

**Herstellung und Untersuchung
von
Prion - Reporter - Fusionsproteinen**

der Fakultät für Biologie
der
EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

von
Anja Baumgartner
aus Freiburg i. Br.
vorgelegte
Dissertation

2007

Tag der mündlichen Prüfung: 21. September 2007

Dekan: Prof. Dr. F. Schöffl

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Pfaff

2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Nordheim

I	EINLEITUNG	1
1.1)	TSE bei Tieren	1
1.2)	TSE beim Menschen	2
1.3)	Geschichte der TSE- Forschung	3
1.4)	Modelle zum Mechanismus der PrP^{Sc}- induzierten Bildung von PrP^{Sc}	5
1.4.1)	Hetero- Dimer- Modell.....	5
1.4.2)	Kristallisationskeim- Polymerisierungs- Modell.....	6
1.4.3)	Virus- oder Virion- Theorie.....	7
1.5)	Struktur des Prionproteins	7
1.5.1)	Primärstruktur.....	7
1.5.2)	Sekundärstruktur.....	10
1.5.3)	Tertiärstruktur von PrP ^C	11
1.6)	Prion- Stämme und Speziesbarrieren	12
1.7)	Physiologische Funktion des Prionproteins	14
1.8)	Verschiedene PrP- Expressionssysteme	16
1.8.1)	Tiermodelle.....	16
1.8.2)	Zellkultur.....	16
1.8.3)	Bakterien.....	17
1.8.4)	Baculo- System.....	17
1.8.5)	<i>In vitro</i> - Konversionssysteme.....	17
II	ERGEBNISSE	19
1.)	Herstellung von PrP- Reportergen- Konstrukten	19
1.1)	Expressionsanalyse der erstellten Fusionsproteine	24
a)	Expression in humanen oder murinen Zellkulturen.....	24
b)	Nachweis von PrP- EGFP- Fusionsproteinen im Fluoreszenz- Mikroskop.....	24
c)	Nachweis der PrP- Luciferase- Fusionsproteine mit dem Luciferase- Assay.....	26
d)	Nachweis der Fusionsproteine in der Western blot Analyse.....	27
e)	<i>In vitro</i> Transkription und Translation.....	28
2.)	Umklonierung der Expressionskassetten aus pcDNA3 in pQE-51	33
2.1)	Expressionsanalyse der erstellten Fusionsproteine	35

a)	Bakterielle Expression.....	35
b)	Nachweis in der Western blot Analyse.....	35
3.)	Umklonierung der Expressionskassetten aus pcDNA3 in pENTR4.....	37
3.1)	Expressionsanalyse der erstellten Fusionsproteine.....	39
a)	Virale Expression in <i>Sf9</i> - Insektenzellen.....	39
b)	Nachweis der PrP- EGFP- Fusionsproteine im Fluoreszenz- Mikroskop..	39
c)	Nachweis der Fusionsproteine in der Western blot Analyse.....	40
4.)	Konversionsversuche.....	42
4.1)	Vorversuche zu den Konversionsversuchen.....	42
a)	Proteinase K- Nachweis von infektiösen, murinen Gehirnhomogenaten.	43
b)	PMCA- Methode mit murinen Gehirnhomogenaten.....	44
c)	Bestimmung der benötigten Proteinase K Konzentration für PMCA- Versuche mit rekombinantem Protein.....	47
4.2)	Konversionsversuche mit den rekombinanten Fusionsproteinen aus den verschiedenen Expressionssystemen.....	48
a)	Konversionsversuche mit <i>in vitro</i> translatierten Fusionsproteinen.....	48
b)	Konversionsversuche mit bakteriell exprimierten Fusionsproteinen.....	50
c)	Konversionsversuche mit viral exprimierten rekombinanten Proteinen..	52
5)	Zusammenfassung / Abstract.....	57
III	DISKUSSION.....	60
1.)	Herstellung der Prion- Reporter- Fusionsproteine.....	60
2.)	Expression der Prion- Reporter- Fusionsproteine in verschiedenen Expressionssystemen.....	62
2.1)	Expression der Prion- Reporter- Fusionsproteine in eukaryotischen Zellkulturen.....	62
2.1.1)	Expression von Prion- EGFP- Fusionsproteinen.....	62
2.1.2)	Expression von Prion- Luciferase- Fusionsproteinen.....	63
2.2)	<i>In vitro</i>- Transkription und <i>In vitro</i>- Translation der Fusionsproteine.	64
2.3)	Bakterielle Expression der Fusionskonstrukte.....	65
2.4)	Virale Expression der Prion- Fusionsproteine.....	65
3.)	Konversion der rekombinanten Prion- Reporter- Fusionsproteine.....	67
3.1)	Konversion von Fusionsproteinen aus eukaryotischen Zellkulturen...	68
3.2)	Konversion von <i>in vitro</i> translatierten Fusionsproteinen.....	68

3.3) Konversion mit bakteriell exprimierten Fusionsproteinen.....	69
3.4) Konversion viral exprimierter Fusionsproteine.....	70
3.5) Zusammenfassung der Konversionsversuche.....	71
IV MATERIAL UND METHODEN.....	74
1.) MATERIAL.....	74
1.1) Bakterienstämme.....	74
1.1.1) Bakterienmedien.....	74
1.2) Zelllinien.....	74
1.2.1) Zellkulturmedien.....	74
1.3) Mäusegehirne.....	75
1.4) Plasmide und Nukleinsäuren.....	76
1.4.1) Plasmide.....	76
1.4.2) Nukleinsäuren.....	76
1.5) Oligonukleotide.....	76
Position der Primer – Schemazeichnung.....	79
1.6) Enzyme und Kits.....	82
1.6.1) Enzyme.....	82
1.6.2) Kits.....	82
1.7) Antikörper.....	82
1.8) Chemikalien und Reagenzien.....	83
1.9) Radiochemikalien.....	84
1.10) Verbrauchsmaterial.....	84
1.11) Geräte und Laborhilfsmittel.....	85
1.11.1) Zentrifugen.....	86
1.11.2) Rotoren.....	86
1.11.3) Software.....	86
2.) METHODEN.....	87
2.1) Prokaryotische Zellkultur.....	87
2.1.1) Kultivierung und Kryokonservierung von <i>Escherichia coli</i>	87
2.1.2) Herstellung Transformations- kompetenter <i>E.coli</i>	87
2.1.3) Transformation.....	87
2.2) Eukaryotische Zellkultur.....	88
2.2.1) Arbeiten mit humanen und murinen Zelllinien.....	88

