat mit dem monoklonalen c-Myc-Antikörper 9E10 auf die Anwesenheit von PrP 90-231 untersucht (Abbildung 28).



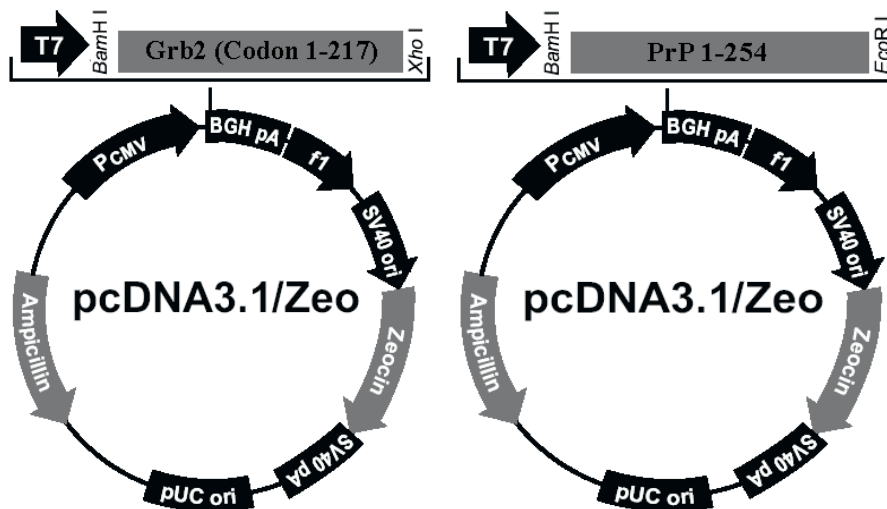
**Abbildung 28:** Co-Präzipitation von Grb2 mit PrP 90-231 bzw. dessen mutierte Formen; Vaccinia-infizierte BHK-Zellen, die c-Myc PrP 90-231 Wildtyp (wt) bzw. P102L oder P105L mit einem HA-markierten Grb2-Fragment coexprimierten, wurden lysiert und mittels dem HA-Antikörper Y-11 präzipitiert. Die Detektion von PrP 90-231 erfolgte mit dem Antikörper 9E10.

Erwartungsgemäß co-präzipitierte Wildtyp-PrP 90-231 mit dem Grb2-Fragment (Spur 1). Aber auch die mutierten PrP-Fragmente mit der P102L-Substitution (Spur 2), sowie der P105L-Mutation (Spur 3) sind im Präzipitat nachweisbar.

Diese Daten deuten darauf hin, dass eine Interaktion zwischen Grb2 und PrP unter den gewählten Bedingungen nicht durch die untersuchten PrP-Punktmutationen P102L und P105L beeinträchtigt wird. Wahrscheinlich wird ein Epitop außerhalb des xPxxP-Motivs im C-Terminus des Prion-Proteins als Interaktionsdomäne von Grb2 erkannt.

### 3.8.4 Klonierung und Expression des vollständigen Leserahmens von Grb2 und PrP

Der mittels der Yeast-Two-Hybrid Methode isolierte cDNA-Klon von Grb2 codiert für die C-terminalen 60 % des Proteins. Um mittels alternativer Assays die Möglichkeit zu haben, das vollständige Grb2-Protein zu exprimieren, wurde zunächst versucht, den kompletten ORF mittels PCR aus genomischer DNA zu amplifizieren. Eine Sequenzierung des erhaltenen DNA-Fragmentes wies jedoch eine Vielzahl von Mutationen im Vergleich zu der publizierten Sequenz von murinem Grb2 auf. Aus diesem Grund wurde die cDNA von Grb2 mittels reverser Transkription aus mRNA gewonnen. Parallel wurden dazu als Vorlage selbst isolierte Total-RNA aus N2a-Zellen sowie mRNA aus murinem Herz (Ambion) verwendet. Die anschließende PCR mit den spezifischen Primern Grb2fwd und Grb2rev ergab bei beiden cDNA-Vorlagen ein Fragment von ca. 650 Basenpaaren Länge, was der Größe des ORF von murinem Grb2 entsprach. Dieses Fragment wurde mittels der primercodierten Schnittstellen für *Bam*HI und *Xho*I in das Plasmid pcDNA 3.1/Zeo kloniert und die Integrität durch Sequenzierung bestätigt. Die erhaltenen Grb2-Sequenzen aus Zellkultur und Herz unterschieden sich nicht und codierten beide für murines Grb2 von AS 1-217.



**Abbildung 29:** Schema des Vektors pcDNA3.1/Zeo, jeweils mit den Inserts für Grb2 und PrP der vollen Länge. Der komplette ORF von Grb2 wurde mittels RT-PCR aus Mäuse-RNA amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen für *Bam*HI und *Xho*I in das Plasmid pcDNA3.1/Zeo inseriert. Der ORF von PrP wurde aus genomischer DNA amplifiziert und mittels *Bam*HI und *Eco*RI ebenfalls gerichtet in pcDNA3.1/Zeo kloniert. Ein CMV-Promotor ( $P_{CMV}$ ) ermöglicht die Expression der Proteine in Säugetierzellen; durch den vor der MCS gelegenen T7-Promotor kann das Plasmid auch für eine Vaccinia-vT7-gestützte Expression verwendet werden.

Für die Gewinnung des kompletten Leserahmens von murinem PrP wurde genomische DNA aus N2a-Zellen isoliert und als Vorlage für eine PCR verwendet. Mit Hilfe der Primer PrPBam fwd und PrP254Eco rev konnte das gewünschte 760 bp-DNA-Fragment amplifiziert und über *Bam*HI und *Eco*RI Schnittstellen in den Vektor pcDNA3.1/Zeo eingeführt werden. Das so

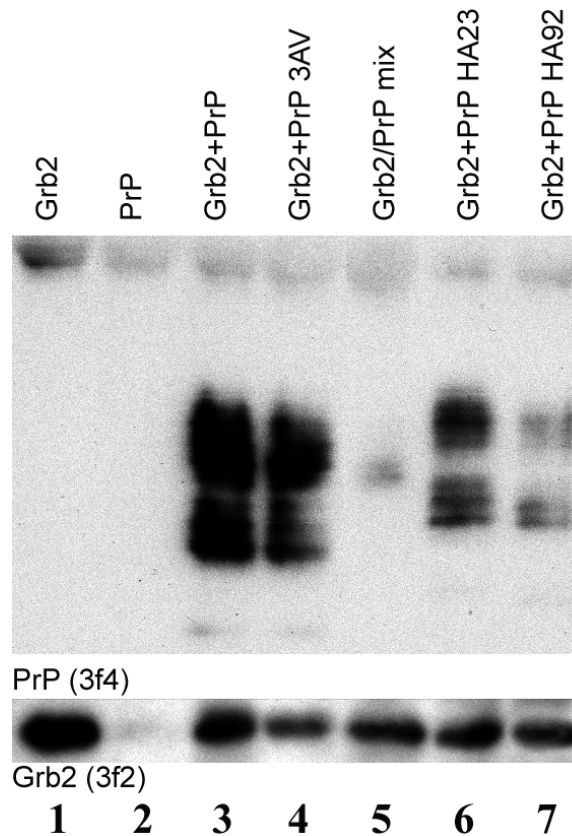
erhaltene Plasmid pcDNA3.1/Zeo enthielt den kompletten ORF von PrP von Codon 1-254. In die PrP-Sequenz wurde mittels Site-Directed-Mutagenesis ein Epitop eingeführt, welches einen Austausch der Wildtyp-Sequenz LKHV an Position 109-112 zu MKHM bewirkt. Dieses Epitop kann durch den Prion-spezifischen monoklonalen Antikörper 3F4 detektiert werden, ändert aber nichts am zellphysiologischen Verhalten des Proteins.

### 3.8.5 Grb2 der vollen Länge und matures PrP<sup>C</sup> co-präzipitieren

Nachdem die Interaktion von rekombinantem PrP mit Grb2 zunächst in Hefe gezeigt werden konnte und die Wechselwirkung auch durch cytosolische Expression in Säugetierzellen nachgewiesen wurde, sollte als nächster Schritt eine mögliche *in vivo* Interaktion von vollständig ausgereiften Grb2 bzw. PrP-Molekülen der vollen Länge untersucht werden.

Dazu wurden vT7-infizierte BHK-Zellen mit den Plasmiden pcDNA3.1/Grb2 und pcDNA3.1/PrP cotransfiziert sowie in zwei Ansätzen die beiden Proteine zur Kontrolle jeweils einzeln exprimiert. Die Zellen wurden lysiert und Grb2 mit einem polyklonalen Antiserum (1:200) gegen den C-terminalen Teil von Grb2 präzipitiert (zur Verfügung gestellt von A. Ullrich). Das erhaltene Präzipitat wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis von co-präzipitiertem PrP erfolgte mittels Western-Blot mit dem monoklonalen Antikörper 3F4 (1:5.000); präzipitiertes Grb2 wurde mit dem Antikörper 3F2 (1:2500) nachgewiesen (Abbildung 30). In Zellen, die jeweils Grb2 bzw. PrP<sup>C</sup> alleine exprimierten (Spuren 1 und 2), konnte kein PrP<sup>C</sup> im Grb2-Präzipitat nachgewiesen werden. Um eine Komplexbildung auszuschließen, die erst während bzw. nach der Zell-Lyse auftritt, wurden Aliquots dieser beiden Zell-Lysate nach der Lyse gemischt und präzipitiert (Spur 5). Dort war ebenfalls kein PrP detektierbar, wohingegen Grb2 effizient präzipitiert wurde.

Außer 3F4-markiertem Wildtyp-PrP<sup>C</sup> (Spur 3) wurden noch weitere Konstrukte des Prion-Proteins auf ihre Interaktion mit Grb2 untersucht. Dies war PrP<sup>C</sup> mit der Mutation 3AV (Plasmid zur Verfügung gestellt von J. Tatzelt), bei der zwischen AS 113 und 118 drei Alanine zu Valin mutiert wurden (Spur 4). Von dieser Mutation ist bekannt, dass sie die Bildung der Transmembranformen von PrP begünstigt (Hegde et al., 1998). Desweiteren kamen zwei PrP-Konstrukte zum Einsatz, denen mittels PCR-Mutagenese ein HA-Epitop an Position 23 bzw. 92 inseriert worden war. Auch diese konnten effizient co-präzipitiert werden, wobei das HA-Epitop zu einer sichtbar höheren Proteinmasse führt (Spur 6 und 7).



**Abbildung 30:** Western-Blot-Analyse einer Co-Präzipitation von PrP der vollen Länge mit Grb2; Vaccinia-infizierte BHK-Zellen wurden mit Plasmiden für Grb2 und verschiedene PrP-Konstrukte transfiziert und Grb2 mittels eines polyklonalen Antikörpers präzipitiert; **oben**) die Detektion von PrP erfolgte mittels 3F4; **unten**) präzipitiertes Grb2 wurde als Kontrolle mit 3F2 mAb nachgewiesen. In Spur 1 und 2 wurden Zellen analysiert, die jeweils nur Grb2 bzw. PrP exprimierten. Lysate dieser Zellen wurden gemischt und in Spur 5 untersucht. In Spur 3 und 4 wurde Grb2 mit wt PrP bzw. der PrP-Mutation 3AV coexprimiert. Spur 6 und 7 repräsentieren Co-Präzipitate aus Zellen, die PrP mit HA-Epitop-Insertionen an Position 23 bzw. 92 exprimierten.

Deutliche PrP-Signale sind in allen Zellen detektierbar, die PrP<sup>C</sup> bzw. dessen Varianten gemeinsam mit Grb2 coexprimieren (Spuren 3, 4 und 6, 7). Als Kontrolle wurde präzipitiertes Grb2 nachgewiesen. Es wurde effektiv aus allen Zellen präzipitiert, die mit dem Grb2-Plasmid transfiziert wurden (alle Spuren außer 2).

Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass nicht nur cytosolisch exprimierte Fragmente von PrP und Grb2 interagieren, sondern eine Komplexbildung auch zwischen voll prozessiertem und glycosyliertem PrP<sup>C</sup> und Grb2 der vollen Länge auftritt.

### 3.9 Synapsin I

#### 3.9.1 Lokalisation der identifizierten Region innerhalb von Synapsin I

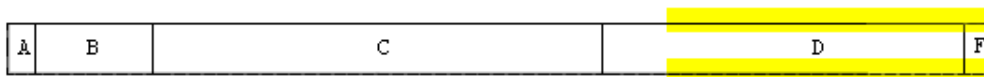
Wie zuvor gezeigt werden konnte, interagiert PrP 23-231 mit einem Proteinfragment aus Synapsin Ib. Synapsin I ist ein modular aufgebautes Phosphoprotein, das in mehrere klar definierte Domänen eingeteilt werden kann, die alle unterschiedliche Funktionen übernehmen. Durch alternatives Splicing entstehen die Subtypen Synapsin Ia und Ib, die sich lediglich in ihrer C-terminalen Domäne unterscheiden.

```

1 mnylrrrlsd snfmanlpng ymtdlqrpqp ppppsaasp gatpgsatas aerastaapv
61 aspaapspgs sggggffssl snavkqtaaa aaatfseqvg gsgggagrsgg aaarvllvid
121 ephtdwakyf kgkkihgeid ikveqaefsd lnlvahangg fsvdmevlrn gvkvvrslkp
181 dfvlirqhaf smarngdyrs lviglqyagi psvnslhsvy nfcckpwvfa qmvr lhkklg
241 teefplidqt fypnhkemls sttypvwwkm ghahsgmgkv kvdnqhdfqd iasvvaltkt
301 yataepfida kydvrvqkig qnykaymts vsgnwktntg samleqiams dryklwvdtc
361 seifggldic avealhgkdg rdhievwgs smpligdhqd edkqlivelv vnkntgalpr
421 qpqradaspgr gshsqssspg altlgrqtsq qpagppaqr pppqggppqp gppqrqgpp
481 lqqrppppqg qhlsglppa gsplpqrlls ptaapqgsas gatpvtqggg rgsrpvagpp
541 gappaarppa spspqrqaga pgatrqasis gpaptkasga ppggqqrqgp pqkppgpagg
601 trgasqagpg prtgppttqq prpsgpppag rpakpqlaak psqdvpppit aaagppphpq
661 lkaspsqagp

```

1B:



- A: Substrat für div. Kinasen
- B: Linker
- C: Aktin/Vesikel-Bindung
- D: Prolinreiche Domäne
- E/F: alternativ gespliceter C-terminus

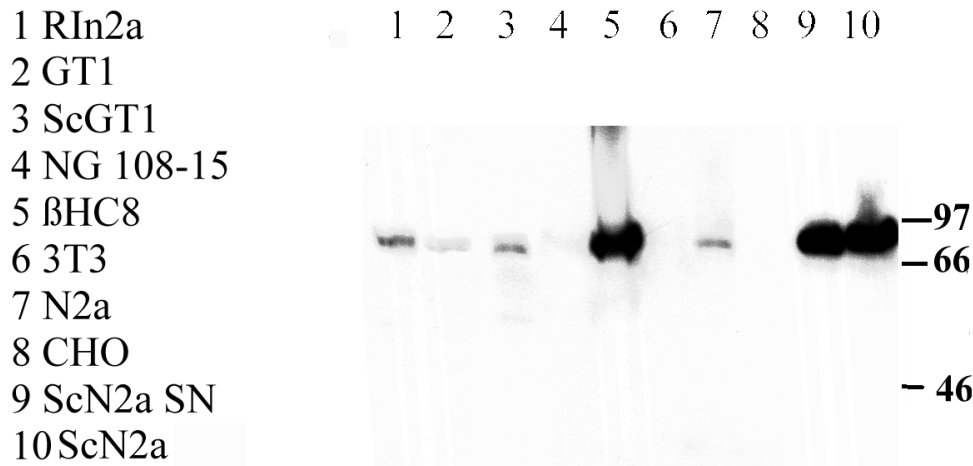
**Abbildung 31:** oben) Synapsin Ib besitzt eine Länge von 670 AS; der 208 AS lange Bereich, der in der Bibliotheks-cDNA codiert war ist markiert; unten) funktionell ist Synapsin I in mehrere Domänen (A-F) mit unterschiedlichen Funktionen unterteilt; der mit PrP interagierende Bereich enthält die Domänen D und F

#### 3.9.2 Untersuchung der Synapsin I-Expression verschiedener Zelltypen

Es ist bekannt, dass Synapsin in neuronalem Gewebe hoch exprimiert wird. Um auch Zellkulturlinien zu identifizieren, in denen Synapsin I gebildet wird, wurden verschiedene postnukleäre Zellysate mittels eines Western-Blot auf die Expression von Synapsin I getestet (Abbildung 32). Dafür wurde ein polyklonaler Synapsin I-Antikörper (1:2.000) verwendet. Einige Lysate wurden freundlicherweise von S. Gilch zur Verfügung gestellt.

Eine Expression von Synapsin I ist in neuronalen N2a-Zellen sichtbar (Spur 7), wobei besonders deren Prion-infizierter Gegenpart ScN2a (Spur 10) hohe Konzentrationen aufweist. Diese Zellen wurden in 1 % Sarcosyl ultrazentrifugiert und der lösliche Überstand analysiert (Spur 9). Auch in Lysaten der Maus-Insulinomazellen  $\beta$ -HC8 (Spur 5) und der Ratten-Insulinomazellen RIn2a (Spur1) sind hohe Synapsinmengen nachweisbar. Die murine Hypothalamus-Zellen GT1 (Spur 2)

und deren Prion-infizierter Gegenpart ScGT1 (Spur 3) weisen ein wesentlich geringeres Synapsinsignal auf. Keine Expression ist in humanen 3T3-Zellen, den ovariellen Hamster-Zellen CHO und den Neuroblastom/Gliom-Hybridzellen NG 108-15 detektierbar (Spuren 4, 6 und 8).



**Abbildung 32:** Analyse der Expression von Synapsin I in verschiedenen Zelltypen mittels Western-Blot. Die Spurbeladung ist links angegeben. Die Detektion erfolgte mit einem polyklonalen Synapsin-Antikörper.