2.2.1.1) Kultivierung und Kryokonservierung.....	88
2.2.1.2) Transfektion eukaryotischer Zellen.....	88
2.2.1.3) Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen.....	89
2.3) Allgemeine Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	90
2.3.1) Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung.....	90
2.3.2) Phenol/Chloroform- Extraktion.....	90
2.3.4) Ethanolpräzipitation.....	90
2.4) Präparation, Analyse und Modifikation von DNA.....	91
2.4.1) Agarosegelelektrophorese.....	91
2.4.2) Isolierung von DNA aus Agarose- Gelen.....	91
2.4.3) Restriktionsverdau von DNA.....	92
2.4.4) Dephosphorylierung von DNA.....	92
2.4.5) Ligation von DNA.....	92
2.4.6) Amplifikation von DNA- Fragmenten über PCR.....	93
2.4.6.1) Präparative PCR- Ansätze.....	93
2.4.6.2) Analytische PCR- Ansätze.....	94
2.4.7) Präparation von Plasmid- DNA.....	95
2.4.7.1) Analytische Isolierung von Plasmid- DNA.....	95
2.4.7.2) Präparative Isolierung von Plasmid- DNA.....	96
2.4.8) Sequenzierung von DNA.....	97
2.5) Präparation und Analyse von RNA.....	99
2.5.1) Isolierung von RNA aus Eukaryoten- Zellen.....	99
2.5.2) RNA-Agarosegelelektrophorese (Kroczek und Siebert, 1990).....	99
2.5.3) <i>In vitro</i> Transkription.....	100
2.5.4) <i>In vitro</i> Translation.....	100
2.6) Protein-analytische Methoden.....	101
2.6.1) Konzentrationsbestimmung.....	101
2.6.2) Proteinfällung mit Aceton.....	101
2.6.3) Immunpräzipitation.....	101
2.6.4) Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS PAGE)...	102
2.6.5) Coomassie-Färbung von Proteinen.....	103
2.6.6) Detektion [³⁵ S]-markierter Proteine.....	103
2.6.7) Western Blot Analyse mit ECL-Färbung.....	104

2.6.8) Eukaryotische Expression rekombinanter Prion- Reporter- Fusionsproteine.....	105
2.6.9) Bakterielle Expression rekombinanter Prion- EGFP- Fusionsproteine.....	105
2.6.10) Virale Expression rekombinanter Prion- EGFP- Fusionsproteine.....	106
2.6.11) Denaturierende Aufreinigung rekombinanter Fusionsproteine über Ni ²⁺ - NTA-Agarose.....	107
2.6.12) Luciferaseaktivitätstest.....	109
2.6.13) Nachweis freier Sulfhydryl (SH)- Gruppen in Proteinen.....	109
2.7) Virologische Methoden.....	110
2.7.1) LR- Reaktion.....	110
2.7.2) Transfektion in Sf9- Zellen.....	111
2.7.3) Herstellung eines Hoch- Titer Virus-Stockes.....	111
2.8) Konversionstest.....	111
2.8.1) Herstellung von Gehirnhomogenaten.....	111
2.8.2) Aufreinigung von abnormen Fibrillen (SAF).....	112
2.8.3) <i>In vitro</i> - Konversion.....	113
2.8.4) Proteinase K- Verdau.....	113
2.8.5) <i>In vitro</i> Konversion mit modifizierter PMCA.....	114
V LITERATURVERZEICHNIS.....	116

Abkürzungen

3F4PrP	murines Prionprotein mit eingeführtem Epitop für MAK 3F4
α	alpha
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
Aq _{DEST}	destilliertes Wasser
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BSE	bovine spongioforme Encephalopathie
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CJD	Creutzfeld- Jakob- Krankheit
CMV	Cytomegalo- Virus
CWD	Chronisch Zehrende Hirschkrankheit
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
<i>EGFP</i>	Enhanced green fluorescent protein kodierendes Gen
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FBS	fötales bovines Serum
EUE	exotische Huftier- Encephalopathie
fCJD	vererbte Form der CJD
FCS	Fötales Kälberserum
FFI	fatale familiäre Insomnie
FSE	feline spongioforme Encephalopathie
g	Gramm bzw. Gravitationskonstante
G	Guanin
G α -ms	Goat- anti- mouse
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GSS	Gerstmann- Sträubler- Scheinker- Syndrom
ha	Hamster-
HH	Gehirnhomogenat
HH ^{Sc}	Gehirnhomogenat von terminal kranken Tieren, die mit TSE infiziert wurden
HH ^C	Gehirnhomogenat von gesunden Tieren
HH ^{0/0}	Gehirnhomogenat von transgenen PrP knockout

Inhaltsverzeichnis

iCJD	Mäusen
Ig G	CJD iatrogenen Ursprungs
IP	Immunglobulin G
Kan	Immunpräzipitation
kb	Kanamycin
kDa	Kilobasenpaare
l	Kilodalton
Luc	Liter
m	Luciferase
MEM	milli
M	Minimal Essential Medium
MAK	Mol
MeOH	monoklonaler Antikörper
μ	Methanol
Min.	Mikro
mu	Minute(n)
n	murin
NaAc	Nano
Neo	Natriumacetat
nm	Neomycin
NP 40	Nanometer
nt	Nonidet P40
nvCJD	Nukleotid
OD	neue Variante der CJD
ORF	optische Dichte
p	Offener Leserahmen
PAGE	Plasmid
PBS	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
PCR	Phosphat- gepufferte Salzlösung
Pen	Polymerase Kettenreaktion
PK	Penicillin
PMSF	Proteinase K
POD	Phenylmethylsulfonylfluorid
PrP	Peroxidase
PrP ^C	Prionprotein
PrP ^{Sc}	Zelluläres Prionprotein
PrP ^{PRES}	Pathologisches Prionprotein
PrP ²⁷⁻³⁰	Proteinase K - resistentes Prionprotein
PRNP	PK - resistenter Kern des Prionproteins
PMCA	Prionprotein kodierendes Gen
RIP	Protein Misfolding Cyclic Amplification
RNA	Radioimmunpräzipitation
rpm	Ribonukleinsäure
RT	Umdrehungen pro Minute
SAF	Raumtemperatur
Sc	Scrapie- assoziierte Fibrillen
sCJD	Scrapie
SDS	sporadisch auftretende CJD
	Natriumdodecylsulfat

Inhaltsverzeichnis

Sek.	Sekunde(n)
4x SP	4x SDS- Ladepuffer
Std.	Stunde(n)
Strep	Streptomycin
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris- Borat EDTA
TE	Tris- EDTA
TEMED	N,N,N',N'- Tetraethylmethylethylendiamin
Tm	Schmelztemperatur
TME	Transmissible Nerz- Enzephalopathie
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton X- 100	Tertiärbutylphenylpolyoxyethylen
TSE	Transmissible spongioforme Enzephalopathie
Tween 20	Polyoxyethylen(20)sorbitanmonolaureat
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
(v/v)	Volumenprozent
(w/v)	Gewichtsprozent bezogen auf das Volumen
wtPrP	Wildtyp- Prionprotein
ZNS	Zentrales Nervensystem

Aminosäuren (Ein- und Drei- Buchstaben- Code)

A	Ala	Alanin	L	Leu	Leucin
R	Arg	Arginin	K	Lys	Lysin
N	Asn	Asparagin	M	Met	Methionin
D	Asp	Asparaginsäure	F	Phe	Phenylalanin
C	Cys	Cystein	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	S	Ser	Serin
Q	Gln	Glutamin	T	Thr	Threonin
G	Gly	Glycin	W	Trp	Tryptophan
H	His	Histidin	Y	Tyr	Tyrosin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Val

I Einleitung

Transmissible spongiforme Encephalopathien (TSEs) sind eine Gruppe fataler, neurodegenerativer Krankheiten, die entweder spontan auftreten, genetische Ursachen haben oder infektiösen Ursprungs sind. TSE- Erkrankungen betreffen sowohl Menschen als auch Tiere, was ihre Erforschung und möglichst frühe Diagnose aus volkswirtschaftlicher und medizinischer Sicht außerordentlich wichtig macht. Kennzeichen dieser Krankheiten sind Vakuolisierung im Gehirn, Astrogliose, neuronale Degeneration und die Akkumulation eines fehlgefalteten, teilweise Protease-resistenten wirtskodierten Proteins, weshalb diese Krankheiten auch Prion- Krankheiten genannt werden. Ebenfalls ein Kennzeichen dieser Krankheitsgruppe ist die monate- bis jahrelange symptomfreie Inkubationszeit, in der keinerlei körpereigene Abwehrreaktionen stattfinden. Vom Ausbruch der Krankheit bis zum Tod des Opfers vergehen dann meist nur einige Monate.

1.1) TSE bei Tieren

Die älteste tierische spongiforme Encephalopathie ist Scrapie, die bei Schafen und Ziegen vorkommt. Sie wurde bereits Mitte des 18. Jahrhunderts beschrieben. 1937 trat eine Scrapie- Epidemie bei einer Herde schottischer Schafe auf, nachdem sie mit einem Formalin- behandelten Impfstoff, der aus dem Gehirn eines an Scrapie erkrankten Schafes gewonnen wurde, geimpft wurden (Aguzzi, 2006). Die Übertragbarkeit von Scrapie auf gesunde Schafe und Ziegen wurde 1939 von Cuille und Chelle experimentell bewiesen.

Von 1986 bis 1992 breitete sich BSE (bovine spongiforme Encephalopathie) epidemisch in Großbritannien aus und wurde von Wells et al. (1987) erstmalig als Krankheitsbild charakterisiert. Erst Anfang der Neunziger Jahre konnte unzureichend sterilisiertes Tiermehl als Quelle identifiziert werden (Wells et al., 1991). Kontaminiertes Tierfutter gilt ebenfalls als Ursache für die feline spongiforme Encephalopathie (FSE) (Wyatt et al., 1991), für die exotische Huftier- Enzephalopathie (EUE, exotic

ungulate encephalopathy) von Antilopenarten (Prusiner, 1998; Mabbot und MacPherson, 2006) und für die transmissible Nerz- Enzephalopathie (TME, transmissible mink encephalopathy) (Marsh et al., 1973).

Des Weiteren ist bei Hirschen die Chronisch Zehrende Hirschkrankheit (CWD, chronic wasting disease) bekannt, deren Ursprung und Verbreitung allerdings unklar ist (Detwiler et al., 1996).

1.2) TSE beim Menschen

Beim Menschen sind fünf transmissible spongiforme Encephalopathien bekannt. Es sind dies die Creutzfeld- Jakob- Krankheit (CJD), das Gerstmann- Sträußler- Scheinker- Syndrom (GSS), die fatale familiäre Insomnie (FFI) und Kuru.

Die Creutzfeld- Jakob- Krankheit (CJD) wurde erstmalig von Creutzfeld (1920) und von Jakob (1921 a und b) beschrieben. CJD tritt in einer sporadischen (sCJD) Form, einer familiären (fCJD) Form, einer iatrogenen (iCJD) Form und in einer so genannten neuen Variante (nvCJD) auf.

Eine epidemische TSE ist die auf Papua, Neu Guinea in den 50er- und 60er- Jahren des 20. Jahrhunderts aufgetretene Kuru. Diese Krankheit wurde horizontal durch rituellen Kannibalismus verbreitet und wurde nicht mehr beobachtet, nachdem Kannibalismus verboten wurde (Gajdusek, 1977). Sie könnte durch den Verzehr der Überreste eines CJD- Patienten entstanden sein (Martins, 1999).

Die familiären Formen der humanen TSE (fCJD, GSS und FFI) werden autosomal dominant vererbt. Sie sind immer mit Mutationen in *PRNP*, dem Gen, das für das Prionprotein kodiert, verbunden (Hsiao et al., 1989; Prusiner, 1998).

Bei Patienten mit Gerstmann- Sträußler- Scheinker- Syndrom (GSS) wurden Mutationen in den Codons 102 (Pro- Leu), 117 (Ala- Val), 198 (Phe- Ser) und 217 (Gln- Arg) (Martins, 1999) gefunden. Bei Patienten mit fataler familiärer Insomnie (FFI) wurden dagegen Mutationen in den Codons 178 (Asp- Asn), 200 (Glu- Lys), 208 (Arg- His) und 210 (Val- Ile) gefunden.

Die meisten CJD- Fälle sind der sporadischen Form zuzuordnen. Bei Patienten mit sCJD oder fataler spontaner Insomnie (FSI) sind keine Mutationen des *PRNP* zu finden. Bisher konnten keine krankheitsauslösenden Faktoren für sCJD und FSI be-

nannt werden. Diese Krankheiten scheinen durch die spontane Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} zu entstehen (Prusiner, 1998).

Ein Polymorphismus an Codon 129 scheint die Anfälligkeit für iatrogene CJD (Martins, 1999) und auch die Anfälligkeit für nvCJD (Aguzzi, 2006) zu verstärken. Darüber hinaus scheint die Proteinase- Spaltstelle in PrP^{Sc} hier beeinflusst zu werden (Parchi et al, 2000). Es wird vermutet, dass durch Mutationen in *PRNP* Proteine gebildet werden, die eine erhöhte Anfälligkeit besitzen, ihre Konformation zu ändern (Prusiner, 1993).