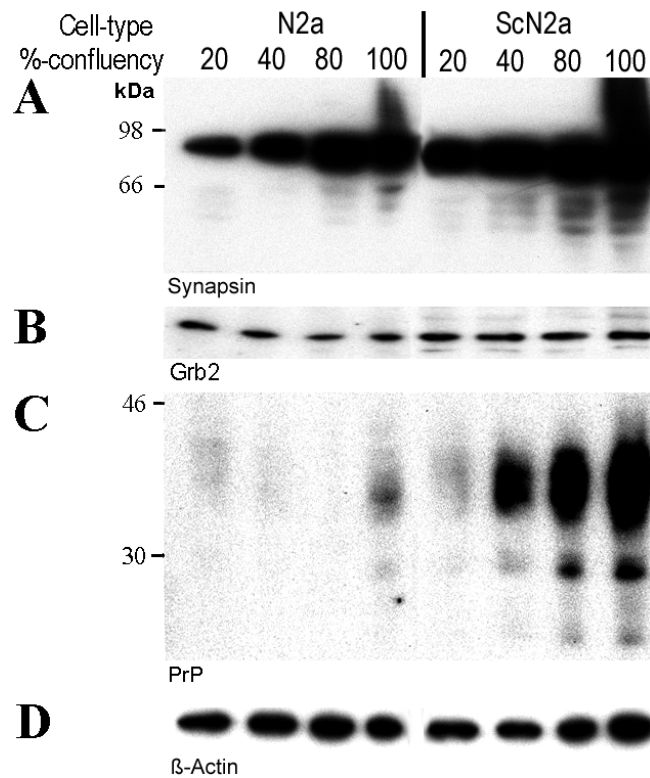
Diese Ergebnisse zeigen, dass Synapsin I in verschiedenen Mengen in den untersuchten Zelltypen exprimiert wird und die zunächst vermutete Beschränkung auf neuronale Zellen nicht besteht.

### 3.10 Expression von PrP, Synapsin und Grb2 in Abhängigkeit von der Zelldichte

Um herauszufinden, ob die Expression von PrP<sup>C</sup> und der beiden Interaktoren Synapsin I und Grb2 möglicherweise coreguliert ist, wurden normale und prion-infizierte N2a-Zellen untersucht. Die Zellen wurden in verschiedenen Dichtestadien von 20-100 % lysiert und jeweils 5 µg Protein mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot analysiert (Abbildung 33). PrP<sup>C</sup> wurde mit dem Antikörper 4F2 (Verdünnung 1:1.000) detektiert, der ein N-terminales Epitop im Prion-Protein erkennt. Grb2 wurde mit 3F2 (1:2.500) und Synapsin I mittels A10C (1:2000) detektiert. Als Beladungskontrolle diente β-Actin.

Nicht infizierte N2a-Zellen zeigen einen Anstieg der Synapsin I-Konzentration mit zunehmender Zelldichte. Auch die Menge an PrP nimmt mit steigender Zelldichte leicht zu. Von der Konfluenz nicht beeinflusst zeigen sich sowohl Grb2, als auch Aktin. Dieselbe Tendenz ist auch in prion-infizierten N2a-Zellen zu beobachten, wobei sowohl die PrP-Konzentration als auch die Synapsinmenge noch deutlicher in Abhängigkeit von den Dichtestadien ansteigt.

Diese Daten zeigen zum ersten Mal, dass sowohl die intrazelluläre Menge an Synapsin I, als auch die von PrP<sup>C</sup> stark von der Zelldichte abhängt. Die Konzentration von Grb2 und Aktin wird offenbar nicht von dichteabhängigen Faktoren beeinflusst.



**Abbildung 33:** Wildtyp N2a und prion-infizierte ScN2a-Zellen wurden in verschiedenen Dichtestadien von 20-100 % lysiert und je 5µg Protein mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Der Gehalt an Synapsin I (a), Grb2 (b) und PrP (c) wurde mittels Western-Blot untersucht, wobei β-Actin (d) als Beladungskontrolle diente.

### 3.11 Cofraktionierung von PrP, Grb2 und Synapsin I in mikrosomalen Vesikeln

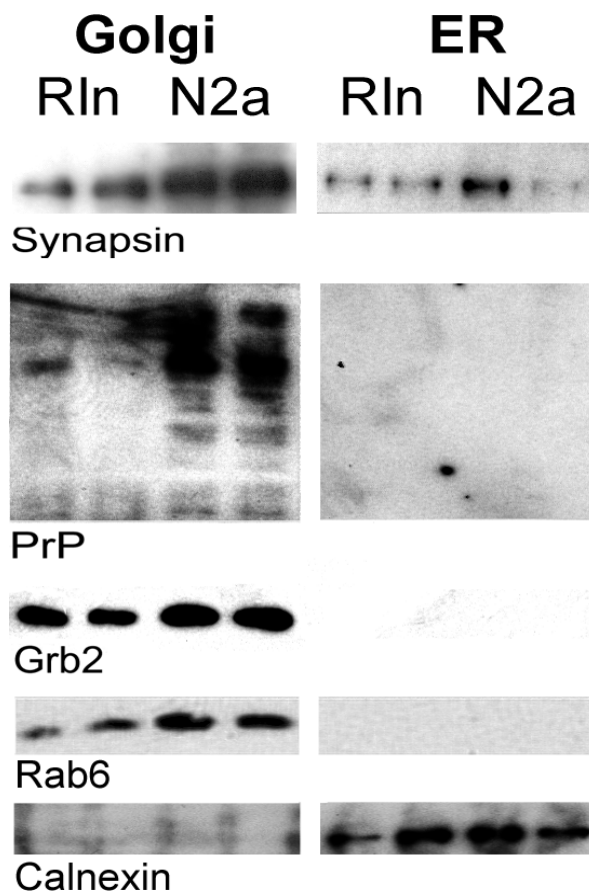
Sowohl PrP<sup>C</sup> als auch Synapsin I sind Proteine, die eng mit zellulären Membranen assoziiert sind. Während das Prion-Protein zum Großteil an der Zelloberfläche zu finden ist, bindet Synapsin I an synaptische Vesikelmembranen. Für Grb2 wurde ebenfalls beschrieben, dass das Protein intrazellulär an der inneren Zellmembran lokalisiert ist.

Das subzelluläre Kompartiment einer möglichen Colokalisation zwischen PrP<sup>C</sup> und den identifizierten Interaktoren sollte mittels einer Zellfraktionierung untersucht werden. Dazu wurden Zell-Linien mit einer bekannt hohen endogenen Synapsin I-Expression ausgewählt und deren Mikrosomen präpariert. Diese Zell-Linien waren zum einen die Insulinoma-Zellen Rin2a aus Ratte. Zum anderen wurden neuronale N2a-Zellen untersucht, die stabil mit dem Plasmid pcDNA3.1/Zeo PrP-3F4 transfiziert worden waren, welches zur Überexpression von 3F4-markiertem PrP<sup>C</sup> führt.

Mittels Ultrazentrifugation in einem Sucrose-Dichtegradienten wurden Mikrosomen-Fractionen isoliert, die den Vesikeln des Golgi-Apparates bzw. des Endoplasmatischen Retikulums (ER) entsprechen (Abbildung 34). Die Fractionen wurden mit Hilfe von spezifischen Markerproteinen auf die Reinheit der Golgi- bzw. ER-Fractionen untersucht. Als ER-Marker diente Rab6 und als

Golgi-Marker Calnexin. Das Vorkommen von Synapsin I wurde mit dem Antikörper A10C untersucht, Grb2 wurde mit 3F2 (1:2.500) detektiert und PrP<sup>C</sup> mit dem Antikörper 4F2 (1:1.000; zur Verfügung gestellt von G. Hunsmann, Göttingen).

Synapsin I ist in den Golgi-Fractionen beider Zelltypen stark vertreten, wohingegen schwächere Signale in den ER-Fractionen sichtbar sind. Grb2 ist ausschließlich in den Golgi-Fractionen beider Zelltypen nachweisbar. PrP<sup>C</sup> ist deutlich in der Golgi-Fraktion von N2a-Zellen sichtbar, nicht aber in den korrespondierenden ER-Vesikeln. Kein PrP-Signal ist in RIn2a-Zellen sichtbar. Die untersuchten Markerproteine Rab6 (als Golgi-Marker) und Calnexin (als Marker für ER-Vesikel) waren in den erwarteten Fraktionen beider Zelltypen enthalten.



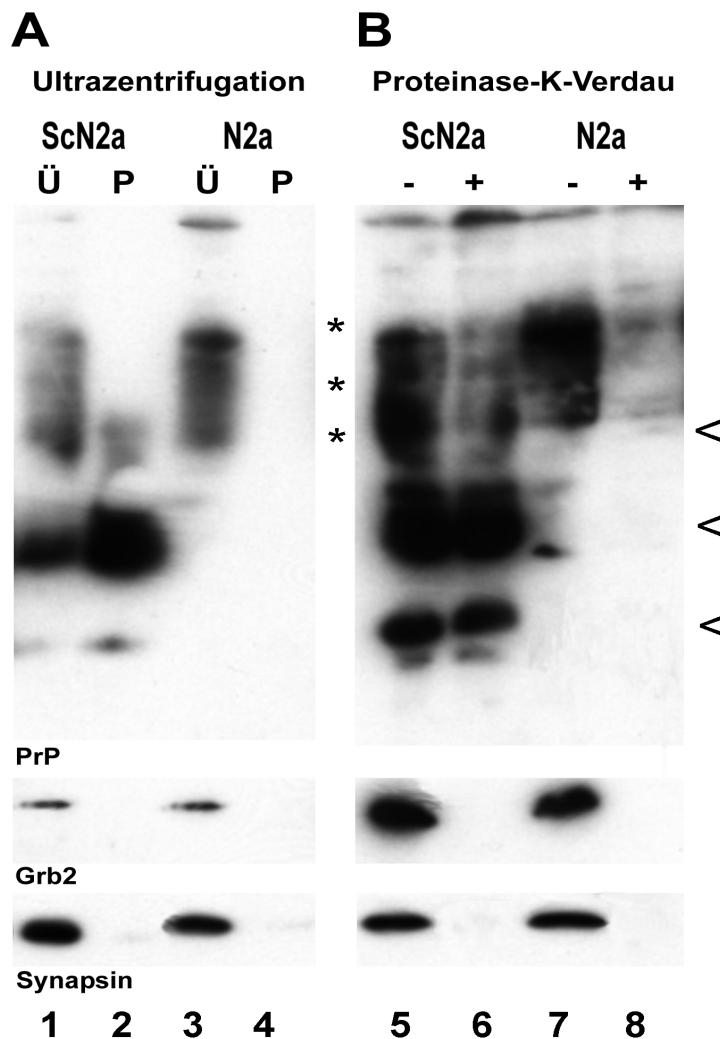
**Abbildung 34:** Analyse von Mikrosomenfraktionen aus N2a und RIn2a-Zellen. Jeweils zwei Fraktionen, die ER bzw. Golgi-Vesikel enthielten, wurden auf die Anwesenheit von PrP, Synapsin I und Grb2 untersucht. Als Kontrolle der Fraktionsreinheit dienten das ER-Protein Calnexin und das Golgi-Protein Rab6.

Diese Daten deutet darauf hin, dass die beiden PrP-Interaktoren Synapsin I und Grb2 gemeinsam mit dem zellulären Prion-Protein in Golgi-assoziierten Vesikelfractionen von neuronalen Zellen zu finden sind.



### 3.12 Löslichkeitsverhalten und Proteinase K-Resistenz der PrP-Interaktoren

In Prion-infizierten Zellen und Geweben lässt sich PrP<sup>Sc</sup> mittels eines Löslichkeitstests in 1 % Sarcosyl nach einer Ultrazentrifugation in der unlöslichen Fraktion nachweisen, wohingegen der PrP<sup>C</sup>-Anteil löslich bleibt. Diese Eigenschaft ist auf die umfaltungsbedingte Aggregation zurückzuführen. Für andere Proteine könnte es möglich sein, dass eine Interaktion mit PrP<sup>Sc</sup> dazu führt, dass diese normalerweise lösliche Proteine ebenfalls unlöslich werden. Deshalb wurden Pellets und Überstände von ultrazentrifugierten postnukleären Überständen uninfizierter und persistent prion-infizierter N2a-Zellen untersucht (Abbildung 35).



**Abbildung 35:** Analyse von ultrazentrifugierten bzw. mit Proteinase K behandelten N2a und ScN2a-Zell-Lysaten; **A)** Ultrazentrifugation: Überstände (Ü) und Pellets (P) wurden getrennt voneinander aufgetragen und auf das Vorhandensein von PrP, Synapsin und Grb2 untersucht. **B)** Proteinase K behandelte (+) und unbehandelte (-) Zell-Lysate aus N2a und ScN2a-Zellen wurden ebenfalls auf das Vorhandensein der drei Proteine untersucht. Die drei Glykosylierungsformen von PrP<sup>C</sup> (\*) und PrP<sup>Sc</sup> (<) sind markiert.

Beide Zelltypen überexprimieren stabil PrP mit dem 3F4-Epitop. Die Detektion von PrP erfolgte mittels des Antikörpers 3F4; Synapsin wurde mit A10C und Grb2 mit 3F2 nachgewiesen.

Erwartungsgemäß war PrP<sup>C</sup> in uninfizierten N2a-Zellen nur im Überstand sichtbar (Spur 3 und 4), wohingegen in ScN2a-Zellen auch im Pellet unlösliches PrP<sup>Sc</sup> nachgewiesen werden kann (Spur 2). Synapsin I und Grb2 sind in beiden Zell-Linien in der löslichen Fraktion sichtbar (Spur 1 und 3), ohne dass sie im Pellet detektierbar sind (Spur 2 und 4).

Zur Bestätigung obiger Ergebnisse wurde anstelle einer Ultrazentrifugation eine Fällung von PrP<sup>Sc</sup> mittels Phosphowolframsäure durchgeführt. Diese Methode trennt ebenfalls spezifisch PrP<sup>C</sup> von PrP<sup>Sc</sup> (Safar et al., 1998). Die resultierenden Fraktionen wurden erneut auf das Vorhandensein von PrP, Grb2 und Synapsin I untersucht.

Dabei wurden prinzipiell dieselben Ergebnisse erhalten, die bereits mittels Ultrazentrifugation sichtbar wurden (Daten nicht gezeigt), d.h. PrP<sup>Sc</sup> war unlöslich, wohingegen PrP<sup>C</sup>, Grb2 und Synapsin I nur in den löslichen Fraktionen detektierbar waren.

Ein ähnliches Verhalten zeigte sich bei der Untersuchung der Proteinase K-Resistenz. Während in nicht infizierten N2a-Zellen sowohl PrP<sup>C</sup> als auch Grb2 und Synapsin I durch Behandlung mit PK degradiert wurden (Spuren 7 und 8), wurde in Prion-infizierten Zellen erwartungsgemäß Proteinase K-resistentes PrP<sup>Sc</sup> detektiert, wohingegen Synapsin I und Grb2 degradiert wurden (Spuren 5 und 6).

Der Infektionsstatus der N2a-Zellen hat offenbar keinen Einfluss auf das Löslichkeitsverhalten der beiden PrP-Interaktoren Grb2 und Synapsin I. Beide sind immer in der detergens-löslichen Fraktion zu finden. Auch die Proteinase K-Sensitivität der beiden Proteine bleibt sowohl in N2a als auch in ScN2a-Zellen erhalten, während PrP<sup>Sc</sup> in infizierten Zellen PK-resistent ist.

### **3.13 Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen Caveolin und PrP**

In neuronalen 1C11-Zellen, welche PrP exprimieren, wurde Caveolin-1 als Co-Präzipitat bei einer Präzipitation mit PrP-Antikörpern identifiziert (Mouillet-Richard et al., 2000). Ob tatsächlich eine direkte Interaktion dieser beiden Proteine vorliegt oder lediglich eine „Cofraktionierung“, die stark von den Lysebedingungen abhängt, konnte bislang nicht geklärt werden. Caveoline sind der strukturgebende Proteinbestandteil von Caveolae. Diese Zellorganellen zeichnen sich morphologisch durch tropfenförmige Einbuchtungen der äußeren Zellmembran aus. Diese Membraneinstülpungen enthalten überdurchschnittlich viel Cholesterin, was der Lipiddoppelschicht in diesem Bereich eine relativ hohe Festigkeit verleiht. Dadurch bedingt ist auch die Unlöslichkeit in nichtionischen Detergenzien wie Triton-X 100 bei 4° C. Generell scheinen Caveolae eine Sonderform von Membranbestandteilen zu sein, die als Lipid-Rafts

bekannt sind (Simons und Toomre, 2000). Diese Rafts cofraktionieren mit detergens-unlöslichen Glycoproteinen, sog. DIG's (detergent insoluble glycoproteins). Das zelluläre Prion-Protein wurde ebenfalls in Caveolae nachgewiesen (Vey et al., 1996) und eine Reduktion von Cholesterin in prion-infizierten Zellen führt zur Auflösung der Caveolae-Struktur und zugleich zu einer Reduktion von PrP<sup>Sc</sup> (Taraboulos et al., 1995).

Kürzlich wurde ein Konsensus-Motiv beschrieben, das in vielen direkten Caveolin-Interaktoren nachweisbar ist (Couet et al., 1997). Die Kernregion besteht aus der Aminosäure-Sequenz IVETHFTFKDLHF~~KMF~~DVGGQRS. Solch ein ähnliches Motiv ist auch in PrP enthalten, so dass die prinzipiellen Voraussetzungen für eine direkte Interaktion mit Caveolin gegeben sein könnten (Abbildung 36).

```

1  MANLGYWLLALFVTMWTDVGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQSPGGNRYPPQGGTGWGQPH 60

61  GGGWQPHGGSWGQPHGGSWGQPHGGGWQGGGTHNQWNKPSKPKTNLKHVAGAAAAGAV 120

121  VGGLGGYMLGSAMSRPMIHFGNDWEDRYRENMYRYPNQVYYRPVDQYSNQNNFVHDCVN 180

181  ITIKQHTVTTTTTKGENFTETDVKMMERVVEQMCVTQYQKESQAYYDGRRSSSTVLFSSPP 240
      IVETHFTFKDLHFKMFDVGGQRS
      :** . : : . . *:**
241  VILLISFLIFLIVG 254
    
```

**Abbildung 36:** die komplette Aminosäuresequenz des murinen Prion-Proteins; die Sequenz von PrP enthält eine mögliche Caveolin-Bindedomäne im C-Terminus des muren Proteins. Die zu dem publizierten Bindeepitop identischen Aminosäuren sind mit \* gekennzeichnet, gleiche Ladung ist mit (:) markiert.

### 3.13.1 Klonierung von Caveolin

Zur Zeit sind drei Subtypen von Caveolin bekannt. Während Caveolin-1 (auch VIP21 genannt) hauptsächlich neuronal exprimiert wird, scheint Caveolin-2 ubiquitär vorhanden zu sein. Caveolin-3 wird muskelspezifisch exprimiert und daher auch M-Caveolin genannt. Die Proteine haben ein Molekulargewicht von ca. 20 kD und können Homo- und Heterooligomere bilden. Strukturell besitzen sie eine zentrale hydrophobe Domäne, die von hydrophilen Bereichen flankiert wird. Es ist bekannt, dass eine Haarnadelstruktur ausgebildet wird, wobei der hydrophobe Bereich in die Plasmamembran eintaucht und die hydrophilen Enden ins Cytoplasma ragen.