In den letzten Jahrzehnten wurde von mehreren hundert Fällen von iCJD berichtet. Die meisten Fälle wurden durch Transplantationen von Geweben oder durch die Gabe von Hypophysen- Hormonen aus Leichen, die an nicht erkannten TSEs litten, verursacht. Zu einem geringeren Anteil wurde iCJD durch kontaminierte chirurgische Instrumente verursacht. Kontaminierte Hormone als Ursache der iCJD wurden durch den Austausch von natürlichen Hormonen gegen rekombinante Hormone verhindert (Aguzzi, 2006).

Die wesentlichen Charakteristika der nvCJD sind das jugendliche Manifestationsalter (Durchschnittsalter: 30 Jahre), was bei der sCJD eine außerordentliche Rarität darstellt (Alter bei Erkrankung: 50 bis 70 Jahre), Abweichungen im anfänglichen Krankheitsverlauf und deutliche Unterschiede in der Neuropathologie (Kretzschmar, 2001). Es gibt biochemische und histopathologische Beweise dafür, dass nvCJD durch die Übertragung von BSE auf den Menschen entstanden ist (Lasmézas et al., 2001; Scott et al., 1999).

1.3) Geschichte der TSE- Forschung

Scrapie bei Schafen ist die am längsten bekannte TSE, deren Übertragbarkeit auf Ziegen im Tierversuch bereits 1939 von Cuille und Chelle bewiesen werden konnte. In den folgenden Jahren gelang es, Scrapie auch auf andere Tiere zu übertragen (Chandler, 1961). In den 50er Jahren wurde Kuru auf Papua, Neu Guinea erstmals beschrieben, und Gajdusek und Zigas (1957) führten den Beweis, dass Kuru eine TSE- Erkrankung ist. Erste Versuche, Kuru auf Primaten zu übertragen, schlugen durch die lange Inkubationszeit der Krankheit fehl. Erst nachdem die Ähnlichkeiten

der Pathogenese von Kuru und Scrapie (Hadlow, 1959) festgestellt wurde, gelang es sieben Jahre später, Primaten mit Kuru zu infizieren (Gajdusek et al., 1966). Im Zusammenhang mit diesen Erkenntnissen wurde 1959 auch die Ähnlichkeit der Pathogenese von Kuru und CJD von Klatzko et al. (Klatzko et al., 1959) dokumentiert.

Alper et al. (1966) publizierten in dem Jahr, in dem die Übertragung von Kuru auf Primaten gelang, die ungewöhnliche Resistenz des Scrapie- Erregers gegenüber UV-Strahlung. Schon 1946 wurde die ungewöhnliche Resistenz des Erregers von Scrapie gegen die Behandlung mit Formalin und Hitze dokumentiert (Gordon, 1946: zusammengefasst von Prusiner 1998). Nur ein Jahr nach der Publikation von Alpers formulierte Griffith (1967) zum ersten Mal die „Protein- only“- Theorie. 1980 entdeckte Prusiner im Gehirn mit Scrapie infizierter Hamster ein proteaseresistentes, unlösliches, hydrophobes Protein, das bei seiner Aufreinigung mit Infektiosität korrelierte.

1982 definierte Prusiner das infektiöse Agens als proteinaeous infectious particle, kurz Prion, nachdem sich reproduzierbare Daten häuften, die besagten, dass sich die Infektiosität von Scrapie durch proteinverändernde Prozeduren senken ließ, nicht aber durch Methoden, die Nukleinsäuren zerstören.

1985 konnte das Prionprotein kodierende Gen (*PRNP*) isoliert werden (Oesch et al., 1985), und bereits ein Jahr später wurde gezeigt, dass PrP^C und PrP^{Sc} von demselben Wirtsgen kodiert wurden (Basler et al., 1986). 1993 konnten Büeler et al. und Sailer et al. zeigen, dass PrP^{0/0}- Mäuse nicht an einer Prion- Infektion erkranken. Pan et al. zeigten im selben Jahr, dass PrP in zwei alternativen Formen existieren kann, in der normalen, zellulären Form (PrP^C) und in der pathologischen Isoform (PrP^{Sc}). Zwischen beiden Isoformen wurden keine Unterschiede in der Aminosäuresequenz gefunden. Die Konversion der zellulären Form in die pathologische Form schließt einen konformationellen Wechsel ein, durch den der α - helikale Anteil des normalen Proteins schwindet und der β - Faltblatt- Anteil steigt. Mit diesem konformationellen Wechsel gehen einige Veränderungen in den biochemischen Eigenschaften (Protease-Resistenz, Löslichkeit, Aggregat- Bildung) einher. Bereits 1994 gelang die zellfreie Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} (Kocisko et al., 1994).

Wickner weitete 1994 (Wickner, 1994) das Prion- Konzept aus, um die ungewöhnliche, nicht Mendel- gebundene Übertragung zweier genetischer Elemente der Hefe zu

erklären. Später wurden in Hefe und anderen Pilzen einige andere Proteine gefunden, die sich wie Prionen verhalten (Uptain und Lindquist, 2002; Soto und Castilla, 2004).

1.4) Modelle zum Mechanismus der PrP^{Sc}- induzierten Bildung von PrP^{Sc}

Bis heute ist der exakte Mechanismus der Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} nicht bekannt. Es konnte weder eine TSE- Erreger- spezifische Nukleinsäure identifiziert werden (Oesch et al., 1985), noch konnte die „Protein- only“- Theorie von Prusiner (Prusiner, 1982) endgültig bewiesen werden. Es wurden verschiedene Modelle der Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} entworfen, die im Folgenden kurz dargestellt werden.

1.4.1) Hetero- Dimer- Modell:

Das PrP^{Sc} kann zwischen einem monomeren und einem dimeren Zustand wechseln. Ein PrP^{Sc} -Monomer bindet ein PrP^C- Molekül zu einem heterodimeren Komplex. In diesem heterodimeren Komplex wird, eventuell unter Beteiligung eines weiteren Proteins (Protein X) oder durch intermolekulare Prionprotein- Interaktionen, PrP^C ebenfalls zu PrP^{Sc} umgefaltet. (Prusiner, 1991; Mulchay und Bessen, 2004). Das entstandene PrP^{Sc}- Dimer kann sich nun wieder in zwei PrP^{Sc}- Monomere teilen und die Reaktion kann von neuem beginnen.

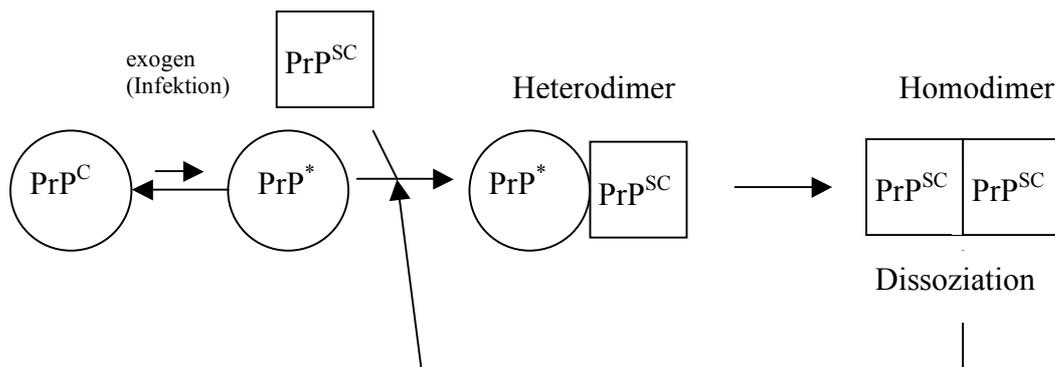


Abbildung 1: Hetero- Dimer- Modell der Prionreplikation.

PrP^C wird als Teil des normalen Metabolismus synthetisiert und degradiert. PrP^{*} ist ein Intermediat der PrP^{Sc}- Bildung, das entweder wieder zu PrP^C werden kann, oder an PrP^{Sc} bindet und dabei selbst zu PrP^{Sc} konvertiert wird.

1.4.2) Kristallisationskeim- Polymerisierungs- Modell:

PrP^C ist in einem Equilibrium mit einer PrP^{Sc}- artigen Zwischenform, wobei PrP^C der bevorzugte Zustand ist. Mehrere PrP^{Sc}- artige Moleküle können aggregieren und so einen Kern aus n PrP^{Sc}- artigen Molekülen bilden. Sobald sich ein solcher Kern gebildet hat, ist das Aggregatwachstum höher als die Dissoziation und ein ständig wachsendes Aggregat wird geformt. In diesem Modell entspricht der erste stabile Kern einem funktionalen PrP^{Sc}. Bruchstücke solcher PrP^{Sc}- Polymere fungieren als weitere Kristallisationskeime. (Lansbury et al., 1993).

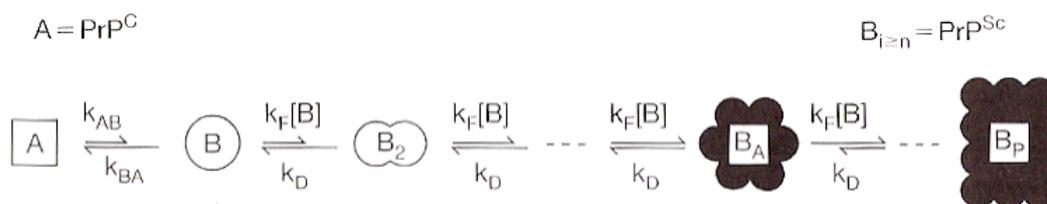


Abbildung 2: Lansbury- Modell der Prionreplikation

Diese Abbildung stammt von Riesner, D. (2004): Transmissible Spongiform Encephalopathies: The Prion Theory- Background and Basic Information. Aus: Prions. A Challenge for Science, Medicine and the Public Health System, H.F. Rabenau, J. Cinatl, H.W. Doerr, eds. (Basel, Switzerland: Karger), pp. 1- 13.

Entscheidend für die Bildung von PrP^{Sc} ist das Überschreiten einer kritischen Keimgröße.

Beide Modelle unterscheiden sich vor allem in ihrer thermodynamischen Logik. Das von Prusiner postulierte Modell ist eine lineare Autokatalyse, bei der PrP^{Sc} die thermodynamisch bevorzugte Form ist, die nur aufgrund der hohen Aktivierungsenergie nicht gebildet wird. Nach Lansbury ist PrP^C stabiler als monomeres PrP^{Sc}. Eine genaue Berechnung der Kinetik beider Modelle zeigte, dass das Heterodimer-Modell nicht an realistische Geschwindigkeitskonstanten angepasst werden kann (Eigen, 1996). Eigen postulierte deshalb das kooperative Prusiner-Modell, bei dem mehrere PrP^{Sc}-Moleküle zusammenwirken müssen, um ein PrP^C-Molekül umzuwandeln.

1.4.3) Virus- oder Virion- Theorie:

Die Bindung eines noch nicht identifizierten Virus oder Virions an PrP^C führt zu dessen Konformationsänderung und damit zur Entstehung von PrP^{Sc} (Czub et al., 1988). Varianten dieser Theorie gehen von Virionen (Dickinson & Outram, 1988; Manuelidis et al., 2007) oder Viroiden (Diener et al., 1982) aus.

Eine weitere diskutierte Alternative ist, dass die Immunantwort des Wirts auf ein Virion eine Reihe molekularer Reaktionen auslöst, die in der Spätfolge zur Bildung von PrP^{Sc} führen (Manuelidis et al., 2007).

1.5) Struktur des Prionproteins

1.5.1) Primärstruktur:

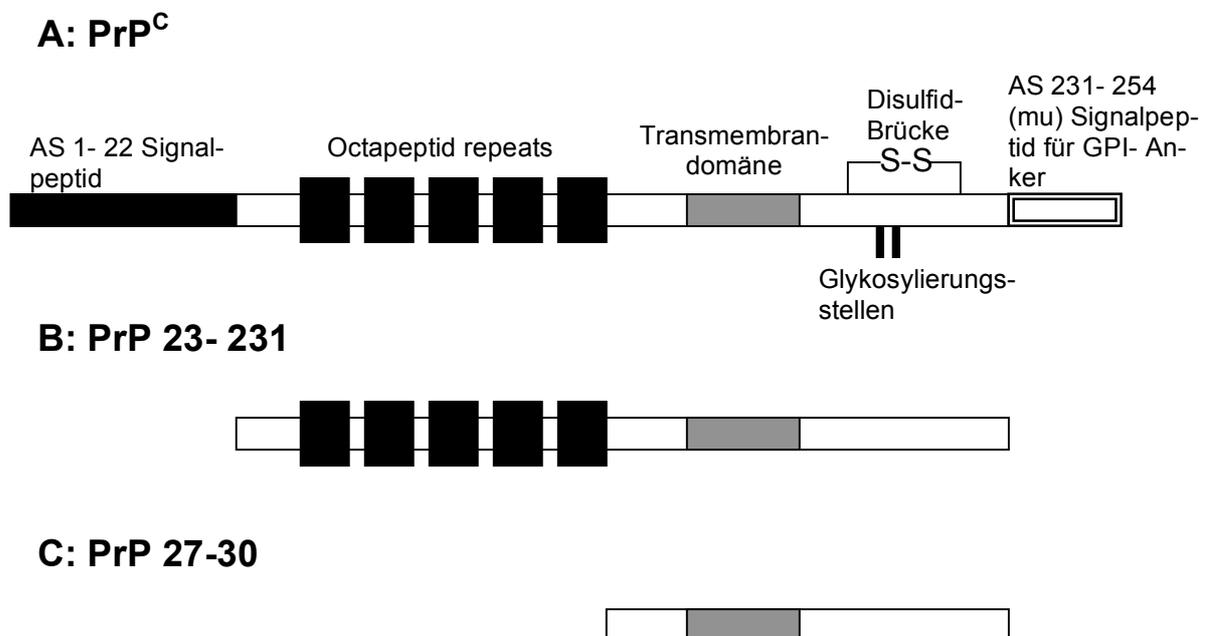
Das *PRNP* Gen ist durch die Evolution hoch konserviert. Das humane *PRNP* Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 20 lokalisiert (Liao et al., 1986). Der komplette offene Leserahmen liegt bei allen bekannten Säugetier- und Vogel- PrP- Genen auf einem einzelnen Exon (Prusiner, 1998; Wopfner et al., 1999). Die Expression des Proteins erfolgt in den meisten Geweben, die höchsten Expressionsraten sind im Gehirn zu finden.

Die Promotor- Sequenz des Priongens ähnelt anderen ständig exprimierten Genen, sie ist GC- reich und hat scheinbar keine TATA- Box (Basler et al., 1986). Es sind kei-

ne Unterschiede in der PRNP Expression zwischen nicht- infiziertem und infiziertem Gewebe festzustellen (Chesebro et al., 1985).

Das entstehende Prionmolekül ist etwa 250 AS lang (Abb. 3 A). Es hat eine aminoterminal Signalsequenz (Basler et al., 1986) und eine hydrophobe carboxyterminale Domäne zur Anheftung an Membranen über einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI)- Anker (Stahl et al., 1987). Es scheint außerdem noch eine weitere C- terminale Signalsequenz in der globulären Domäne des Proteins zu geben, die für den Transport des Proteins ins Endoplasmatische Retikulum (ER) notwendig ist (Heske et al., 2004). Im N- terminalen Bereich des Proteins gibt es mehrere Octapeptid- Wiederholungen, an denen Kupfer- Ionen gebunden werden können (Prusiner, 1998). In der Sequenz des Prionproteins gibt es nur zwei Cysteinmoleküle (Positionen 179 und 214, die Zählung basiert auf der humanen Sequenz), zwischen denen eine Disulfidbrücke ausgebildet wird. An den Asparaginresten 182 und 198 sind zwei N- Glykosylierungsstellen, an denen verzweigte Zuckerketten angehängt sind. Man findet dabei sowohl unglykosylierte, als auch mono- und diglykosylierte Formen des Proteins.

Abbildung 3: Schematische Darstellung des Prionprotein- Moleküls



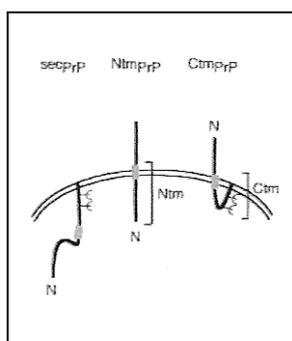
Der Bereich AS 113- AS 135 ist sehr hydrophob und scheint in manchen PrP Isoformen als Transmembrandomäne fungieren (Hedge et al., 1999; Hölscher et al., 2001).

Das Prionprotein wird in drei topologischen Formen (Abb. 4) an der Membran des ER synthetisiert: PrP^C oder SecPrP (wird vollständig transloziert und ist über den GPI-Anker in der Membran verbunden) und zwei Formen, die über die Transmembrandomäne in entgegengesetzten Orientierungen in der Membran des ER verankert sind, das NtmPrP (der N- Terminus zeigt ins ER- Lumen) und das CtmPrP (der C- Terminus zeigt ins ER- Lumen) (Hölscher et al., 2001).

CtmPrP verursacht Neurodegradation, unabhängig von PrP^{Sc}- Akkumulation, Gehirnhomogenat (HH) von CtmPrP- erkrankten Mäusen ist nicht infektiös (Hedge et al., 1999).

In manchen Zellkulturen (humane Neuroblastomzellen und CHO) interagiert CtmPrP mit Zytokinen und stört die Zytokinese und die Karyogenese durch *cis*- und *trans*-abhängige Faktoren (Gu et al., 2006).

Abbildung 4: Schematische Darstellung der drei topologischen Formen des Prionproteins an der ER Membran



Aus: Hölscher et al., 2001

Das reife Prionprotein umfasst die AS 23– 231 (Abb. 3 B). Die N- terminale Signalsequenz für die posttranslationellen Modifikationen im ER und die C- terminale Signalsequenz für die Anheftung des GPI- Ankers sind abgespalten.

Der Protease- resistente Bereich, der nach Proteinase K- Behandlung von PrP^{Sc} übrig bleibt, wird PrP 27–30 genannt (Abb. 3 C), da dieses N- terminal verkürzte Protein im Western blot eine Größe von 27 bis 30 kDa hat.

1.5.2) Sekundärstruktur:

Durch die Aufreinigung von PrP^C und PrP^{Sc} unter denaturierenden Bedingungen konnten die Sekundärstrukturen der beiden Isoformen studiert werden (Pan et al., 1993). Es stellte sich heraus, dass PrP^C etwa zu 42% aus α - Helixen besteht und kaum β - Faltblattstrukturen aufweist (3%). PrP^{Sc} dagegen weist ungefähr 43% β - Faltblattstrukturen auf und deutlich weniger α - helikale Bereiche (32%). PrP 27-30 besteht aus 47% β - Faltblattstrukturen und aus nur 17% α - Helixen (Caughey et al., 1991).

Unterschiede zwischen PrP^C und PrP^{Sc} sind nur in den physikalischen Eigenschaften der beiden Isoformen zu finden. PrP^C ist in milden Detergentien löslich, sensitiv gegen Proteinase K- Verdau und zeigt eine hauptsächlich α - helikale Sekundärstruktur. PrP^{Sc} ist in milden Detergentien unlöslich, liegt also aggregiert vor, ist teilweise PK-resistent und hat eine überwiegend β - Faltblatt- reiche Sekundärstruktur (Pan et al., 1993).