Die Leserahmen von Caveolin 1, 2 und 3 wurden mittels geeigneter Primer aus IMAGE-Plasmiden amplifiziert, welche deren cDNA enthielten. Caveolin-1 und -2 stammten aus humanem Gewebe, wohingegen die Caveolin 3-cDNA aus murinen Zellen isoliert wurde. Die

Konservierung auf Aminosäureebene zwischen murinen und menschlichen Caveolinen liegt bei über 98 %.

Durch Verwenden von Primern, welche die Schnittstellen für *Bam*HI und *Xho*I enthielten, konnte die erhaltenen PCR-Fragmente im korrekten Leserahmen in das Plasmid pACT2 kloniert werden. Die resultierenden Plasmide wurden pACT Cav1, pACT Cav2 bzw. pACT Cav3 genannt.

### **3.13.2 Caveoline interagieren in Hefe nicht mit PrP 23-231**

Um die Interaktion des Prion-Proteins mit den drei Caveolin-Typen zu testen, wurde das PrP-Plasmid pAS 23-231 zusammen mit den Caveolin-Plasmiden pACT Cav1, Cav2 und Cav3 zur Durchführung eines Yeast-Two-Hybrid-Assays verwendet. Dazu wurde der Hefestamm 187 mit den Plasmiden transformiert und auf SD-Medium ohne Trp, Leu und His selektiert.

Auch nach einer Woche ließ sich kein Wachstum beobachten, wohingegen die Hefen mit der Positivkontrolle pVA3.1 und pTD1.1 auf SD-Medium wuchsen und die erwartete Blaufärbung zeigten.

Weder Caveolin-1, noch Caveolin-2 oder Caveolin-3 führten zu einer messbaren Interaktion in *S.cerevisiae*, die zur Aktivierung der Reportergene geführt hätte.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass keine direkte Interaktion zwischen dem Prion-Protein und den drei Caveolin-Typen auftritt.

### **3.14 Das PrP-ähnliche Protein Doppel**

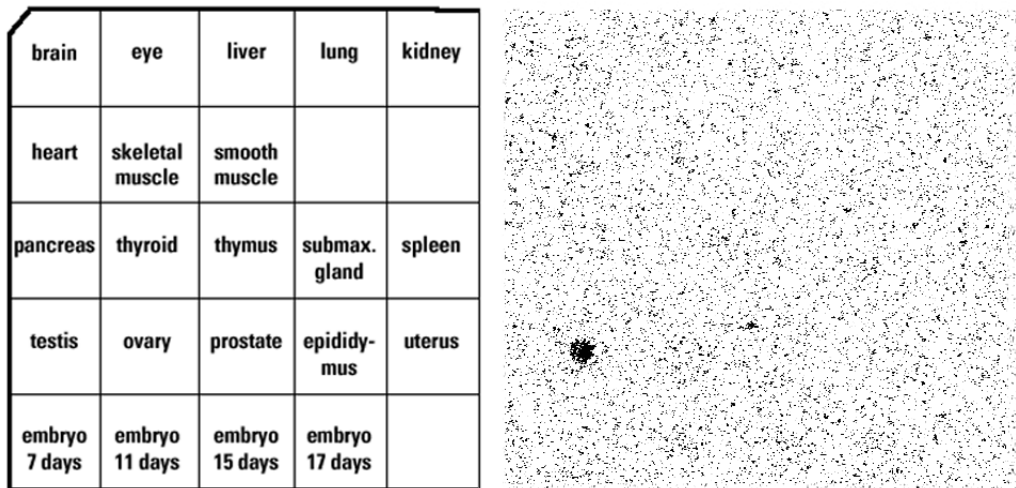
In einigen Mausstämmen, in denen das Prion-Gen deletiert wurde, traten Verhaltensstörungen und Ataxie in höherem Alter der Mäuse auf (siehe Einleitung). Dies führte zur Identifizierung des Prion-ähnlichen Proteins Doppel (abgeleitet von „Doppelgänger“), das zu PrP ca. 35 % Sequenzhomologie auf Aminosäureebene aufweist. Das Protein wird in den betroffenen Mäusen im Gehirn hoch exprimiert, wohingegen in Wildtyp-Mäusen kein Doppel im ZNS gebildet wird.

#### **3.14.1 Klonierung von Doppel in verschiedene Plasmide**

Der offene Leserahmen von Doppel (Dpl) befindet sich, ähnlich wie der von PrP, in einem einzigen Exon auf Chromosom 2 der Maus. Dies macht es möglich, genomische DNA zur Amplifizierung und Klonierung von Doppel zu verwenden. Der komplette Leserahmen von Dpl (Codon 1-154) wurde mit geeigneten Primern mittels PCR aus genomischer DNA amplifiziert, die aus murinen N2a-Zellen gewonnen wurde. Durch die Einführung von terminalen Restriktionsschnittstellen für *Bam*HI und *Eco*RI konnte eine gerichtete Klonierung in die Plasmide pGADT7 und pGBKT7 erreicht werden.

### 3.14.2 Analyse der Doppel-mRNA-Expression in Mäusegeweben

Um die Gewebeexpression von Doppel in Wildtyp-Mäusen zu untersuchen, wurde der bereits für Pint1 verwendete dehybridisierte murine RNA-Dot-Blot mit einer radioaktiven  $^{32}\text{P}$ -DNA-Sonde für Doppel hybridisiert. Die Sonde wurde durch die Markierung des PCR-amplifizierten Dpl-ORFs mittels Zufallsprimern erzeugt und nach Standardvorschrift mit der Membran hybridisiert. Die Exposition erfolgte auf einem Phosphoimager-Schirm für 48 Std.



**Abbildung 37:** das RNA-Expressionsmuster von Doppel in murinen Organen. Eine radioaktive Doppel-DNA-Sonde wurde mit einem RNA-Blot hybridisiert; links ist das Auftragschema dargestellt, rechts sind die detektierten Signale abgebildet. Nur im Testis ist ein spezifisches Signal sichtbar.

Die Auswertung der Signale (Abbildung 37) zeigt deutlich, dass Doppel in Wildtyp-Mäusen ausschließlich im Testis (Hoden) exprimiert wird. In anderen Geweben ist praktisch kein Signal sichtbar. Damit können diese Ergebnisse andere Publikationen nur teilweise bestätigen. Dort wurde Doppel-RNA außer in Hoden auch in geringerer Menge in Herzgewebe (Moore et al., 1999) und in Skelettmuskeln sowie der Milz gefunden (Li et al., 2000).

### 3.14.3 Doppel interagiert nicht mit den identifizierten PrP-Interaktoren

Eine Hypothese für den sichtbaren Phänotyp in den  $\text{PrP}^{0/0}$ -Mausstämmen besagt, dass PrP und Dpl teilweise gleiche Bindungspartner besitzen. Während die Interaktion mit PrP eine definierte (und regulierte) Funktion besitzt, könnte eine Interaktion mit Doppel zu einer „Fehlfunktion“ führen. Da die betroffenen Mäuse kein endogenes  $\text{PrP}^{\text{C}}$  bilden und somit auch keine Konkurrenz um Bindungspartner entsteht, würde Doppel also zu falschen Signalen führen, die letztendlich in den pathologischen Symptomen resultieren.

Um herauszufinden, ob die identifizierten PrP-Interaktoren auch mit Doppel interagieren, wurde Doppel im Plasmid pGBKT7 und die PrP-Interaktoren in pGADT7 mittels eines Yeast-Two-

Hybrid-Assays getestet. Dafür wurden die Hefestämme Y187 und Y190 parallel transformiert und auf SD-Selektivmedium ohne Trp, Leu und His ausplattiert.

Y190-Kolonien wuchsen bei allen drei Interaktoren, es war aber mittels eines X-Gal-Filtertests keine Blaufärbung zu beobachten. Das Wachstum ist auf die Basalexpression des HIS3-Gens zurückzuführen. Kein Wachstum trat bei dem Hefestamm Y187 auf (Tabelle 9). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass keine direkte Interaktion zwischen Doppel und den drei PrP-Interaktoren Pint1, Grb2 und Synapsin I auftreten.

Hefestamm	PrP-Interaktor	Wachstum auf Selektivmedium	Blaufärbung
Y190	Pint1	+	-
	Grb2	+	-
	Syn1	+	-
Y187	Pint1	-	n.d.
	Grb2	-	n.d.
	Syn1	-	n.d.
Y187 und Y190	pVA3.1+pTD1.1 (Positivkontrolle)	+	+

**Tabelle 9:** Wachstumsverhalten von Hefestämmen, die mit den Plasmiden pGBKT7-Doppel und den drei PrP-Interaktoren Synapsin, Pint1 und Grb2 in pGADT7 cotransformiert wurden.

#### 3.14.4 Doppel und PrP 23-231 interagieren in Hefe nicht miteinander

Es wird postuliert, dass das zelluläre Prion-Protein *in vivo* als Dimer vorliegen kann (Priola et al., 1995). Aufgrund der hohen phylogenetischen Verwandtschaft und strukturellen Ähnlichkeit zwischen Doppel und PrP könnte auch ein Heterodimer zwischen diesen beiden Proteinen in manchen Zelltypen gebildet werden. Diese Fragestellung wurde mittels eines Yeast-Two-Hybrid-Assays in Homologie zu den Tests mit den PrP-Interaktoren durchgeführt. Dabei lag Doppel im Plasmid pGADT7 vor und PrP in pGBKT7, d.h. Doppel wurde in Beute-Position eingesetzt (im Gegensatz zu dem vorherigen Versuch). Die Durchführung des Versuches erfolgte wie oben.

Weder Y190 noch Y187 bildeten auf SD-Selektivmedium ohne Trp, Leu und His Kolonien, die  $\beta$ -Galaktosidase exprimierten.

Daher kann davon ausgegangen werden, dass keine direkte Interaktion zwischen PrP und Doppel auftritt, die zu einer mittels dieses experimentellen Ansatzes meßbaren Heterodimerbildung führt.

### 4 Diskussion

Die Durchführung eines Yeast-Two-Hybrid-Screenings mit murinem PrP 23-231 als Köder in einer Protein-Bank aus Hirngewebe erwies sich als sehr effektiv bei der Isolierung neuer potenzieller Interaktoren. Selbst unter Ausschluss der bereits als falsch positiv beschriebenen interagierenden Proteine konnten einige Proteine identifiziert werden, die auch in einem physiologischen Kontext mit PrP interagieren könnten.

Es wurden von uns keine Proteine identifiziert, welche bereits als PrP-Interaktoren beschrieben wurden. Dies liegt möglicherweise daran, dass bei den meisten publizierten Verfahren entweder eine cDNA-Bank aus einem anderen Gewebe oder sogar aus einer anderen Spezies verwendet wurde. Keines der in Tabelle 8 aufgeführten Proteine wurde mehrfach isoliert, was durch die Komplexität der cDNA-Bank eigentlich zu erwarten gewesen wäre. Da nicht bekannt ist, mit wievielen verschiedenen Proteinen PrP<sup>C</sup> interagieren kann, könnte dies auf eine hohe Spezifität der Bindungen hinweisen. Bemerkenswert ist, dass auch in den anderen Publikationen über PrP-Interaktoren von voneinander unabhängigen Arbeitsgruppen keine bereits beschriebenen Interaktoren isoliert wurden.

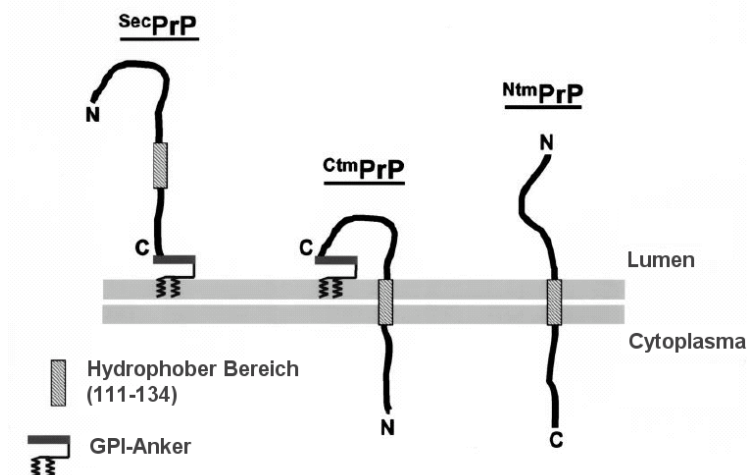
Ein Vergleich der Sequenzen mit den Programmen MULTALIGN und CLUSTALW (online verfügbar über <http://www.expasy.ch/tools>) ergab kein gemeinsames Motiv, welches in allen hier beschriebenen Proteinen zu finden war. Daher scheint die Bindung bzw. Interaktion mit PrP nicht über ein konserviertes Epitop in den „Zielproteinen“ abzulaufen. Die identifizierten Proteine gehören auch ganz verschiedenen Proteinfamilien an, so dass nicht davon auszugehen ist, dass eine Bindung an PrP nur auf eine bestimmte Klasse zutrifft, wie z.B. Kinasen oder Transkriptionsaktivatoren.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden drei mittels des Y2H-Assays identifizierte Proteine ausgewählt, um die Spezifität deren Bindung und mögliche physiologische Zusammenhänge näher zu untersuchen.

#### 4.1 Die Interaktion von PrP mit cytosolischen Proteinen

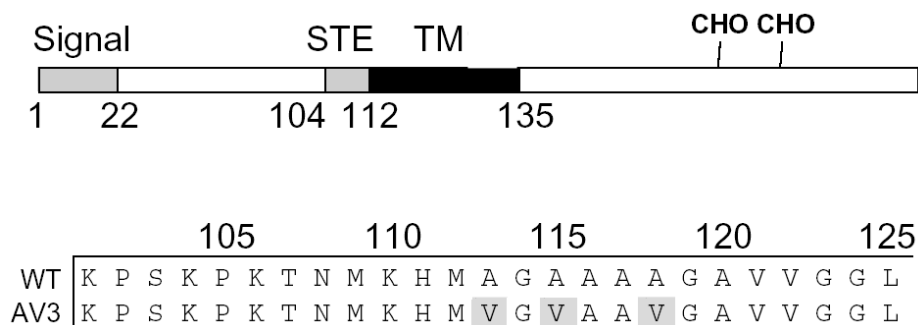
Das zelluläre Prion-Protein ist größtenteils durch einen GPI-Anker mit der Oberfläche von exprimierenden Zellen verbunden. Ein geringer Anteil ist in Zellkultur auch im Nährmedium nachweisbar. Daher stellt sich die Frage, wie solch ein Oberflächenprotein mit intrazellulären Faktoren interagieren kann bzw. wie und ob diese Faktoren an die äußere Membran gelangen. Für das Prion-Protein konnte nachgewiesen werden, dass nicht nur die extrazelluläre, GPI-verankerte Form exprimiert wird, sondern zusätzlich noch zwei Transmembranformen möglich sind (Hegde et al., 1998). In der sogenannten Ntm-Topologie (Ntm von N-Transmembran) zeigt der N-Terminus ins ER-Lumen und der C-Terminus ins Cytosol. Bei der Ctm-Form (C-

Transmembran) ist das Gegenteil der Fall. Für diese Form wurde gezeigt, dass sie einen GPI-Anker besitzt, also quasi eine Schleife vom Lumen zurück ins Cytosol bildet (Stewart und Harris, 2001).



**Abbildung 38:** die drei beschriebenen Transmembranformen von PrP; <sup>Sec</sup>PrP entspricht der GPI-verankerten Form an der äußeren Zellmembran; <sup>Ctm</sup>PrP ist ebenfalls GPI-verankert, zeigt aber mit dem N-Terminus ins Cytosol; <sup>Ntm</sup>PrP stellt eine Stop-Transfer-Form dar, bei dem PrP bereits während der Translation als Transmembranprotein gebildet wird und keinen GPI-Anker besitzt (modifiziert nach Stewart et al., 2001)

Ermöglicht wird diese ungewöhnliche Eigenschaft durch das Vorhandensein eines hydrophoben Abschnitts innerhalb von PrP, der als Transmembrandomäne fungieren kann. Er befindet sich in einem zentralen Bereich von PrP ab AS 112, d.h. er ist auch in dem Proteinase K-resistenten Anteil von PrP<sup>Sc</sup> vorhanden. Durch Mutationen in diesem Bereich kann die Bildung der Transmembranformen begünstigt werden (Abbildung 39). Dazu gehört z.B. der Austausch von drei Alaninen zu Valin, wodurch die Hydrophobizität der Region weiter erhöht wird.



**Abbildung 39: oben)** schematische Darstellung der Bereiche des Prion-Proteins, die einen Einfluß auf die PrP-Membrantopologie haben. Etwa bei AS 105 befindet sich ein Stop-Transfer-Effektor (STE), gefolgt von einer Region hydrophober Aminosäuren. Diese können als Transmembranregion (TM) von PrP fungieren. **unten)** Mutationen in dem TM-Bereich können die Bildung von Transmembran-PrP begünstigen. Einen starken Effekt hat z.B. der Austausch von drei Alaninen zu Valin (AV3) (modifiziert nach Hegde et. al, 1998)



Eine gezielte Überexpression dieser Mutationen in Mäusen führt zu vermehrter Bildung von Ctm-Transmembran-PrP und dieses wiederum zum Auftreten von Scrapie-ähnlichen Symptomen (Hegde et al., 1999). Ein Nachweis der Transmembranformen an der Zelloberfläche ist noch nicht gelungen, da die GPI-verankerte Form von PrP<sup>C</sup> überwiegt und sich die drei topologischen Isoformen in ihrer Primärstruktur nicht unterscheiden, was antikörpergestützte Ansätze *in situ* zur Differenzierung ungeeignet macht.

Ob die transmembranen Isoformen eine physiologische Funktion erfüllen oder nur „Nebenprodukte“ sind, ist noch nicht geklärt. Ebenfalls nicht bekannt ist, ob konvertiertes PrP<sup>Sc</sup> auch als Transmembranform vorliegen kann, was durch die Lokalisierung der TM-Domäne innerhalb des Proteinase K-resistenten Bereiches ab AS 90 prinzipiell möglich ist.

Fest steht jedoch, dass diese Transmembran-PrPs grundsätzlich in der Lage sein sollten, mit cytosolischen Interaktoren eine Bindung über den cytoplasmatischen Anteil von PrP einzugehen. Dabei könnte dies sowohl an intrazellulären Membranen des ER bzw. Golgi-Apparates erfolgen, als auch an der Innenseite der Cytoplasmamembran der Zelloberfläche.