Die Einlagerung von PrP^C in Liposomen verursachte weitere Änderungen in der Struktur des Proteins. Liposomen- verpacktes PrP^C hatte zu 34% β - Faltblatt- Struktur, 20% α - Helixen, und die restlichen 46% sind unstrukturiert. In Liposomen eingelagertes PrP 27-30 enthielt gar keine α - Helixen mehr. Die Insertion von PrP 27-30 in Membranen führt zur Unterbrechung der Membranintegrität, wahrscheinlich durch das teilweise Eindringen in die Lipiddoppelschicht (Baron et al., 2002). Diese PrP- Membran- Interaktionen sind wichtig, berücksichtigt man die scheinbar notwendige Membranfusion bei der PrP^{Sc}- Synthese (Baron et al., 2002).

Veränderungen in den Bereichen, die den hochstrukturierten Bereich der Disulfidbrücke im C- Terminus umgeben, können zu thermodynamischer Instabilität und Strukturverlust führen. (Cappai und Collins, 2004).

Der Polymorphismus an Codon 129 beeinflusst die Protease- Spaltstelle im AS- Bereich 74- 102 und das Ausmaß an β - Faltblattstrukturen in PrP^{Sc} (Parchi et al., 2000). Zusätzlich beeinflusst dieser Polymorphismus die Anfälligkeit bzw. Resistenz für nvCJD (Aguzzi, 2006) und scheint beim Menschen einen Einfluss auf die Ausbildung des Langzeitgedächtnisses zu haben (Papassotiropoulos et al., 2005).

1.5.3) Tertiärstruktur von PrP^C:

Die Tertiärstruktur von PrP^C konnte durch NMR- Studien von rekombinanten Prionproteinen aus *E. coli* aufgeklärt werden. Bakteriell exprimiertes rekombinantes PrP ist weder glykosyliert noch besitzt es einen GPI- Anker, ist löslich und hat eine α - helikale Struktur, weshalb es als PrP^C- ähnlich angesehen wird. Die NMR- Strukturen einer Reihe rekombinanter Prionproteine aus verschiedenen Säugetieren sind inzwischen bekannt (Maus: Riek et al., 1996; Hamster: James et al., 1997; Donne et al., 1997). Diese Studien ergaben, dass PrP^C einen unstrukturierten N- terminalen Bereich (Maus: AS 23- 119) und eine globuläre C- terminale Domäne hat (Abb. 5 A, unten). Die C- terminale Domäne besteht aus drei α - helikalen Bereichen (Maus: Helix 1 AS 143- 153, Helix 2 AS 171- 192 und Helix 3 AS 199- 226) und zwei kurzen, antiparallel orientierten β - Faltblatt- Strukturen (Maus: S1 AS 128- 130, S2 AS 160- 162). Bei allen bislang untersuchten Prionproteinen verschiedener Spezies ist diese Struktur bis auf geringe Differenzen (beispielsweise Länge der α - helikalen Bereiche) gleich (Norstrom und Mastrianni, 2006). Aktuellere Studien deuten darauf hin, dass Helix 1 eine wichtige Rolle bei der Konformationsänderung von PrP^C zu PrP^{Sc} spielt (Norstrom und Mastrianni, 2006). Helix 1 ist ungewöhnlich hydrophil (Abb. 5 A, oben) und nicht sehr stark mit dem restlichen Molekül verbunden. Es ist auffällig, dass die meisten geladenen Bereiche von Helix 1 auf der dem globulären Bereich abgewandten Seite liegen. Helix 2 und 3 dagegen sind hydrophob und über die Disulfidbrücke miteinander verknüpft (Abb. 5 A, unten).

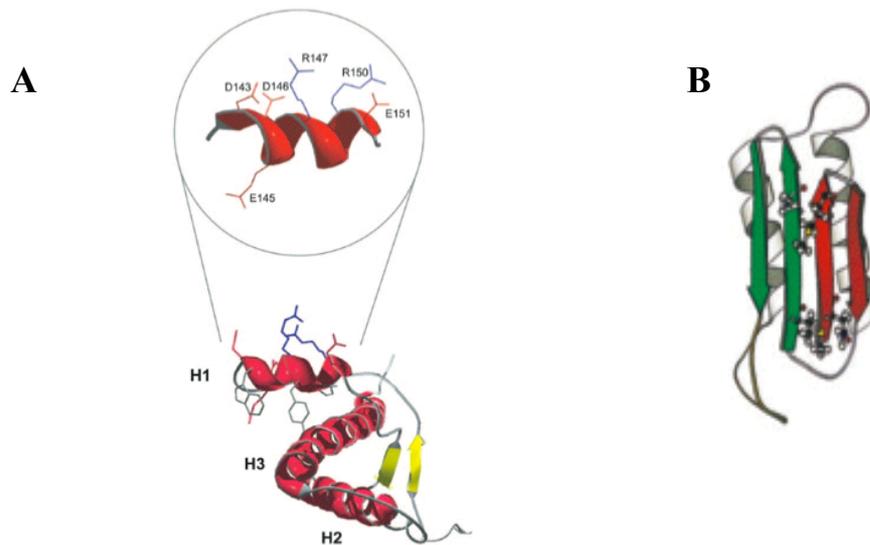


Abbildung 5: Struktur des Prionproteins

A: Helix 1 und ihre geladenen AS (blau: basisch; orange: sauer) in Kontext mit dem gesamten Molekül PrP^C (nach Norstrom und Mastrianni, 2006) **B:** Modell der Tertiärstruktur von humanem PrP^{Sc} (Huang et al., 1996).

Bei der abnormen Isoform des PrP beschränken sich die Strukturanalysen auf Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse. Die Tertiärstruktur von PrP^{Sc} (Abb. 5 B) kann nur vermutet werden. Neuere Untersuchungen, die sich auf elektronenmikroskopische Untersuchungen stützen, ergaben, dass PrP 27-30 eventuell keine antiparallelen β -Faltblätter, sondern parallele β -Faltblätter im Bereich AS 90 bis 170 ausbildet (Wille et al., 2002). Das gezeigte Modell beruht auf Computer-gestützten Vorhersagen und Berechnungen aus den vorhandenen genetischen und molekularbiologischen Daten mit antiparallelen β -Faltblättern. (Huang et al., 1996).