### 4.2 Der neu identifizierte PrP-Interaktor Pint1

Unsere Suche nach Interaktoren des zellulären Prion-Proteins führte zur Identifizierung eines noch nicht bekannten Proteins, das von uns den Namen Pint1 (Prion-Interaktor 1) erhielt. Der N-Terminus und damit der vollständige Leserahmen konnten bislang noch nicht identifiziert werden. Das RNA-Expressionsmuster, das durch die Verwendung des murinen RNA-Dot-Blots untersucht wurde, weist auf eine unterschiedlich starke Expression in verschiedenen Geweben hin. Erwartungsgemäß wurde eine starke Expression im Hirn gefunden. Dies steht im Einklang mit der Verwendung einer cDNA-Bank aus Mäusehirn. Auch das Protein mit der höchsten bekannten Homologie zu Pint1 wird in Hirngewebe exprimiert und stammte aus humanem weiblichem Hirn (Abbildung 21). Da eine Expression in Ovarialgewebe nicht zu beobachten ist, jedoch außer in Hoden auch in einer Anzahl anderer Geweben auftritt, wird das Protein offenbar nicht geschlechtsspezifisch exprimiert (Abbildung 23). Während der Embryogenese sind kaum Signale detektierbar, daher scheint eine Rolle des Proteins bei der Embryonalentwicklung nicht wahrscheinlich zu sein. In weiteren Geweben ist eine schwächere oder gar keine Expression nachweisbar. Daher handelt es sich bei Pint1 offenbar nicht um ein sog. Housekeeping-Protein, welches in allen Zellen nötig ist und deswegen eine Basalexpression aufweist. Die Pint1-mRNA zeigt eine einheitliche Größe von ca. 3.8 kb in allen Geweben. Scheinbar treten keine unterschiedlich gespleißten Formen auf oder die unterschiedlichen Spleißprodukte haben dieselbe Transkriptlänge.

Prinzipiell kann eine Interaktion mit PrP in allen Geweben ablaufen, die beide Proteine gleichzeitig exprimieren. Die mRNA-Expression von PrP in unterschiedlichen Organen wurde bereits untersucht (Yehiely et al., 1997). Dabei zeigte sich eine hohe Expressionsrate in Hirn, Lunge, Niere und Herz. Die Leber, Milz und andere Organe wiesen ebenfalls eine meßbare PrP-Expression auf. Da das Expressionsmuster von Pint1 zumindest teilweise mit dem von PrP<sup>C</sup> überlappt, kann es generell auch in Organen außerhalb des Nervensystems, wie z.B. im Herz, zu einer Interaktion der beiden Proteine kommen.

Die hohe Konservierung eines Teils von Pint1 der Maus, das selbst noch zu Proteinen von *C.elegans* eine signifikante Homologie aufweist, deutet auf eine essentielle Aufgabe im Organismus hin. Möglicherweise handelt es sich bei dieser Region um eine funktionelle Domäne, die in verschiedenen Proteinen zu finden ist. Unter Umständen gehören die homologen Proteine innerhalb einer Spezies einer gemeinsamen Familie an.

Die Immunisierung von Kaninchen mit einem Pint1-Peptid führte zu keiner effizienten Erzeugung von spezifischen Antisera. Dies könnte zum einen technische Ursachen haben. Andererseits könnte dies auch auf eine ubiquitäre Verbreitung von Pint1 hindeuten, was zu einer Immuntoleranz und folglich dem Ausbleiben einer Immunantwort führen würde. Eine weitere Möglichkeit ist, dass das Protein in den untersuchten Geweben in zu geringer Menge exprimiert wird, um mittels Western-Blot detektierbar zu sein.

Mittels eines RACE-Ansatzes wurde versucht, das 5'-Ende der mRNA und damit den Anfang des Leserahmens zu identifizieren. Aus Herz- und Hirn-RNA konnten erfolgreich einige cDNA-Fragmente isoliert werden. Diese entsprachen in ihren Sequenzen dem zu Pint1 am stärksten homologen Protein AAC19158. Auch dessen N-Terminus ist nicht bekannt und war auch nicht in den mittels RACE erhaltenen Sequenzen enthalten. Daher sind noch weitere Experimente nötig, um den kompletten ORF von Pint1 zu identifizieren.

### 4.3 Das Adaptorprotein Grb2

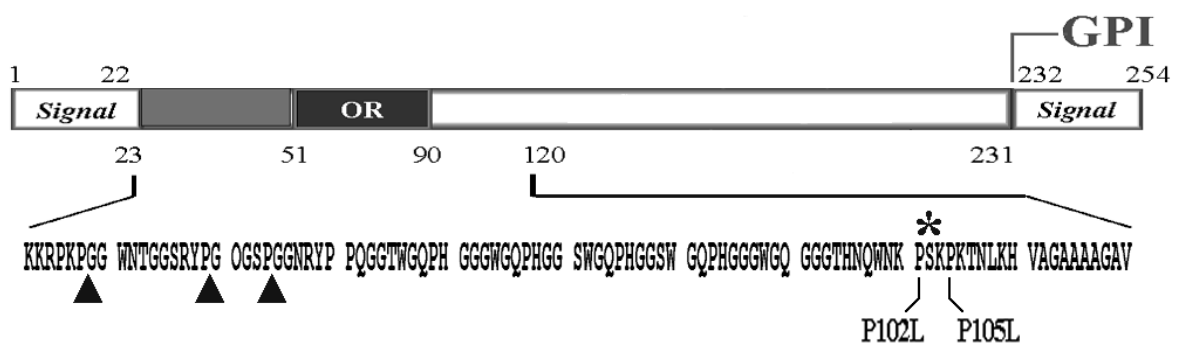
Das Adaptorprotein Grb2 wurde ursprünglich als ein Interaktor von Wachstumsfaktor-Rezeptoren identifiziert. Daher erhielt es auch den Namen „Growth-factor receptor bound Protein 2“, kurz Grb2 (Suen et al., 1993). Eine Interaktion mit dem epidermalen (EGF-Rezeptor), sowie dem neuronalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (NGF-Rezeptor) wurde nachgewiesen. Evolutiv ist das Protein hoch konserviert. Je nach Spezies wurden ihm jedoch unterschiedliche Namen gegeben. In der Ratte heißt das Protein ASH, die Abkürzung von „Abundance of Src-Homologies“ (Matuoka et al., 1992). Diese Namensgebung spielt auf die Domänenstruktur des Proteins an. Es besteht nämlich aus drei Domänen: eine zentrale SH2-Domäne (Src-Homology 2) sowie zwei N- und C-terminal flankierende SH3-Domänen. Bei

anderen Säugetieren hat sich der Name Grb2 durchgesetzt. Auch evolutiv weiter entfernte Tierarten haben ein homologes Protein. In dem Fadenwurm *C.elegans* wird es Sem-5 genannt (Clark et al., 1992), in *D. melanogaster* Drk (Simon et al., 1993).

Die verschiedenen Domänen haben unterschiedliche Funktionen. Das Protein kann über seine SH3-Domänen mit verschiedenen Oberflächenrezeptoren in Wechselwirkung treten. Dabei werden die Interaktionspartner an prolinreichen Regionen erkannt und gebunden. Zu diesen Rezeptoren gehören der epidermale und neuronale Wachstumsfaktorrezeptor (EGF/NGF-Rezeptor). Die SH2-Domäne ist für die Bindung an Tyrosin-Kinasen verantwortlich (Anderson et al., 1990). Eine wichtige bekannte Funktion von Grb2 ist die Verknüpfung des Guanin-Nucleotid Austauschfaktors Son-Of-Sevenless (SOS) von Ras mit Tyrosin-Phosphoproteinen (Lowenstein et al., 1992). Dadurch wird GTP von Ras gebunden, was zu einer Aktivierung der Mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK) und anderen Signaltransduktionskaskaden führt (Baltensperger et al., 1993).

Obwohl Grb2 keine intrinsische enzymatische Funktion besitzt, ist es offenbar essentiell für Säugetierzellen. Grb2-Knockout-Mäuse entwickeln sich nicht bis zur Geburt, sondern sterben schon in einer frühen Embryonalphase ab (Cheng et al., 1998). Punktmutationen in Grb2 wurden ebenfalls beschrieben und wirken sich transdominant negativ auf Signalwege aus, welche Rezeptor-Tyrosinkinasen beinhalten (Gishizky et al., 1995).

Die klassische Erkennungssequenz von SH3-Domänen ist das prolinreiche Epitop xPxxP (Pawson, 1995). Dieses Minimalmotiv ist in PrP ein einziges Mal bei Aminosäure 102-105 enthalten und in allen bekannten Spezies konserviert (Wopfner et al., 1999).



**Abbildung 40:** schematische Darstellung der Sequenz von PrP<sup>C</sup> der Maus. Die Aminosäuren des N-Terminus sind detailliert dargestellt. Die zur Ausbildung einer PP(II)-Helix nötigen xPG-Motive sind mit Pfeilen markiert. Die SH3-Erkennungssequenz xPxxP ist mit einem Stern (\*) versehen. P102L und P105L sind autosomal dominant vererbte pathogene Mutationen.

Bei zwei autosomal dominant vererbten Formen des humanen Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndroms ist dieses Motiv zerstört (Kitamoto et al., 1986). Diese pathogenen Mutationen führen beide zu einem Aminosäureaustausch von Prolin zu Leucin (P102L bzw. P105L). Mäuse, denen die Prion-Mutation P102L eingeführt wurde, zeigen mit zunehmendem Alter neurodegenerative Veränderungen (Hsiao et al., 1994) (Telling et al., 1996), die auf transgene Mäuse mit derselben Mutation übertragen werden können. Es gelingt aber nur sehr ineffizient, diese GSS-Form auf gesunde Tiere ohne die Mutation zu übertragen. Im Gegensatz zu den meisten anderen TSE-Formen ist kaum PK-resistentes PrP nachweisbar. Demnach könnte es sich bei dieser Manifestation von TSEs um eine Mutation handeln, die zu einem Verlust einer essentiellen PrP-Funktion führt, z.B. die Bindung an ein weiteres Protein. Die Ursache für die Symptome könnte demnach ein „Loss of Function“ sein, im Gegensatz zu einer „Loss of Structure“, die bei anderen Varianten von Prion-Krankheiten zu unlöslichen PrP-Aggregaten führt. Eine einfache Erklärung für die pathogenen Symptome wäre eine durch die Mutation erniedrigte Stabilität von PrP, was zu einem schnelleren Abbau oder zu einer Aggregation des mutierten Prion-Proteins führen würde. Dies scheint aber bei den untersuchten GSS-Mutationen nicht vorzuliegen, da kein thermodynamisch messbarer Strukturunterschied zwischen den rekombinant exprimierten PrP-Mutanten und dem ebenso erzeugten Wildtyp-PrP vorliegt (Swietnicki et al., 1998). Eine mögliche „Loss of Function“ im Sinne eines Verlustes einer PrP-Bindung an Grb2 wurde von uns mittels Co-Immunpräzipitation getestet. Weder die P102L, noch die P105L-Mutation führte in dem von uns verwendeten System zu einer beeinträchtigten Interaktion mit Grb2. Dies läßt mehrere Schlüsse zu:

1. Die Interaktion zwischen Grb2 und PrP 90-231 verläuft nicht über das klassische SH3-Erkennungsmotiv xPxxP. Dies ist auch schon bei anderen Grb2-Bindungspartnern beobachtet worden. So fehlt z.B. dem Protein Gab1 ein solches Motiv, es wird aber trotzdem von Grb2 erkannt (Lock et al., 2000).
2. Da die pathogenen GSS-Mutationen P102L und P105L im Prion-Protein nicht zu einem Bindungsverlust mit Grb2 führen, ist es unwahrscheinlich, dass die Symptome der Krankheit durch eine beeinflusste Interaktion zwischen PrP und Grb2 hervorgerufen werden.

Es ist aber durchaus möglich, dass diese Mutationen von PrP<sup>C</sup> zu einem Bindungsverlust mit anderen, noch nicht identifizierten SH3-haltigen Proteinen führen. Diese Fehlfunktion könnte dann für die Pathogenese von GSS verantwortlich sein.

Die Region zwischen AS 92 und 109 des Prion-Proteins, in der sich das xPxxP-Motiv befindet, scheint auch für die Empfänglichkeit gegenüber Scrapie eine wichtige Rolle zu spielen. Transgene Mäuse, die ein N-terminal deletiertes Prionkonstrukt ohne die Aminosäuren 23-92 exprimieren, sind noch infizierbar, wohingegen Mäuse mit einer längeren PrP-Deletion bis AS 109 gesund bleiben (Fischer et al., 1996).

#### 4.3.1 Eine PP-II-Helix im N-Terminus von PrP ist ein potentielles Bindeepitop für Grb2

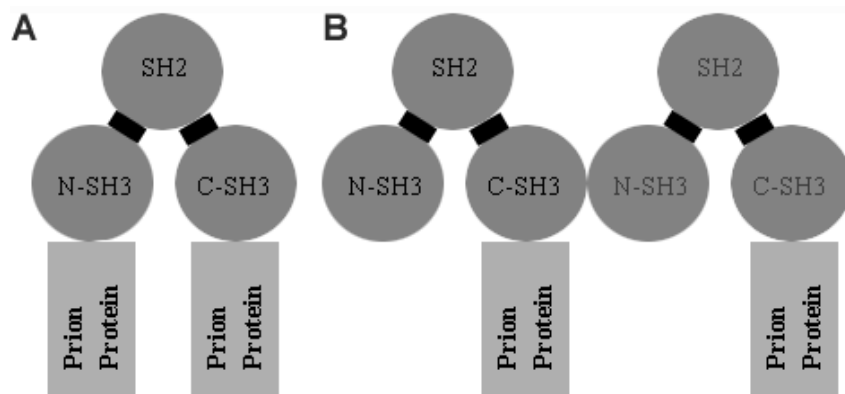
Neben einer Bindungsstelle im C-terminalen Bereich von PrP ab AS 90 gibt es offensichtlich zusätzlich noch ein N-terminal vorhandenes Motiv, das von Grb2 erkannt wird. Dies läßt sich aus der beobachteten Copräzipitation mit PrP 23-100 ableiten.

Ein mögliches Erkennungsepitop könnte darin eine Polyprolin-Typ-II-Helix (PPII-Helix) sein. Diese wurde als ein bevorzugtes Bindemotiv von SH3-Domänen beschrieben (Feng et al., 1994). Tatsächlich erfüllt das Prion-Protein die Voraussetzung für die Ausbildung solch einer Helix, da die nötige Minimalsequenz xPG mehrfach vorhanden ist. Die Sequenz xPG ist insgesamt drei mal ausschließlich im N-Terminus von PrP zu finden (Abbildung 40) und ist wie das xPxxP-Motiv in allen Spezies an allen drei Positionen konserviert.

Die Existenz einer PPII-Helix im vorhergesagten Bereich des Prion-Proteins konnte kürzlich auch *in vivo* nachgewiesen werden (Gill et al., 2000). Solch eine Polypeptidkonformation ist auch für nicht SH3-enthaltende Proteine ein bevorzugtes Motiv für Erkennung und Bindung (Siligardi und Drake, 1995) und könnte für die beobachtete Interaktion von PrP 23-100 mit Grb2 verantwortlich sein. PPII-Helices können selbst auch an der Ausbildung von Amyloid beteiligt sein, was bei kristallografischen Untersuchungen von humanem Lysozym festgestellt wurde, welches ebenfalls diese Konformation annehmen kann (Blanch et al., 2000). Möglicherweise ist daher die PPII-Helix von PrP auch mitverantwortlich für das Auftreten der charakteristischen Amyloidablagerungen in TSE-betroffenem Hirngewebe. Diese sind nicht nur bei Prionkrankheiten beobachtbar, sondern auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen. Dazu gehören die A $\beta$ -Fibrillen bei Alzheimer,  $\alpha$ -Synuclein bei Parkinson, aber auch Polyglutaminproteine wie das Huntingtin. Diese Erkrankungen werden mittlerweile zu den „Conformational diseases“ zusammengefaßt und haben gemeinsam, dass ein Protein eine Konversion seiner Struktur von  $\alpha$ -helikalen oder flexiblen Anteilen zu  $\beta$ -Faltblättern vollzieht, was zu unlöslichen Ablagerungen führt (Carrell und Lomas, 1997). Bei allen diesen Formen ist noch immer nicht klar, ob die Ablagerungen die Ursache oder ein Symptom der Krankheiten sind. Bemerkenswert ist, dass bei Prion-Erkrankungen der N-terminale Anteil von PrP, der auch die putativen PPII-Helices enthält, nicht für die Übertragbarkeit der Krankheit notwendig ist, da ein mittels Proteinase K trankiertes PrP<sup>Sc</sup> infektiös bleibt. Ein hoher Anteil an PrP<sup>Sc</sup>-Molekülen besitzt allerdings durchaus auch im aggregierten Zustand noch den vollständigen N-Terminus.

#### 4.3.2 Grb2 ist ein möglicher PrP-Dimerisierer

Prinzipiell hat Grb2 die Fähigkeit an zwei PrP-Proteine zu binden (je eines mit seinen beiden SH3-Domänen). Dies ist experimentell noch nicht bewiesen, aber wahrscheinlich. Diese Eigenschaft würde Grb2 dazu befähigen, als Dimerisierer zweier PrP-Moleküle zu fungieren. Von einigen Gruppen wird postuliert, dass PrP<sup>C</sup> in seiner funktionellen Form als Dimer vorliegt (Priola et al., 1995; Knaus et al., 2001). Für rekombinant exprimiertes PrP konnte dies nicht gezeigt werden, sondern es deutet alles auf monomeres PrP hin (Mehlhorn et al., 1996). *In situ*-Untersuchungen an Hirnmaterial von Rindern zeigten allerdings ein Monomer-Dimer-Äquilibrium von PrP<sup>C</sup> (Meyer et al., 2000). Daher scheint ein zusätzlicher zellulärer Faktor für eine Dimerbildung von PrP nötig zu sein. Als „bivalenter“ Adaptor erfüllt Grb2 die idealen Voraussetzungen dafür. Grb2 wurde selbst ebenfalls als Dimer kristallisiert (Maignan et al., 1995). Daher könnte auch noch bei einer Bindung von nur einem PrP pro Grb2 eine Brückenbildung über zwei Grb2-Moleküle ablaufen (Abbildung 42). Ob tatsächlich ein PrP-Dimer bzw. ein Heteromultimer mit Grb2 oder anderen Proteinen *in vivo* vorliegt, könnte durch Crosslinking-Experimente erforscht werden.



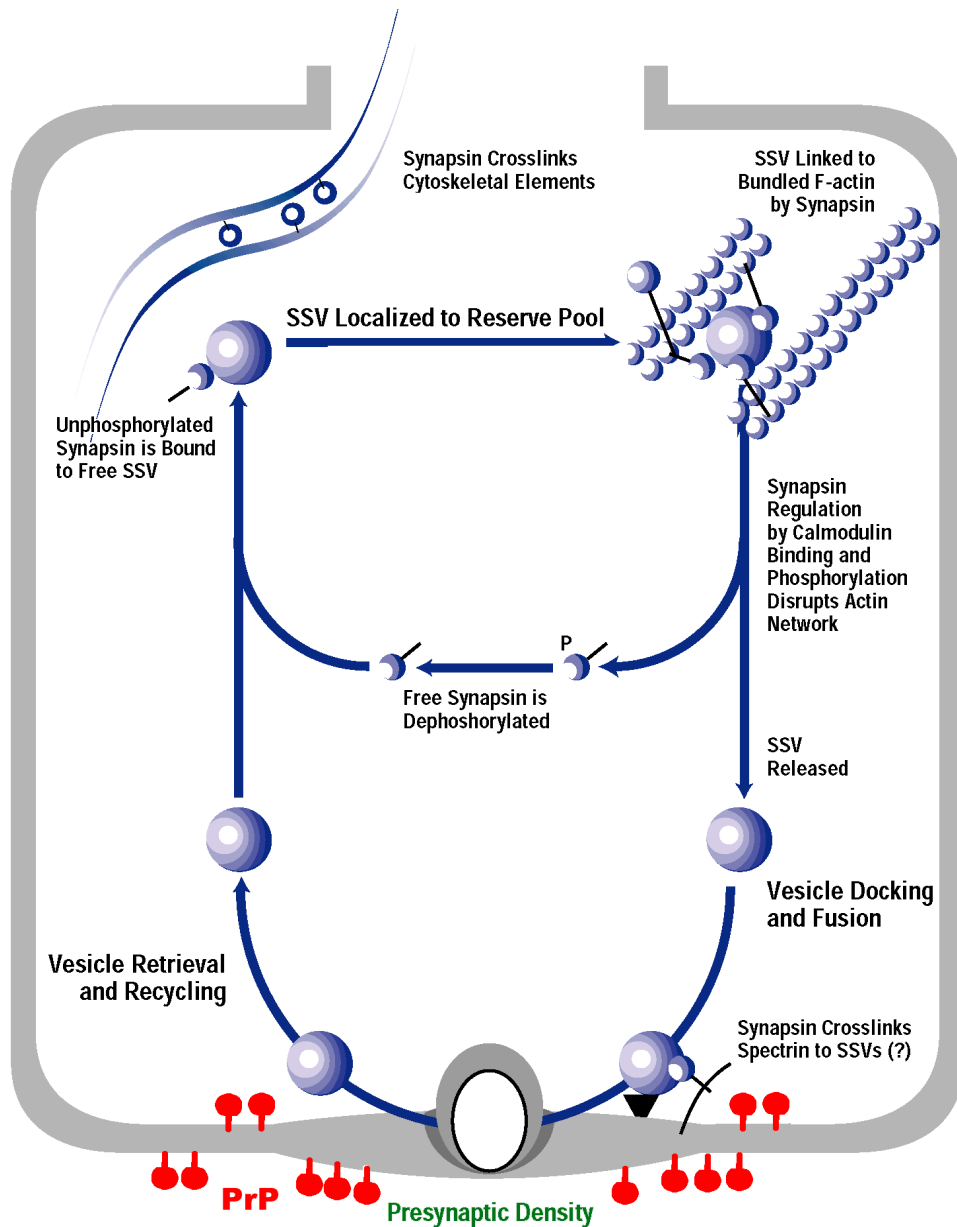
**Abbildung 42:** zwei hypothetische Modelle einer Dimerisierung von PrP über Grb2; **A)** ein Grb2-Molekül kann über seine N- und C-terminalen SH3-Domänen direkt an zwei PrP binden; **B)** nur die C-terminale Domäne von Grb2 bindet an PrP, die Dimerisierung erfolgt über zwei Grb2-Moleküle.

#### 4.4 Synapsin I

Zur Zeit sind drei Unterfamilien von Synapsin bekannt, die wiederum je zwei alternativ gespleißte Formen bilden können (Kao et al., 1999). Die resultierenden Proteine heißen dementsprechend Synapsin I a/b, II a/b und III a/b. Der isolierte PrP-Interaktor entspricht dem C-terminalen Anteil von Synapsin Ib. Ob PrP<sup>C</sup> mit anderen Mitgliedern der Synapsin-Familie ebenfalls einen Komplex bildet, ist noch nicht untersucht worden.

Das Protein Synapsin I liegt neuronal hochkonzentriert an Synapsen, genauer an synaptischen Vesikeln vor (Navone et al., 1984). Man geht davon aus, dass Synapsin bei der Regulierung des exocytotischen Vesikelvorrats eine wichtige Rolle spielt (De Camilli et al., 1990) (Abbildung 43). Synapsin ist in der Lage, gleichzeitig an Cytoskelettbestandteile (Aktin) und an Vesikel zu binden. Dadurch werden diese verankert und zugleich immobilisiert, was eine spontane Verschmelzung mit der präsynaptischen Membran verhindert. Wenn ein Aktionspotential die Synapse erreicht, führt dies zu einem intrazellulären Anstieg von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, was wiederum Calcium-abhängige Kinasen aktiviert. Außer der Calcium/Calmodulin-abhängigen Kinase I und Proteinkinase A (PKA), ist Synapsin I Substrat für die Calcium/Calmodulin Kinase II, die ebenfalls mit synaptischen Vesikeln assoziiert ist (Greengard et al., 1993). Diese Kinasen können Synapsin I phosphorylieren, wodurch die Bindungen zwischen den Vesikeln und dem Cytoskelett gelöst werden. Dadurch stehen die Vesikel für den Verschmelzungsvorgang mit der Membran bereit. Phosphoryliertes Synapsin wird wiederum dephosphoryliert und kann an recycelte Vesikel binden und diese wieder mit dem Cytoskelett verankern. Nach dem Wiederbeladen der Vesikel mit Neurotransmitter ist der Kreislauf abgeschlossen und kann von vorn beginnen.

Mittlerweile ist es gelungen, Synapsin I- und II-Knockout-Mäuse zu erzeugen, sowie einen Stamm, bei dem beide Synapsine deletiert wurden (Rosahl et al., 1995). Alle diese Mäuse sind voll lebensfähig und zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp. Auf neuronaler Ebene wurde elektrophysiologisch ein Anstieg der „paired pulse facilitation“ und der synaptischen Kurzzeitplastizität beschrieben (Hicks et al., 1997). Solche neurologischen Phänomene wurden auch in PrP-Knockout-Mäusen beobachtet (Collinge et al., 1994). Möglicherweise ist das Fehlen einer PrP-Synapsin-Interaktion in beiden Knockout-Mäusestämmen für die elektrisch meßbaren neuronalen Beeinträchtigungen verantwortlich. Der Verlust an Synapsen ist eines der frühesten Zeichen einer Prion-Infektion (Clinton et al., 1993) und tritt bereits vor der Astrocytose und Spongiose auf. Möglicherweise ist ein Bindungsverlust zwischen PrP und Synapsin für dieses Symptom verantwortlich, der durch die Veränderung der biochemischen Eigenschaften von  $\text{PrP}^{\text{C}}$  zu  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  hervorgerufen wird. Ob eine Wechselwirkung von PrP mit Synapsin auch bei der Pathogenese von Prion-Krankheiten eine Rolle spielt, soll mittels Inokulationsversuchen geklärt werden. Dabei wurden Synapsin I/II-Knockoutmäuse auf verschiedene Routen mit Prionen infiziert und der Effekt auf die Inkubationszeit und das Verhalten dieser Mäuse mit infizierten Wildtyp-Mäusen verglichen. Diese Versuche werden momentan in Zürich in der Arbeitsgruppe von A. Aguzzi durchgeführt. Falls sich ein signifikanter Effekt erkennen läßt, könnte dies zur Entwicklung von neuen Therapeutika gegen TSE-Erkrankungen führen, die Synapsin als Zielmolekül beinhalten.



**Abbildung 43:** schematische Darstellung des Kreislaufs synaptischer Vesikel unter Beteiligung von Synapsin I; PrP ist vor allem an der Plasmamembran lokalisiert, ist aber auch in bzw. an Golgi-Vesikeln nachweisbar. Kleine Synaptische Vesikel (SSV) sind eine spezialisierte Form von Golgivesikeln und deren Membran daher ebenfalls ein möglicher Ort einer PrP-Synapsin-Interaktion (modifiziert nach Greengard et al. 1993).

#### 4.5 Subzelluläre Lokalisation der PrP-Interaktoren

Die hauptsächlichliche Lokalisation von PrP<sup>C</sup> an Membranen führte zu der Annahme, dass das Prion-Protein selbst ein Rezeptor sein könnte oder eine Rolle beim Zell-Zell-Kontakt spielt (Caughey und Raymond, 1991; Borchelt et al., 1992). Bei der Analyse von subzellulären Fraktionen von menschlichem Hirngewebe aus CJD-Patienten und gesunden Personen wurde bei beiden die höchste Konzentration an PrP<sup>C</sup> in der präsynaptischen, vesikelreichen Fraktion entdeckt (Kitamoto et al., 1992). Dies ist auch die Fraktion, in der Synapsin I detektierbar ist. Die einzigen



beiden Veröffentlichung, die das Prion-Protein bislang in den Zusammenhang mit Synapsin brachten, sind immunohistologische Untersuchungen an Hirnschnitten von Creutzfeldt-Jacob-Patienten (Ferrer et al., 1999; Ferrer et al., 2000). Dort wurde beschrieben, dass eine Reduktion von Synapsin I und einiger anderer synaptischer Proteine in den Gewebeproben der CJD-Patienten beobachtbar war. Da die Proben *post mortem* erhalten wurden, kann dieser Befund aber auch auf die Degradation der untersuchten Proteine zurückzuführen sein, da gerade Synapsin dafür bekannt ist, instabil zu sein.

Die Fraktionierungsstudien in der vorliegenden Arbeit wurden nicht mit Hirngewebe durchgeführt, sondern mit kultivierten Zellen. Sie stehen jedoch im Einklang mit den bekannten Daten, die mit fraktionierten synaptischen Vesikeln erhalten wurden. Methodisch ist die Präparation von synaptischen Vesikeln prinzipiell ähnlich mit dem in dieser Arbeit verwendeten Verfahren zur Isolierung von Mikrosomen. Beide Verfahren beruhen auf einer Auftrennung der Vesikel nach deren Dichte in einem Gradienten. In der Golgi-Fraktion konnte die höchste gemeinsame intrazelluläre Konzentration aller hier untersuchten PrP-Interaktoren gezeigt werden. Da Synapsin I an dem Kreislauf von synaptischen Vesikeln beteiligt ist, ist es wahrscheinlich sowohl mit exocytotischen, als auch mit endocytotischen Vesikeln assoziiert. Dies kann durch das gewählte Präparationsverfahren nicht unterschieden werden. Die Interaktion von PrP<sup>C</sup> mit Synapsin I legt eine mögliche regulatorische Funktion von PrP<sup>C</sup> bei der Sekretion von Vesikeln mit Neurotransmitter oder anderen endokrinen Substanzen nahe.

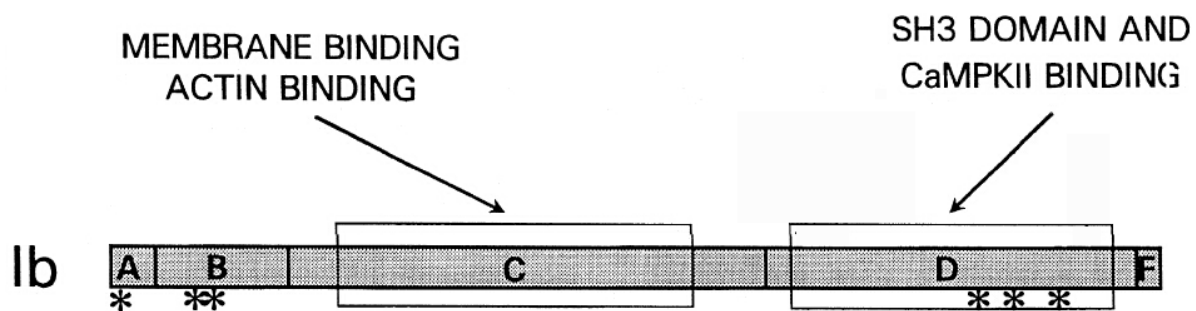
Das Vorkommen von PrP<sup>C</sup> und Synapsin I in nicht-neuronalem Gewebe wie Milz, Pankreas und Magen deutet bei beiden auf eine generalisierte Funktion hin, die nicht ausschließlich neurospezifisch ist. Möglicherweise ist PrP<sup>C</sup> im allgemeinen mit sekretorischen Vesikeln assoziiert. Diese sind nicht nur in einem synaptischen Kontext zu finden, sondern auch in anderen Geweben mit endokrinen Funktionen, wie z.B. Insulin-ausschüttende Zellen. Tatsächlich wurde von uns eine hohe Synapsin I-Menge in kultivierten Insulinomazellen detektiert. Auch andere Gruppen zeigten eine hohe Konzentration von Synapsin I in nicht-neuronalem Gewebe. Subzelluläre Untersuchungen an Leberzellen lokalisierten eine hohe Konzentration von Synapsin in Elementen des Trans-Golgi Netzwerks (Bustos et al., 2001), was ebenfalls im Einklang mit den von uns erhaltenen Fraktionierungsdaten steht, da wir die höchste Menge Synapsin ebenfalls in Golgi-Fraktionen detektieren konnten.

Die mit der Zelldichte proportional steigende Konzentration von PrP<sup>C</sup> könnte ebenfalls ein Hinweis darauf sein, dass das zelluläre Prion-Protein tatsächlich mit Vorgängen bei Zell-Zell-Wechselwirkungen zu tun hat. So könnte eine hohe Menge an PrP an der Zelloberfläche für die Aufrechterhaltung des Kontaktes zwischen den Zellen nötig sein. In neuronalen N2a-Zellen in Zellkultur ist dafür die gesamte Zelloberfläche verantwortlich, wohingegen in ausdifferenzierten Zellen eine Konzentration von PrP<sup>C</sup> in Synapsen erfolgt.

Eine mögliche Interaktion zwischen PrP und Synapsin I bzw. Grb2 nicht unbedingt an der Lipiddoppelschicht der äußeren Zellmembran stattfinden. Die Assoziation aller Proteine mit Golgi-Vesikeln legt nahe, dass auch eine intrazelluläre Interaktion an diesen Membranen stattfinden kann. Ob diese Wechselwirkungen aber auf dem exocytotischen Zweig des Golgi-/Trans-Golgi-Netzwerks oder während der Endocytose auftreten, kann mit dem gewählten Verfahren der Zellfraktionierung nicht ermittelt werden. Bei Untersuchungen zur Internalisierung des EGF-Rezeptors (einem beschriebenen Grb2-Interaktor) wurde eine Colokalisation von Grb2 sowohl mit recycelten Vesikeln, als auch mit frühen und späten Endosomen beschrieben (Burke et al., 2001). Demnach könnte Grb2 möglicherweise auch bei der Endocytose von PrP eine regulierende Funktion haben. Experimentell kann dies durch das Fehlen von Grb2-Knockout-Modellen nicht endgültig geklärt werden.

#### 4.6 Ein hypothetisches Heterotrimer aus PrP, Synapsin I und Grb2

Es ist bemerkenswert, dass die beiden PrP-Interaktoren Synapsin I und Grb2 auch direkt miteinander interagieren können (McPherson et al., 1994). Synapsin I wird von Grb2 in dessen prolinreicher D-Domäne gebunden. Dort sind mehrere xPxxP-Motive vorhanden, die als mögliche Bindungsstellen für die SH3-Domänen von Grb2 fungieren können. Nähere Untersuchungen haben aber ergeben, dass die Interaktion hochspezifisch ist und nur wenige dieser Motive tatsächlich von Grb2 erkannt werden (Vaccaro et al., 1997) (Abbildung 44).



**Abbildung 44:** die Grb2-Bindestellen von Synapsin Ib wurden mittels inhibitorischer Antikörper kartiert und liegen innerhalb der D-Domäne. Bekannte Phosphorylierungsstellen von Synapsin Ib sind mit (\*) gekennzeichnet (modifiziert nach Vaccaro et al., 1997).

Weitere Experimente zeigten, dass die Bindung zu Synapsin I ausschließlich über die N-terminale SH3-Domäne von Grb2 vermittelt wird. Die C-terminale SH3-Domäne von Grb2 zeigt keine Affinität zu Synapsin I (Onofri et al., 2000).

Die D- und F-Domäne von Synapsin Ib wurde von uns durch den Yeast-Two-Hybrid-Assay auch als interagierender Bereich von PrP identifiziert. Es ist noch nicht genau geklärt, welches Epitop innerhalb dieser Region von Synapsin Ib für die Bindung verantwortlich ist. Wir konnten

zeigen, dass das Prion-Protein sowohl mit seinem N- als auch C-Terminus an Synapsin I bzw. Grb2 binden kann. Da die C-terminale SH3-Domäne von Grb2 mit PrP interagiert, blockieren sich die beiden SH3-Domänen innerhalb von Grb2 bei einer potentiellen Bildung eines Trimers nicht, da keine Affinität dieses Bereichs zu Synapsin besteht. Im Falle von PrP liegt wahrscheinlich ebenfalls keine Blockierung der Bindungs epitope vor. Es wäre also durchaus möglich, dass die drei Proteine zumindest temporär einen heterotrimeren Komplex bilden können. Welche Funktion solch ein Proteinkomplex hat, ist spekulativ. Da alle drei Proteine mit Membranen assoziiert sind, könnte eine Beteiligung am „Trafficking“ von Vesikeln oder der Regulation von Membranfusionen vorliegen.

### 4.7 Das Löslichkeitsverhalten von Synapsin I und Grb2

Ein charakteristisches Merkmal von PrP<sup>Sc</sup> ist dessen Unlöslichkeit in nichtionischen Detergenzien. *In situ* lassen sich in Gehirnen von Prion-erkrankten Individuen charakteristische unlösliche Amyloid-Ablagerungen nachweisen, die zum größten Teil aus PrP<sup>Sc</sup> bestehen. In Zellkultur ist unlösliches PrP<sup>Sc</sup> in infizierten Zellen ebenfalls nachweisbar. Nicht auszuschließen ist, dass in geringerem Ausmaß auch andere Proteine in diesen Ablagerungen enthalten sind. Gerade SH3-Domänen sind *per se* ebenfalls in der Lage, in saurem Milieu Amyloidfibrillen auszubilden (Guijarro et al., 1998). Da Grb2 zwei dieser Domänen besitzt, könnte das Protein möglicherweise auch in dem unlöslichen Aggregat vorhanden sein, das in Prion-infizierten Zellen als detergens-unlösliches Pellet und im Hirn betroffener Individuen als Amyloidablagerung auftritt. Eine Untersuchung der ultrazentrifugierten Proteinpellets von prion-infizierten und nicht infizierten neuronalen N2a-Zellen ergab jedoch, dass kein Grb2 in der unlöslichen Fraktion nachweisbar ist. Daher scheint zumindest in Zellkultur die Beteiligung von Grb2 an den PrP<sup>Sc</sup>-Aggregaten nicht gegeben zu sein. Auch Synapsin I war in keinem Fall in der unlöslichen Fraktion zu finden, was für dieses Protein eine Copräzipitatbildung mit den PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen ebenfalls ausschließt. Ob dies auch bei histologischen Präparaten wie Hirnschnitten der Fall ist, ist noch nicht untersucht worden.

### 4.8 Interaktionstests von PrP und der PrP-Interaktoren mit anderen Proteinen

Die beiden in dieser Arbeit verwendeten Systeme zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen sind nicht nur zur Suche und Identifizierung von unbekanntem Interaktoren in großem Maßstab nützlich. Auch zwei bekannte Proteinkomponenten können direkt auf eine mögliche Wechselwirkung miteinander getestet werden. Dieses Vorgehen wurde gewählt, um eine mögliche Interaktion von Doppel mit PrP und den isolierten PrP-Interaktoren zu untersuchen. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit war es nicht ausgeschlossen, dass Doppel

und PrP teilweise an identische Liganden binden. Dadurch ließen sich auch einige pathologische Phänomene erklären, die in den Doppel-überexprimierenden PrP-Knockout-Mäusestämmen beobachtet wurden. Diese Symptome konnten durch Einführung eines PrP-Allels unterdrückt werden, so dass ein direkter Zusammenhang zwischen Pathogenese und Doppel- bzw. PrP-Expression besteht (Moore et al., 2001). Die Autoren vermuteten eine unmittelbare Interaktion der beiden Proteine. Eine Wechselwirkung zwischen PrP und Doppel konnte in den von uns verwendeten experimentellen Ansätzen allerdings nicht nachgewiesen werden. Eine Interaktion von Doppel mit Synapsin/Pint1/Grb2 war ebenfalls nicht beobachtbar, somit scheinen zumindest diese drei Proteine nicht zu den postulierten gemeinsamen Doppel/PrP-Interaktoren zu gehören.

Welchen Pathogenitätsmechanismus die Expression von Doppel im Hirn induziert, ist nicht bekannt, scheint aber nicht mit den untersuchten PrP-Interaktoren zusammenzuhängen. Damit ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass gemeinsame Interaktionen von PrP und Dpl mit noch nicht identifizierten Proteinen auftreten.

Es wird davon ausgegangen, dass PrP<sup>C</sup> an der Zelloberfläche in Caveolae-ähnlichen Domänen lokalisiert ist. Den strukturgebenden Proteinbestandteil dieser Organellen bilden Caveoline. Caveolin-1 $\beta$  wurde von einer französischen Arbeitsgruppe als Copräzipitat von PrP<sup>C</sup> in neuronalen 1C11-Zellen beschrieben (Mouillet-Richard et al., 2000). Dieses Protein wurde mittels N-terminaler Sequenzierung der Präzipitatbande identifiziert. Die Gruppe von R. Gabizon untersuchte hingegen an murinem Hirn gezielt mittels unterschiedlicher Detergenzien das Copräzipitationsverhalten von ausgesuchten neuronalen Proteinen mit PrP<sup>C</sup> (Keshet et al., 2000). Dazu gehörte unter anderem Caveolin-1 und Synaptophysin. Bei keiner der verwendeten Präzipitationsmethoden war Caveolin-1 zusammen mit PrP<sup>C</sup> im Copräzipitat nachweisbar, was im krassen Widerspruch zu der vorangegangenen Publikation steht.

Mittels eines Yeast-Two-Hybrid-Assays wurde von uns ebenfalls eine Interaktion zwischen PrP 23-231 und Caveolinen untersucht. Wir konnten ebenfalls keine meßbare Wechselwirkung zwischen PrP und Caveolinen beobachten. Daraus lässt sich folgern, dass PrP<sup>C</sup> zwar wie Caveolin in cholesterinreichen und detergens-unlöslichen Membranfraktionen enthalten ist, aber Caveolin nur sekundär als Strukturprotein mit diesen Membranen assoziiert. Offenbar liegt lediglich eine Colokalisierung von PrP<sup>C</sup> mit Caveolin in Caveolin-exprimierenden Zellen vor, aber keine direkte Bindung. Nur unter geeigneten Bedingungen präzipitieren beide in derselben Membranfraktionen. Die Oberflächenexpression von PrP ist ebenfalls nicht auf das Vorhandensein von Caveolin angewiesen, da dies z.B. in den oft verwendeten neuronalen N2a-Zellen nicht nachweisbar ist (Shyng et al., 1994). Da diese Zellen zudem sehr gut persistent mit Prionen infizierbar sind, hat Caveolin auch darauf keinen direkten Einfluß. In Zellen, die kein Caveolin exprimieren, bleiben diese spezialisierten Membranbereiche als Lipid-„Rafts“ (= engl.

Flöße) an der Zelloberfläche. In diesen Rafts sind GPI-verankerte Proteine konzentriert, zu denen neben PrP<sup>C</sup> auch z.B. Thy-1 gehört. Rafts sind auch der Ort, an dem Transmembranrezeptoren wie der EGF- und NGF-Rezeptor angereichert sind. Man vermutet, dass Rafts speziell zur Konzentrierung von Signaltransduktionsproteinen dienen. Damit assoziiert finden sich daher in Cofraktionierungsstudien viele intrazelluläre Kinasen, unter anderem Fyn (Cheng et al., 1988), aber auch Adaptorproteine wie Grb2 (Wu et al., 1997). Auch das Prion-Protein ist darin in derselben Fraktion wie Fyn nachweisbar (Gorodinsky und Harris, 1995). Extrazelluläre Signale, die mittels eines membranständigen Rezeptors empfangen werden, werden offenbar in/an Rafts an intrazelluläre Signalkaskaden weitergeleitet, deren Komponenten an der cytosolischen Seite der Rafts vorliegen. Die Weiterleitung geschieht vor allem über Phosphorylierungen. Eine Beteiligung von PrP<sup>C</sup> an Phosphorylierungsvorgängen bzw. Signaltransduktion wurde indirekt in differenzierten 1C11-Zellen gezeigt. Ein „Crosslinking“ von PrP<sup>C</sup> an der Zelloberfläche mittels spezifischer PrP-Antikörper führte intrazellulär zu einer Phosphorylierung der Kinase Fyn. In anders differenzierten Zellen des gleichen Typs, welche kein PrP exprimierten, erfolgte unter identischen Bedingungen keine Aktivierung von Fyn. Für rekombinantes PrP wurde *in vitro* eine Phosphorylierung durch Casein-Kinase II und einige andere Kinasen beschrieben (Negro et al., 2000). Ob PrP auch *in vivo* ein Phosphoprotein ist, konnte bislang aber nicht gezeigt werden. Wir konnten zeigen, dass PrP<sup>C</sup> mit Phosphoproteinen (Synapsin Ib) bzw. Proteinen, die in Phosphorylierungskaskaden involviert sind (Grb2) direkt interagiert. Dies unterstreicht eine mögliche Beteiligung des Prion-Proteins an solchen Signaltransduktionswegen. Dazu muß PrP nicht unbedingt selbst phosphoryliert werden. Generell ist die Signaltransduktion von GPI-verankerten Proteinen wie PrP, aber z.B. auch Thy-1, von der äußeren zur inneren Zellmembran noch nicht aufgeklärt. Meist werden Proteine mit transmembranen Domänen als Adaptoren postuliert, die das Signal nach innen weiterleiten. Das Auftreten von verschiedenen Transmembrantopologien des Prion-Proteins ist allerdings eine gute Erklärung für eine Kontaktaufnahme mit intrazellulären Liganden ohne Beteiligung eines dritten Proteins. Möglicherweise stehen die Transmembranformen von PrP in einem thermodynamischen Gleichgewicht zueinander bzw. zur gänzlich extrazellulären Form, so dass ein Signal oder Ligand durch die Zellmembran hindurchgeschleust werden kann.

### 5 Zusammenfassung

Das Prion-Protein ist in seiner infektiösen Form für das Auftreten und die Übertragung von transmissiblen spongiformen Enzephalopathien verantwortlich. Diese Erkrankungen können bei Mensch und Tier auftreten, wobei die bekannteste tierische Form der „Rinderwahn“ bzw. BSE ist. Die häufigste Prion-Krankheit beim Menschen ist die Creutzfeldt-Jacob-Krankheit, deren neue Variante im Zusammenhang mit dem Auftreten von BSE steht.

Die pathologische Form des Prion-Proteins ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) wird durch posttranslationale Umwandlung aus der apathogenen physiologischen Isoform  $\text{PrP}^{\text{C}}$  gebildet. Dieses Protein wird vor allem in neuronalem Gewebe exprimiert und ist in allen Säugetieren hoch konserviert. Die Funktion des zellulären, apathogenen Prion-Proteins ist noch immer nicht geklärt, da Mäuse ohne dieses Protein gesund sind und keinen pathologischen Phänotyp haben. Daher müssen alternative experimentelle Ansätze unternommen werden, um zur Klärung der physiologischen Funktion beizutragen. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb mittels eines „Yeast-Two-Hybrid“-Screens nach Interaktoren des zellulären Prion-Proteins der Maus gesucht, welche in murinem Gehirn exprimiert werden.

Es konnten in Hefe erfolgreich mehrere Proteine identifiziert werden, die bislang noch nicht als mögliche Interaktoren des zellulären Prion-Proteins beschrieben worden waren.

Drei dieser Isolate wurden ausgesucht, um deren physiologische Interaktion mit  $\text{PrP}^{\text{C}}$  näher zu charakterisieren: Pint1, Synapsin Ib und Grb2.

Mittels Copräzipitation konnte bestätigt werden, dass auch in Säugetierzellen eine physiologische Wechselwirkung zwischen den identifizierten Interaktoren und  $\text{PrP}^{\text{C}}$  auftritt.

Das Protein Pint1 wurde bislang noch nicht beschrieben und besitzt eine hoch konservierte Aminosäureregion, die in Proteinfragmenten vom Menschen bis zum Wurm *C. elegans* zu finden ist. Die beiden anderen untersuchten Proteine sind beide an verschiedenen Wegen der zellulären Signaltransduktion beteiligt.

Synapsin Ib ist mit synaptischen Vesikeln assoziiert, womit eine mögliche Verbindung zwischen der zellulären Funktion von  $\text{PrP}^{\text{C}}$  und extrazellulären bzw. endokrinen Signalwegen besteht.

Grb2 ist ein Adaptorprotein mit vielfältigen Aufgaben, vor allem der Kopplung von Membranrezeptoren mit intrazellulären Signalkaskaden.

Durch den Nachweis einer Interaktion dieser beiden Proteine mit dem zellulären Prion-Protein konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals ein physiologischer Zusammenhang zwischen  $\text{PrP}^{\text{C}}$  und intrazellulären Signaltransduktionswegen gezeigt werden.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
AS	Aminosäure
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
$\beta$ -Gal	Beta-Galaktosidase
CD	Cirkulardichroismus
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	„fetal calf serum“ (Fötale Kälberserum)
FFI	Fatale Familiäre Insomnie
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GSS	Gerstmann-Sträußler-Scheinker-Syndrom
His	Histidin
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
Leu	Leucin
mAb	monoklonaler Antikörper
m.o.i.	„multiplicity of infection“
MEM	Minimal Essential Medium
NMR	Kernresonanz
OD	Optische Dichte
ORF	„open reading frame“ (Offener Leserahmen)
pAb	polyklonaler Antikörper
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerasekettenreaktion)
PrP	Prion-Protein
PrP <sup>C</sup>	Zelluläre, apathogene Form des Prion-Proteins
PrP <sup>Sc</sup>	pathogene Form des Prion-Proteins
PrP <sup>RES</sup>	Proteinase K-resistente Form von PrP
PK	Proteinase K
RACE	„rapid amplification of cDNA ends“
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Trp	Tryptophan
upm	Umdrehungen pro Minute
wt	wildtyp

## 7 Literatur

- Alper,T., Cramp,W.A., Haig,D.A., und Clarke,M.C. (1967). Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* 20;214, 764-766.
- Altschul,S.F., Madden,T.L., Schaffer,A.A., Zhang,J., Zhang,Z., Miller,W., und Lipman,D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- Anderson,D., Koch,C.A., Grey,L., Ellis,C., Moran,M.F., und Pawson,T. (1990). Binding of SH2 domains of phospholipase C gamma 1, GAP, and Src to activated growth factor receptors. *Science* 250, 979-982.
- Askanas,V., Bilak,M., Engel,W.K., Leclerc,A., und Tome,F. (1993). Prion protein is strongly immunolocalized at the postsynaptic domain of human normal neuromuscular junctions. *Neurosci. Lett.* 159, 111-114.
- Baltensperger,K., Kozma,L.M., Cherniack,A.D., Klarlund,J.K., Chawla,A., Banerjee,U., und Czech,M.P. (1993). Binding of the Ras activator son of sevenless to insulin receptor substrate-1 signaling complexes. *Science* 260, 1950-1952.
- Basler,K., Oesch,B., Scott,M., Westaway,D., Walchli,M., Groth,D.F., McKinley,M.P., Prusiner,S.B., und Weissmann,C. (1986). Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46, 417-428.
- Behrens,A., Brandner,S., Genoud,N., und Aguzzi,A. (2001). Normal neurogenesis and scrapie pathogenesis in neural grafts lacking the prion protein homologue Doppel. *EMBO Rep.* 2, 347-352.
- Blanch,E.W., Morozova-Roche,L.A., Cochran,D.A., Doig,A.J., Hecht,L., und Barron,L.D. (2000). Is polyproline II helix the killer conformation? A Raman optical activity study of the amyloidogenic prefibrillar intermediate of human lysozyme. *J. Mol. Biol.* 301, 553-563.
- Bolton,D.C., Meyer,R.K., und Prusiner,S.B. (1985). Scrapie PrP 27-30 is a sialoglycoprotein. *J. Virol.* 53, 596-606.
- Borchelt,D.R., Koliatsos,V.E., Guarnieri,M., Pardo,C.A., Sisodia,S.S., und Price,D.L. (1994). Rapid anterograde axonal transport of the cellular prion glycoprotein in the peripheral and central nervous systems. *J. Biol. Chem.* 20;269, 14711-14714.
- Borchelt,D.R., Taraboulos,A., und Prusiner,S.B. (1992). Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* 267, 16188-16199.
- Brandner,S., Isenmann,S., Raeber,A., Fischer,M., Sailer,A., Kobayashi,Y., Marino,S., Weissmann,C., und Aguzzi,A. (1996). Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* 379, 339-343.



- Brown,D.R., Qin,K., Herms,J.W., Madlung,A., Manson,J., Strome,R., Fraser,P.E., Kruck,T., von Bohlen,A., Schulz-Schaeffer,W., Giese,A., Westaway,D., und Kretzschmar,H. (1997a). The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* *390*, 684-687.
- Brown,D.R., Schulz-Schaeffer,W.J., Schmidt,B., und Kretzschmar,H.A. (1997b). Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp. Neurol.* *146*, 104-112.
- Bueler,H., Aguzzi,A., Sailer,A., Greiner,R.A., Autenried,P., Aguet,M., und Weissmann,C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* *73*, 1339-1347.
- Bueler,H., Fischer,M., Lang,Y., Bluethmann,H., Lipp,H.P., DeArmond,S.J., Prusiner,S.B., Aguet,M., und Weissmann,C. (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* *356*, 577-582.
- Burke,P., Schooler,K., und Wiley,H.S. (2001). Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by endocytosis and intracellular trafficking. *Mol. Biol. Cell* *12*, 1897-1910.
- Bustos,R., Kolen,E.R., Braiterman,L., Baines,A.J., Gorelick,F.S., und Hubbard,A.L. (2001). Synapsin I is expressed in epithelial cells: localization to a unique trans-Golgi compartment. *J. Cell Sci.* *114*, 3695-3704.
- Butler,D.A., Scott,M.R., Bockman,J.M., Borchelt,D.R., Taraboulos,A., Hsiao,K.K., Kingsbury,D.T., und Prusiner,S.B. (1988). Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins. *J. Virol.* *62*, 1558-1564.
- Carrell,R.W. und Lomas,D.A. (1997). Conformational disease. *Lancet* *350*, 134-138.
- Caughey,B. und Raymond,G.J. (1991). The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J. Biol. Chem.* *266*, 18217-18223.
- Caughey,B.W., Dong,A., Bhat,K.S., Ernst,D., Hayes,S.F., und Caughey,W.S. (1991). Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry* *30*, 7672-7680.
- Cereghetti,G.M., Schweiger,A., Glockshuber,R., und Van Doorslaer,S. (2001). Electron paramagnetic resonance evidence for binding of Cu(2+) to the c-terminal domain of the murine prion protein. *Biophys. J.* *81*, 516-525.
- Chan,K. und Kan,Y.W. (1999). Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *96*, 12731-12736.
- Cheng,A.M., Saxton,T.M., Sakai,R., Kulkarni,S., Mbamalu,G., Vogel,W., Tortorice,C.G., Cardiff,R.D., Cross,J.C., Muller,W.J., und Pawson,T. (1998). Mammalian Grb2 regulates multiple steps in embryonic development and malignant transformation. *Cell* *95*, 793-803.
- Cheng,S.H., Harvey,R., Espino,P.C., Semba,K., Yamamoto,T., Toyoshima,K., und Smith,A.E. (1988). Peptide antibodies to the human c-fyn gene product demonstrate pp59c-fyn is

- capable of complex formation with the middle-T antigen of polyomavirus. *EMBO J.* 7, 3845-3855.
- Clark,S.G., Stern,M.J., und Horvitz,H.R. (1992). *C. elegans* cell-signalling gene *sem-5* encodes a protein with SH2 and SH3 domains. *Nature* 356, 340-344.
- Clinton,J., Forsyth,C., Royston,M.C., und Roberts,G.W. (1993). Synaptic degeneration is the primary neuropathological feature in prion disease: a preliminary study. *Neuroreport* 4, 65-68.
- Cohen,F.E. (1999). Protein misfolding and prion diseases. *J. Mol. Biol.* 293, 313-320.
- Colling,S.B., Collinge,J., und Jefferys,J.G. (1996). Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> currents. *Neurosci. Lett.* 209, 49-52.
- Collinge,J., Sidle,K.C., Meads,J., Ironside,J., und Hill,A.F. (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 383, 685-690.
- Collinge,J., Whittington,M.A., Sidle,K.C., Smith,C.J., Palmer,M.S., Clarke,A.R., und Jefferys,J.G. (1994). Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 370, 295-297.
- Couet,J., Li,S., Okamoto,T., Ikezu,T., und Lisanti,M.P. (1997). Identification of peptide and protein ligands for the caveolin- scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J. Biol. Chem.* 272, 6525-6533.
- Creutzfeldt,H.-G. (1920). Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z. Gesamte Neurol. Psychiatr.* 57, 1-18.
- De Camilli,P., Benfenati,F., Valtorta,F., und Greengard,P. (1990). The synapsins. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6, 433-460.
- Denning,C., Burl,S., Ainslie,A., und Clark,A.J. (2001). Deletion of the alpha(1,3)galactosyl transferase (GGTA1) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep. *Nat. Biotechnol.* 19, 559-562.
- Dickinson,A.G., Meikle,V.M., und Fraser,H. (1968). Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice. *J. Comp Pathol.* 78, 293-299.
- Donne,D.G., Viles,J.H., Groth,D., Mehlhorn,I., James,T.L., Cohen,F.E., Prusiner,S.B., Wright,P.E., und Dyson,H.J. (1997). Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 13452-13457.
- Duffy,P., Wolf,J., Collins,G., DeVoe,A.G., Streeten,B., und Cowen,D. (1974). Letter: Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *N. Engl. J. Med.* 290, 692-693.
- Edenhofer,F., Rieger,R., Famulok,M., Wendler,W., Weiss,S., und Winnacker,E.L. (1996). Prion protein PrP<sup>C</sup> interacts with molecular chaperones of the Hsp60 family. *J. Virol.* 70, 4724-4728.

- Enari,M., Flechsig,E., und Weissmann,C. (2001). Scrapie prion protein accumulation by scrapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *98*, 9295-9299.
- Feng,S., Chen,J.K., Yu,H., Simon,J.A., und Schreiber,S.L. (1994). Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions. *Science* *266*, 1241-1247.
- Ferrer,I., Puig,B., Blanco,R., und Marti,E. (2000). Prion protein deposition and abnormal synaptic protein expression in the cerebellum in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuroscience* *97*, 715-726.
- Ferrer,I., Rivera,R., Blanco,R., und Marti,E. (1999) Expression of proteins linked to exocytosis and neurotransmission in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol. Disease* *6(2)*:92-100
- Fields,S. and Song,O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* *340*, 245-246.
- Fischer,M., Rulicke,T., Raeber,A., Sailer,A., Moser,M., Oesch,B., Brandner,S., Aguzzi,A., und Weissmann,C. (1996). Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J.* *15*, 1255-1264.
- Flechsig,E., Hegyi,I., Enari,M., Schwarz,P., Collinge,J., und Weissmann,C. (2001). Transmission of Scrapie by Steel-surface-bound Prions. *Mol. Med.* *7*, 679-684.
- Flick,J.S. und Johnston,M. (1990). Two systems of glucose repression of the GAL1 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* *10*, 4757-4769.
- Ford, B. J., editor. (1996). BSE - the facts (mad cow disease and the risk of mankind). London, Gorgi Books.
- Fournier,J.G., Escaig-Haye,F., Billette,d., V, und Robain,O. (1995). Ultrastructural localization of cellular prion protein (PrP<sub>c</sub>) in synaptic boutons of normal hamster hippocampus. *C. R. Acad. Sci. III* *318*, 339-344.
- Fuerst,T.R., Niles,E.G., Studier,F.W., und Moss,B. (1986). Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *83*, 8122-8126.
- Gabus,C., Auxilien,S., Pechoux,C., Dormont,D., Swietnicki,W., Morillas,M., Surewicz,W., Nandi,P., und Darlix,J.L. (2001). The prion protein has DNA strand transfer properties similar to retroviral nucleocapsid protein. *J. Mol. Biol.* *307*, 1011-1021.
- Gajdusek,D.C., Gibbs,C.J., und Alpers,M. (1966). Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* *209*, 794-796.

- Gajdusek, D. C. und Zigas, V. (1957). Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea. The endemic occurrence of "kuru" in the native population. *N.Engl.J.Med.* 257, 974-978.
- Gerstmann, J., Strüssler, E., und Scheinker, I. (1936). Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z. Neurol. Psych.* 154, 736-762.
- Gibbs, C.J., Gajdusek, D.C., Asher, D.M., Alpers, M.P., Beck, E., Daniel, P.M., und Matthews, W.B. (1968). Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science* 161, 388-389.
- Gibbs, C.J., Jr., Gajdusek, D.C., und Latarjet, R. (1978). Unusual resistance to ionizing radiation of the viruses of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and scrapie. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 75, 6268-6270.
- Gietz, D., St Jean, A., Woods, R.A., und Schiestl, R.H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* 20, 1425.
- Gilch, S., Winklhofer, K.F., Groschup, M.H., Nunziante, M., Lucassen, R., Spielhauer, C., Muranyi, W., Riesner, D., Tatzelt, J., und Schätzl, H.M. (2001). Intracellular re-routing of prion protein prevents propagation of PrP(Sc) and delays onset of prion disease. *EMBO J.* 20, 3957-3966.
- Gill, A.C., Ritchie, M.A., Hunt, L.G., Steane, S.E., Davies, K.G., Bocking, S.P., Rhie, A.G., Bennett, A.D., und Hope, J. (2000). Post-translational hydroxylation at the N-terminus of the prion protein reveals presence of PPII structure in vivo. *EMBO J.* 19, 5324-5331.
- Gishizky, M.L., Cortez, D., und Pendergast, A.M. (1995). Mutant forms of growth factor-binding protein-2 reverse BCR-ABL-induced transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 10889-10893.
- Goldfarb, L.G., Petersen, R.B., Tabaton, M., Brown, P., LeBlanc, A.C., Montagna, P., Cortelli, P., Julien, J., Vital, C., und Pendelbury, W.W. (1992). Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science* 258, 806-808.
- Gorodinsky, A. und Harris, D.A. (1995). Glycolipid-anchored proteins in neuroblastoma cells form detergent-resistant complexes without caveolin. *J. Cell Biol.* 129, 619-627.
- Graner, E., Mercadante, A.F., Zanata, S.M., Forlenza, O.V., Cabral, A.L., Veiga, S.S., Juliano, M.A., Roesler, R., Walz, R., Minetti, A., Izquierdo, I., Martins, V.R., und Brentani, R.R. (2000). Cellular prion protein binds laminin and mediates neurite outgrowth. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 76, 85-92.
- Greengard, P., Valtorta, F., Czernik, A.J., und Benfenati, F. (1993). Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science* 259, 780-785.
- Griffith, J.S. (1967). Self-replication and scrapie. *Nature* 215, 1043-1044.

- Guijarro, J.I., Sunde, M., Jones, J.A., Campbell, I.D., und Dobson, C.M. (1998). Amyloid fibril formation by an SH3 domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *95*, 4224-4228.
- Hadlow, W. J. (1959). Scrapie and Kuru. *Lancet* *II*, 289-290.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., und Elledge, S.J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* *75*, 805-816.
- Harris, D.A. (1999). Cellular biology of prion diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* *12*, 429-444.
- Hartsough, G.R. and Burger, D. (1965). Encephalopathy of mink. I. Epizootiologic and clinical observations. *J. Infect. Dis.* *115*, 387-392.
- Hegde, R.S., Tremblay, P., Groth, D., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., und Lingappa, V.R. (1999). Transmissible and genetic prion diseases share a common pathway of neurodegeneration. *Nature* *402*, 822-826.
- Hegde, R.S., Voigt, S., und Lingappa, V.R. (1998). Regulation of protein topology by trans-acting factors at the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell* *2*, 85-91.
- Heppner, F.L., Musahl, C., Arrighi, I., Klein, M.A., Rulicke, T., Oesch, B., Zinkernagel, R.M., Kalinke, U., und Aguzzi, A. (2001). Prevention of scrapie pathogenesis by transgenic expression of anti-prion protein antibodies. *Science* *294*, 178-182.
- Herms, J., Tings, T., Gall, S., Madlung, A., Giese, A., Siebert, H., Schurmann, P., Windl, O., Brose, N., und Kretzschmar, H. (1999). Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J. Neurosci.* *19*, 8866-8875.
- Hicks, A., Davis, S., Rodger, J., Helme-Guizon, A., Laroche, S., und Mallet, J. (1997). Synapsin I and syntaxin 1B: key elements in the control of neurotransmitter release are regulated by neuronal activation and long-term potentiation in vivo. *Neuroscience* *79*, 329-340.
- Hill, A.F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K.C., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L.J., und Lantos, P. (1997). The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* *389*, 448-50, 526.
- Hilton, D.A., Fathers, E., Edwards, P., Ironside, J.W., und Zajicek, J. (1998). Prion immunoreactivity in appendix before clinical onset of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* *352*, 703-704.
- Hofmann, K. und Stoffel, W. (1993) TMbase - A database of membrane spanning protein segments. *Biol.Chem.* *374*, 166. Hoppe-Seyler.
- Hope, J., Morton, L.J., Farquhar, C.F., Multhaup, G., Beyreuther, K., und Kimberlin, R.H. (1986). The major polypeptide of scrapie-associated fibrils (SAF) has the same size, charge distribution and N-terminal protein sequence as predicted for the normal brain protein (PrP). *EMBO J.* *5*, 2591-2597.

- Hornshaw, M.P., McDermott, J.R., Candy, J.M., und Lakey, J.H. (1995). Copper binding to the N-terminal tandem repeat region of mammalian and avian prion protein: structural studies using synthetic peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *214*, 993-999.
- Hsiao, K., Baker, H.F., Crow, T.J., Poulter, M., Owen, F., Terwilliger, J.D., Westaway, D., Ott, J., und Prusiner, S.B. (1989). Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. *Nature* *338*, 342-345.
- Hsiao, K.K., Groth, D., Scott, M., Yang, S.L., Serban, H., Rapp, D., Foster, D., Torchia, M., DeArmond, S.J., und Prusiner, S.B. (1994). Serial transmission in rodents of neurodegeneration from transgenic mice expressing mutant prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 9126-9130.
- Hsiao, K.K., Scott, M., Foster, D., Groth, D.F., DeArmond, S.J., und Prusiner, S.B. (1990). Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein. *Science* *250*, 1587-1590.
- Huang, Z., Gabriel, J.M., Baldwin, M.A., Fletterick, R.J., Prusiner, S.B., und Cohen, F.E. (1994). Proposed three-dimensional structure for the cellular prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 7139-7143.
- Jarrett, J.T. und Lansbury, P.T., Jr. (1993). Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* *73*, 1055-1058.
- Kaneko, K., Zulianello, L., Scott, M., Cooper, C.M., Wallace, A.C., James, T.L., Cohen, F.E., und Prusiner, S.B. (1997). Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 10069-10074.
- Kao, H.T., Porton, B., Hilfiker, S., Stefani, G., Pieribone, V.A., DeSalle, R., und Greengard, P. (1999). Molecular evolution of the synapsin gene family. *J. Exp. Zool.* *285*, 360-377.
- Keshet, G.I., Bar-Peled, O., Yaffe, D., Nudel, U., und Gabizon, R. (2000). The cellular prion protein colocalizes with the dystroglycan complex in the brain. *J. Neurochem.* *75*, 1889-1897.
- Kitamoto, T., Shin, R.W., Doh-ura, K., Tomokane, N., Miyazono, M., Muramoto, T., und Tateishi, J. (1992). Abnormal isoform of prion proteins accumulates in the synaptic structures of the central nervous system in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Am. J. Pathol.* *140*, 1285-1294.
- Kitamoto, T., Tateishi, J., Tashima, T., Takeshita, I., Barry, R.A., DeArmond, S.J., und Prusiner, S.B. (1986). Amyloid plaques in Creutzfeldt-Jakob disease stain with prion protein antibodies. *Ann. Neurol.* *20*, 204-208.
- Klatzo, I., Gajdusek, D. C., und Zigas, V. (1959). Pathology of Kuru. *Lab Invest* *8*, 799-847.
- Knaus, K.J., Morillas, M., Swietnicki, W., Malone, M., Surewicz, W.K., und Yee, V.C. (2001). Crystal structure of the human prion protein reveals a mechanism for oligomerization. *Nat. Struct. Biol.* *8*, 770-774.

- Kocisko,D.A., Come,J.H., Priola,S.A., Chesebro,B., Raymond,G.J., Lansbury,P.T., und Caughey,B. (1994). Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* 370, 471-474.
- Kretzschmar,H.A., Prusiner,S.B., Stowring,L.E., und DeArmond,S.J. (1986). Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am. J. Pathol.* 122, 1-5.
- Kurschner,C. und Morgan,J.I. (1996). Analysis of interaction sites in homo- and heteromeric complexes containing Bcl-2 family members and the cellular prion protein. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 37, 249-258.
- Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Leggett,M.M., Dukes,J., und Pirie,H.M. (1990). A spongiform encephalopathy in a cat. *Vet. Rec.* 127, 586-588.
- Lemaire-Vieille,C., Schulze,T., Podevin-Dimster,V., Follet,J., Bailly,Y., Blanquet-Grossard,F., Decavel,J.P., Heinen,E., und Cesbron,J.Y. (2000). Epithelial and endothelial expression of the green fluorescent protein reporter gene under the control of bovine prion protein (PrP) gene regulatory sequences in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 5422-5427.
- Li,A., Sakaguchi,S., Shigematsu,K., Atarashi,R., Roy,B.C., Nakaoka,R., Arima,K., Okimura,N., Kopacek,J., und Katamine,S. (2000). Physiological expression of the gene for PrP-like protein, PrPLP/Dpl, by brain endothelial cells and its ectopic expression in neurons of PrP-deficient mice ataxic due to Purkinje cell degeneration. *Am. J. Pathol.* 157, 1447-1452.
- Li,B. und Fields,S. (1993). Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *FASEB J.* 7, 957-963.
- Lledo,P.M., Tremblay,P., DeArmond,S.J., Prusiner,S.B., und Nicoll,R.A. (1996). Mice deficient for prion protein exhibit normal neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 2403-2407.
- Lock,L.S., Royal,I., Naujokas,M.A., und Park,M. (2000). Identification of an atypical Grb2 carboxyl-terminal SH3 domain binding site in Gab docking proteins reveals Grb2-dependent and -independent recruitment of Gab1 to receptor tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 275, 31536-31545.
- Lopez,G.F., Zahn,R., Riek,R., und Wuthrich,K. (2000). NMR structure of the bovine prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 8334-8339.
- Lowenstein,E.J., Daly,R.J., Batzer,A.G., Li,W., Margolis,B., Lammers,R., Ullrich,A., Skolnik,E.Y., Bar-Sagi,D., und Schlessinger,J. (1992). The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling. *Cell* 70, 431-442.
- Lu,K., Wang,W., Xie,Z., Wong,B.S., Li,R., Petersen,R.B., Sy,M.S., und Chen,S.G. (2000). Expression and structural characterization of the recombinant human doppel protein. *Biochemistry* 39, 13575-13583.

- Luban, J. und Goff, S.P. (1995). The yeast two-hybrid system for studying protein-protein interactions. *Curr. Opin. Biotechnol.* *6*, 59-64.
- Mahal, S.P., Asante, E.A., Antoniou, M., und Collinge, J. (2001). Isolation and functional characterisation of the promoter region of the human prion protein gene. *Gene* *268*, 105-114.
- Maignan, S., Guilloteau, J.P., Fromage, N., Arnoux, B., Becquart, J., und Ducruix, A. (1995). Crystal structure of the mammalian Grb2 adaptor. *Science* *268*, 291-293.
- Maniatis T, Sambrook, J., und Fritsch, E. F. (1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.
- Manson, J.C., Clarke, A.R., McBride, P.A., McConnell, I., und Hope, J. (1994). PrP gene dosage determines the timing but not the final intensity or distribution of lesions in scrapie pathology. *Neurodegeneration*. *3*, 331-340.
- Manuelidis, L., Valley, S., und Manuelidis, E.E. (1985). Specific proteins associated with Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie share antigenic and carbohydrate determinants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *82*, 4263-4267.
- Marsh, R.F. und Hadlow, W.J. (1992). Transmissible mink encephalopathy. *Rev. Sci. Tech.* *11*, 539-550.
- Martins, V.R., Graner, E., Garcia-Abreu, J., de Souza, S.J., Mercadante, A.F., Veiga, S.S., Zanata, S.M., Neto, V.M., und Brentani, R.R. (1997). Complementary hydropathy identifies a cellular prion protein receptor. *Nat. Med.* *3*, 1376-1382.
- Masters, C.L., Harris, J.O., Gajdusek, D.C., Gibbs, C.J., Jr., Bernoulli, C., und Asher, D.M. (1979). Creutzfeldt-Jakob disease: patterns of worldwide occurrence and the significance of familial and sporadic clustering. *Ann. Neurol.* *5*, 177-188.
- Matuoka, K., Shibata, M., Yamakawa, A., und Takenawa, T. (1992). Cloning of ASH, a ubiquitous protein composed of one Src homology region (SH) 2 and two SH3 domains, from human and rat cDNA libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *89*, 9015-9019.
- McBride, P.A., Eikelenboom, P., Kraal, G., Fraser, H., und Bruce, M.E. (1992). PrP protein is associated with follicular dendritic cells of spleens and lymph nodes in uninfected and scrapie-infected mice. *J. Pathol.* *168*, 413-418.
- McGowan, J. (1914). Investigation into the disease of sheep called "scrapie". William Blackwood and Sons, Edinburgh 114.
- McPherson, P.S., Czernik, A.J., Chilcote, T.J., Onofri, F., Benfenati, F., Greengard, P., Schlessinger, J., und De Camilli, P. (1994). Interaction of Grb2 via its Src homology 3 domains with synaptic proteins including synapsin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 6486-6490.



- Mead,S., Beck,J., Dickinson,A., Fisher,E.M., und Collinge,J. (2000). Examination of the human prion protein-like gene doppel for genetic susceptibility to sporadic and variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci. Lett.* *290*, 117-120.
- Mehlhorn,I., Groth,D., Stockel,J., Moffat,B., Reilly,D., Yansura,D., Willett,W.S., Baldwin,M., Fletterick,R., Cohen,F.E., Vandlen,R., Henner,D., und Prusiner,S.B. (1996). High-level expression and characterization of a purified 142-residue polypeptide of the prion protein. *Biochemistry* *35*, 5528-5537.
- Meyer,R.K., Lustig,A., Oesch,B., Fatzer,R., Zurbriggen,A., und Vandevelde,M. (2000). A monomer-dimer equilibrium of a cellular prion protein (PrPC) not observed with recombinant PrP. *J. Biol. Chem.* *275*, 38081-38087.
- Miller,M.W., Wild,M.A., und Williams,E.S. (1998). Epidemiology of chronic wasting disease in captive Rocky Mountain elk. *J. Wildl. Dis.* *34*, 532-538.
- Mo,H., Moore,R.C., Cohen,F.E., Westaway,D., Prusiner,S.B., Wright,P.E., und Dyson,H.J. (2001). Two different neurodegenerative diseases caused by proteins with similar structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *98*, 2352-2357.
- Moore,R.C., Hope,J., McBride,P.A., McConnell,I., Selfridge,J., Melton,D.W., und Manson,J.C. (1998). Mice with gene targeted prion protein alterations show that Prnp, Sinc and Prni are congruent. *Nat. Genet.* *18*, 118-125.
- Moore,R.C., Lee,I.Y., Silverman,G.L., Harrison,P.M., Strome,R., Heinrich,C., Karunaratne,A., Pasternak,S.H., Chishti,M.A., Liang,Y., Mastrangelo,P., Wang,K., Smit,A.F., Katamine,S., Carlson,G.A., Cohen,F.E., Prusiner,S.B., Melton,D.W., Tremblay,P., Hood,L.E., und Westaway,D. (1999). Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *J. Mol. Biol.* *292*, 797-817.
- Moore,R.C., Mastrangelo,P., Bouzamondo,E., Heinrich,C., Legname,G., Prusiner,S.B., Hood,L., Westaway,D., DeArmond,S.J., und Tremblay,P. (2001). Doppel-induced cerebellar degeneration in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Mouillet-Richard,S., Ermonval,M., Chebassier,C., Laplanche,J.L., Lehmann,S., Launay,J.M., und Kellermann,O. (2000). Signal transduction through prion protein. *Science* *289*, 1925-1928.
- Navone,F., Greengard,P., und De Camilli,P. (1984). Synapsin I in nerve terminals: selective association with small synaptic vesicles. *Science* *226*, 1209-1211.
- Negro,A., Meggio,F., Bertoli,A., Battistutta,R., Sorgato,M.C., und Pinna,L.A. (2000). Susceptibility of the prion protein to enzymic phosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *271*, 337-341.
- Nishida,N., Tremblay,P., Sugimoto,T., Shigematsu,K., Shirabe,S., Petromilli,C., Erpel,S.P., Nakaoka,R., Atarashi,R., Houtani,T., Torchia,M., Sakaguchi,S., DeArmond,S.J., Prusiner,S.B., und Katamine,S. (1999). A mouse prion protein transgene rescues mice deficient for the prion protein gene from purkinje cell degeneration and demyelination. *Lab Invest* *79*, 689-697.

- Oesch,B. (1994). Characterization of PrP binding proteins. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* *343*, 443-445.
- Oesch,B., Teplow,D.B., Stahl,N., Serban,D., Hood,L.E., und Prusiner,S.B. (1990). Identification of cellular proteins binding to the scrapie prion protein. *Biochemistry* *29*, 5848-5855.
- Oesch,B., Westaway,D., Walchli,M., McKinley,M.P., Kent,S.B., Aebersold,R., Barry,R.A., Tempst,P., Teplow,D.B., Hood,L.E., und . (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* *40*, 735-746.
- Onofri,F., Giovedi,S., Kao,H.T., Valtorta,F., Borbone,L.B., De Camilli,P., Greengard,P., und Benfenati,F. (2000). Specificity of the binding of synapsin I to Src homology 3 domains. *J. Biol. Chem.* *275*, 29857-29867.
- Pan,K.M., Baldwin,M., Nguyen,J., Gasset,M., Serban,A., Groth,D., Mehlhorn,I., Huang,Z., Fletterick,R.J., Cohen,F.E., und . (1993). Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *90*, 10962-10966.
- Pawson,T. (1995). Protein modules and signalling networks. *Nature* *373*, 573-580.
- Peoc'h,K., Guerin,C., Brandel,J.P., Launay,J.M., und Laplanche,J.L. (2000). First report of polymorphisms in the prion-like protein gene (PRND): implications for human prion diseases. *Neurosci. Lett.* *286*, 144-148.
- Peretz,D., Williamson,R.A., Kaneko,K., Vergara,J., Leclerc,E., Schmitt-Ulms,G., Mehlhorn,I.R., Legname,G., Wormald,M.R., Rudd,P.M., Dwek,R.A., Burton,D.R., und Prusiner,S.B. (2001). Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature* *412*, 739-743.
- Priola,S.A., Caughey,B., Wehrly,K., und Chesebro,B. (1995). A 60-kDa prion protein (PrP) with properties of both the normal and scrapie-associated forms of PrP. *J. Biol. Chem.* *270*, 3299-3305.
- Prusiner,S.B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* *216*, 136-144.
- Prusiner,S.B., Groth,D.F., Bolton,D.C., Kent,S.B., und Hood,L.E. (1984). Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell* *38*, 127-134.
- Prusiner,S.B., Scott,M., Foster,D., Pan,K.M., Groth,D., Mirenda,C., Torchia,M., Yang,S.L., Serban,D., und Carlson,G.A. (1990). Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell* *63*, 673-686.
- Rappaport,E.B. (1987). Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* *37*, 1520-1522.
- Rieger,R., Edenhofer,F., Lasmezas,C.I., und Weiss,S. (1997). The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *Nat. Med.* *3*, 1383-1388.

- Riek,R., Hornemann,S., Wider,G., Billeter,M., Glockshuber,R., und Wuthrich,K. (1996). NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature* 382, 180-182.
- Riek,R., Hornemann,S., Wider,G., Glockshuber,R., und Wuthrich,K. (1997). NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett.* 413, 282-288.
- Rosahl,T.W., Spillane,D., Missler,M., Herz,J., Selig,D.K., Wolff,J.R., Hammer,R.E., Malenka,R.C., und Sudhof,T.C. (1995). Essential functions of synapsins I and II in synaptic vesicle regulation. *Nature* 375, 488-493.
- Rossi,D., Cozzio,A., Flechsig,E., Klein,M.A., Rulicke,T., Aguzzi,A., und Weissmann,C. (2001). Onset of ataxia and Purkinje cell loss in PrP null mice inversely correlated with Dpl level in brain. *EMBO J.* 20, 694-702.
- Ryder,S.J., Hawkins,S.A., Dawson,M., und Wells,G.A. (2000). The neuropathology of experimental bovine spongiform encephalopathy in the pig. *J. Comp Pathol.* 122, 131-143.
- Safar,J., Wille,H., Itri,V., Groth,D., Serban,H., Torchia,M., Cohen,F.E., und Prusiner,S.B. (1998). Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat. Med.* 4, 1157-1165.
- Sakaguchi,S., Katamine,S., Nishida,N., Moriuchi,R., Shigematsu,K., Sugimoto,T., Nakatani,A., Kataoka,Y., Houtani,T., Shirabe,S., Okada,H., Hasegawa,S., Miyamoto,T., und Noda,T. (1996). Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* 380, 528-531.
- Sarraet,M. (1883). Un cas de tremblante sur un boeuf. *Revue médicale vétérinaire* 7, 310-312.
- Schätzl,H.M., Da Costa,M., Taylor,L., Cohen,F.E., und Prusiner,S.B. (1995). Prion protein gene variation among primates. *J. Mol. Biol.* 245, 362-374.
- Schätzl,H.M., Laszlo,L., Holtzman,D.M., Tatzelt,J., DeArmond,S.J., Weiner,R.I., Mobley,W.C., und Prusiner,S.B. (1997). A hypothalamic neuronal cell line persistently infected with scrapie prions exhibits apoptosis. *J. Virol.* 71, 8821-8831.
- Scott,M., Foster,D., Mirenda,C., Serban,D., Coufal,F., Walchli,M., Torchia,M., Groth,D., Carlson,G., DeArmond,S.J., und Prusiner,S.B. (1989). Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell* 59, 847-857.
- Shyng,S.L., Heuser,J.E., und Harris,D.A. (1994). A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. *J. Cell Biol.* 125, 1239-1250.
- Sigurdsson,B. (1954). Rida , a chronic encephalitis of sheep with general remarks on infections which develop slowly and some of their special characteristics. *Br Vet J* 110, 341-354.
- Siligardi,G. und Drake,A.F. (1995). The importance of extended conformations and, in particular, the PII conformation for the molecular recognition of peptides. *Biopolymers* 37, 281-292.

- Simon, M.A., Dodson, G.S., und Rubin, G.M. (1993). An SH3-SH2-SH3 protein is required for p21Ras1 activation and binds to sevenless and Sos proteins in vitro. *Cell* *73*, 169-177.
- Simons, K. und Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *1*, 31-39.
- Smith, C.J., Drake, A.F., Banfield, B.A., Bloomberg, G.B., Palmer, M.S., Clarke, A.R., und Collinge, J. (1997). Conformational properties of the prion octa-repeat and hydrophobic sequences. *FEBS Lett.* *405*, 378-384.
- Smits, M.A., Bossers, A., und Schreuder, B.E. (1997). Prion protein and scrapie susceptibility. *Vet. Q.* *19*, 101-105.
- Sparkes, R.S., Simon, M., Cohn, V.H., Fournier, R.E., Lem, J., Klisak, I., Heinzmann, C., Blatt, C., Lucero, M., Mohandas, T., und . (1986). Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *83*, 7358-7362.
- Stahl, N., Baldwin, M.A., Teplow, D.B., Hood, L., Gibson, B.W., Burlingame, A.L., und Prusiner, S.B. (1993). Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry* *32*, 1991-2002.
- Stahl, N., Borchelt, D.R., Hsiao, K., und Prusiner, S.B. (1987). Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* *51*, 229-240.
- Stewart, R.S. und Harris, D.A. (2001). Most pathogenic mutations do not alter the membrane topology of the prion protein. *J. Biol. Chem.* *276*, 2212-2220.
- Stockel, J., Safar, J., Wallace, A.C., Cohen, F.E., und Prusiner, S.B. (1998). Prion protein selectively binds copper(II) ions. *Biochemistry* *37*, 7185-7193.
- Suen, K.L., Bustelo, X.R., Pawson, T., und Barbacid, M. (1993). Molecular cloning of the mouse *grb2* gene: differential interaction of the Grb2 adaptor protein with epidermal growth factor and nerve growth factor receptors. *Mol. Cell Biol.* *13*, 5500-5512.
- Swietnicki, W., Petersen, R.B., Gambetti, P., und Surewicz, W.K. (1998). Familial mutations and the thermodynamic stability of the recombinant human prion protein. *J. Biol. Chem.* *273*, 31048-31052.
- Tabas, I. und Kornfeld, S. (1979). Purification and characterization of a rat liver Golgi alpha-mannosidase capable of processing asparagine-linked oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* *254*, 11655-11663.
- Taraboulos, A., Scott, M., Semenov, A., Avrahami, D., Laszlo, L., Prusiner, S.B., und Avraham, D. (1995). Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J. Cell Biol.* *129*, 121-132.
- Telling, G.C., Haga, T., Torchia, M., Tremblay, P., DeArmond, S.J., und Prusiner, S.B. (1996). Interactions between wild-type and mutant prion proteins modulate neurodegeneration in transgenic mice. *Genes Dev.* *10*, 1736-1750.

- Telling,G.C., Scott,M., Mastrianni,J., Gabizon,R., Torchia,M., Cohen,F.E., DeArmond,S.J., und Prusiner,S.B. (1995). Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* 83, 79-90.
- Tobler,I., Gaus,S.E., Deboer,T., Achermann,P., Fischer,M., Rulicke,T., Moser,M., Oesch,B., McBride,P.A., und Manson,J.C. (1996). Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* 380, 639-642.
- Vaccaro,P., Dente,L., Onofri,F., Zucconi,A., Martinelli,S., Valtorta,F., Greengard,P., Cesareni,G., und Benfenati,F. (1997). Anti-synapsin monoclonal antibodies: epitope mapping and inhibitory effects on phosphorylation and Grb2 binding. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 52, 1-16.
- Vey,M., Pilkuhn,S., Wille,H., Nixon,R., DeArmond,S.J., Smart,E.J., Anderson,R.G., Taraboulos,A., und Prusiner,S.B. (1996). Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 14945-14949.
- Weissmann,C. und Aguzzi,A. (1999). Perspectives: neurobiology. PrP's double causes trouble. *Science* 286, 914-915.
- Wells,G.A., Scott,A.C., Johnson,C.T., Gunning,R.F., Hancock,R.D., Jeffrey,M., Dawson,M., und Bradley,R. (1987). A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.* 121, 419-420.
- Whittington,M.A., Sidle,K.C., Gowland,I., Meads,J., Hill,A.F., Palmer,M.S., Jefferys,J.G., und Collinge,J. (1995). Rescue of neurophysiological phenotype seen in PrP null mice by transgene encoding human prion protein. *Nat. Genet.* 9, 197-201.
- Wilesmith,J.W., Wells,G.A., Cranwell,M.P., und Ryan,J.B. (1988). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet. Rec.* 123, 638-644.
- Will,R.G., Ironside,J.W., Zeidler,M., Cousens,S.N., Estibeiro,K., Alperovitch,A., Poser,S., Pocchiari,M., Hofman,A., und Smith,P.G. (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 347, 921-925.
- Williams,E.S. and Young,S. (1980). Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J. Wildl. Dis.* 16, 89-98.
- Wopfner,F., Weidenhofer,G., Schneider,R., von Brunn,A., Gilch,S., Schwarz,T.F., Werner,T., und Schätzl,H.M. (1999). Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J. Mol. Biol.* 289, 1163-1178.
- Wu,C., Butz,S., Ying,Y., und Anderson,R.G. (1997). Tyrosine kinase receptors concentrated in caveolae-like domains from neuronal plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 272, 3554-3559.
- Ye,Q. und Worman,H.J. (1995). Protein-protein interactions between human nuclear lamins expressed in yeast. *Exp. Cell Res.* 219, 292-298.

- Yedidia,Y., Horonchik,L., Tzaban,S., Yanai,A., und Taraboulos,A. (2001). Proteasomes and ubiquitin are involved in the turnover of the wild-type prion protein. *EMBO J.* 20, 5383-5391.
- Yehiely,F., Bamborough,P., Da Costa,M., Perry,B.J., Thinakaran,G., Cohen,F.E., Carlson,G.A., und Prusiner,S.B. (1997). Identification of candidate proteins binding to prion protein. *Neurobiol. Dis.* 3, 339-355.
- Zahn,R., Liu,A., Luhrs,T., Riek,R., von Schroetter,C., Lopez,G.F., Billeter,M., Calzolari,L., Wider,G., und Wuthrich,K. (2000). NMR solution structure of the human prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 145-150.

**8 Publikationen**

Gilch,S., Spielhaupter,C., und Schätzl,H.M. (2000). Shortest known prion protein allele in highly BSE-susceptible lemurs. *Biol. Chem.* 381, 521-523.

Gilch,S., Winklhofer,K.F., Groschup,M.H., Nunziante,M., Lucassen,R., Spielhaupter,C., Muranyi,W., Riesner,D., Tatzelt,J., und Schätzl,H.M. (2001). Intracellular re-routing of prion protein prevents propagation of PrP(Sc) and delays onset of prion disease. *EMBO J.* 20, 3957-3966.

Spielhaupter,C. und Schätzl,H.M. (2001). PrP<sup>C</sup> directly interacts with proteins involved in signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 276, 44604-44612.

### 9 Danksagung

Mein herzlicher Dank geht an Herrn Dr. Hermann M. Schätzl, der mir die Möglichkeit gab, in seiner Arbeitsgruppe eine Fragestellung in einem so interessanten Themengebiet zu bearbeiten. Seine stets gezeigte Zugänglichkeit für Diskussionen und Anregungen haben mir sehr geholfen, auch die Durststrecken im wissenschaftlichen Alltag zu meistern.

Allen ehemaligen und noch aktuellen Mitgliedern der Prionen-Arbeitsgruppe („madcows“) möchte ich auf diesem Wege meine tief empfundene Dankbarkeit zum Ausdruck bringen. Es ist nicht selbstverständlich, dass überall ein so harmonisches und ausgeglichenes Arbeitsklima herrscht. Vor allem Sabine Gilch hat dazu durch ihre stets freundliche und zuvorkommende Art maßgeblich beigetragen. Meinen Mitstreitern Dr. Franziska Wopfner, Alexa Ertmer, Elke Maas und Max Nunziante möchte ich für die vielen anregenden Diskussionen bedanken.

Herrn Andreas Junker, der im Rahmen eines Praktikums bei der Suche nach dem verlorenen Pint1-Ende mithalf, danke ich für seinen Enthusiasmus.

Auch den weiteren Arbeitsgruppen des Max-von-Pettenkofer-Instituts am Genzentrum gilt mein Dank dafür, dass immer ein gewisses Zusammengehörigkeitsgefühl zu spüren war.

Den Mitarbeitern von Prof. Dr. K.-K. Conzelmann danke ich für die freundliche Aufnahme in ihrem Labor während der Vaccinia-Experimente. Genannt seien vor allem Gunther Walliser für seine großzügige Bereitstellung von Vaccinia-Stocks und Michael Wolff, mit dem ich mich so lange über widerspenstige Hefen unterhalten habe, dass wir schon eine Art Selbsthilfegruppe geworden sind.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Koszinowski danke ich für die freundliche Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Genzentrum und manch kritische Bemerkungen zum Thema Prionen.

Herrn Prof. Dr. Lutz Gürtler gilt mein besonderer Dank dafür, dass er bereit war, die Doktorvaterschaft bei der biologischen Fakultät zu übernehmen.

Ohne die moralische und finanzielle Unterstützung durch meine Eltern wäre diese Arbeit nie zustande gekommen.

Bei meiner Frau Karin und unserem kleinen Sohn Florian habe ich immer Liebe, Nestwärme und Rückendeckung erhalten, um auch die schwierigen Phasen zu überstehen.



### 10 Lebenslauf

Name: Christian Wilhelm Spielhaupter

Geburtsdatum: 24.12.1970

Geburtsort: Mühlbach/Siebenbürgen (Rumänien)

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet; ein Kind

Schulbildung: 1977-1981 Grundschule  
1981-1990 Gymnasium München-Moosach  
1990 Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst: 1990-1991 Pionierbataillon 210

Studium: 1991-1997 Studium der Biologie (Diplom)  
an der Ludwig-Maximilians-Universität München  
1996 Diplomprüfung  
1997 Diplomarbeit bei Prof. Dr. Karl Forchhammer  
am Lehrstuhl für Mikrobiologie der LMU  
Thema:  
„Untersuchung der Stickstoffmangelreaktion in *Synechococcus* PCC 7942  
und *Synechocystis* PCC 6803 mittels 2D-Gelelektrophorese“

1997-2002 Doktorarbeit am Max-von-Pettenkofer-Institut der LMU  
in der Arbeitsgruppe von Dr. med. Hermann Schätzl  
(Betreuer: Prof. Dr. Lutz Gürtler)  
Thema:  
„Identifizierung und Charakterisierung von Interaktoren  
des zellulären Prion-Proteins“

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

---

Ort/Datum

---

Unterschrift