1.6) Prion- Stämme und Speziesbarrieren

Die Existenz zweier verschiedener Scrapiestämme („nervous“ und „scratching“) in mit Scrapie infizierten Ziegen wurde 1961 erstmals von Pattison und Millson beschrieben (Pattison, 1972). Verschiedene Scrapie- „Stämme“ haben ihren Ursprung in verschiedenen Feld- Isolaten, die fortlaufend in verschiedenen Mausinzuchtlinien passagiert wurden (Pattison, 1972). Sie lassen sich klinisch durch ihre unterschiedlichen Inkubationszeiten und durch ihre verschiedenen Läsions- Muster in betroffenen Geweben nachweisen. Auch biochemisch kann man die verschiedenen Stämme durch ihre verschiedenen elektrophoretischen Laufmuster, durch die unterschiedli-

chen Protease- Schnittstellen und durch ihre unterschiedlichen Glykosylierungen voneinander unterscheiden. Die beiden transmissiblen Nerz- Enzephalopathie- Stämme hyper (HY) und drowsy (DY) können in Hamstern und im zellfreien System (Mulchay und Bessen, 2004) passagiert werden und behalten dabei ihre unterschiedlichen Eigenschaften (DY PrP^{Sc} ist beispielsweise sensitiver für Protease- Verdau als HY PrP^{Sc}). Diese Eigenschaften bleiben auch nach seriellen Passagen in der Maus (Asante et al., 2002; Tremblay et al., 2004) und in persistent infizierten Zellkulturen erhalten (Birkett et al., 2001). Bislang gibt es keinen Beweis dafür, ob die Unterschiede in der Konformation von PrP^{Sc} der Grund oder nur eine Manifestation des Phänomens der Prion- Stämme sind (Tanaka et al., 2004; Tanaka et al., 2006).

Versucht man, eine Spezies mit PrP^{Sc} einer anderen Art zu infizieren (oder in zellfreien Systemen zu konvertieren), so ist eine Speziesbarriere zu beobachten. Der Empfängerorganismus (das Empfänger- PrP^C) ist entweder komplett resistent gegen eine PrP^{Sc}- Infektion oder die Inkubationszeit bis zum Auftreten der Krankheitssymptome ist deutlich verlängert, die Übertragung von PrP^{Sc} innerhalb einer Spezies ist dagegen hocheffizient. Passagiert man PrP^{Sc} dann in der Empfänger- Spezies weiter, so verkürzen sich die Inkubationszeiten wieder (Kocisko et al., 1995).

Vertreter der Virus- oder Virinotheorie versuchen das Auftreten dieser Speziesbarrieren mit einem Agens mit mutierbarem DNA- oder RNA- Genom zu erklären. Weissman (1991) postulierte, dass zwar das Prionprotein für die Infektiosität notwendig ist, aber die Stamm- Spezifität durch kleine Nukleinsäuren festgelegt wird. Bislang konnte keine spezifische Nukleinsäure identifiziert werden, die mit infektiösen Präparationen von PrP^{Sc} konsistent in Zusammenhang steht, aber RNA könnte dabei helfen, die Konversion von PrP^C zu PrP^{PRES} (PrP^{PRES} ist partiell proteaseresistent, muß aber nicht zwangsläufig infektiös sein) *in vitro* zu katalysieren (Deleault et al., 2003). Der endgültige Beweis für die „Protein- only“- Theorie, die *de novo* Generation von PrP^{Sc} (proteaseresistentes und infektiöses PrP) *in vitro*, konnte ebenfalls noch nicht erbracht werden. 2001 wurde ein neues *in vitro* Konversionssystem publiziert (Saborio et al., 2001), das einen essentiellen Teil der „Protein- only“- Theorie bestätigt. Die Konversion von zellulärem Prionprotein in seine infektiöse Isoform ist ein zyklischer Prozess, bei dem PrP^{Sc} die weitere Fehlfaltung von Prionprotein auslöst und so zu Neubildung von PrP^{PRES} (Bieschke et al., 2004) oder PrP^{Sc} führt (Castilla et al., 2005).

1.7) Physiologische Funktion des Prionproteins

Die genaue Funktion des zellulären Prionproteins bleibt unklar. Es wurde mit der Überlebensfähigkeit der Zellen in Verbindung gebracht, mit dem Auswachsen von Neuronen, mit dem Modulieren synaptischer Interaktionen und mit dem Kupferhaushalt (Cappai und Collins, 2004).

Potentielle prionbindende Proteine sind die Zelladhäsionsproteine N-CAMs, der Laminirezeptor, das Streß- induzierte Protein 1, Synapsin Ib und Grb2. Wenn diese bindenden Proteine PrP- Liganden sind, könnte das PrP als ein Zell- Oberflächenrezeptor fungieren, der bei der Signaltransduktion beim Überleben der Zelle eine Rolle spielt (Cappai und Collins, 2004).

Mallucci et al. (2002) zeigten, dass der post- natale Knockout des Prionproteins in Mäusen keine Schäden verursacht. Sie postulierten eine Rolle des Prionproteins bei der Anregung von Nerven, da eine signifikante Verlangsamung der AHPs in hippocampalen CA1- Zellen nach dem Knockout festzustellen war.

Das Prionprotein kann Kupfer binden. Cerebrale Zellen, denen PrP^C fehlt, sind anfälliger für oxidativen Streß als wildtypische Zellen. Verbindet man den N- Terminus des Proteins zusätzlich zum GPI- Anker mit der Membran, so sind humane Neuroblastom- Zellen, die diese PrP- Mutante exprimieren, anfälliger für oxidativen Stress und weniger lebensfähig als Zellen, die gar kein zelluläres PrP exprimieren. Der N- terminale Bereich könnte daher als mobiles Signalmolekül fungieren (Zeng et al., 2003). Es wurde vermutet, dass zelluläres PrP als Shuttle für Kupferionen, die Enzyme gegen oxidativen Stress binden sollen, fungiert (Martins, 1999).

Die Generierung von PrP^{0/0}- Mäusen lies keine eindeutigen Rückschlüsse auf die physiologische Funktion des Prionproteins zu. Es wurden verschiedene PrP^{0/0}- Mauslinien generiert (zusammengefasst von Weissmann und Aguzzi, 1999). Bei zwei der PrP^{0/0}- Mauslinien wurde nur die PrP kodierende Sequenz unterbrochen. Diese Mäuse verhielten und entwickelten sich im Großen und Ganzen normal. Bei später generierten PrP^{0/0}- Mäusen wurden zusätzlich Bereiche hinter dem PrP ORF deletiert. Diese Mäuse zeigten im Alter von 70 Wochen einen abnormen Gang und Koordinationsstörungen. Histologische Untersuchungen ergaben einen ausgedehnten Verlust von Purkinje- Zellen im Kleinhirn dieser Mäuse (Sakaguchi et al., 1996). Die genauere Untersuchung dieser PrP^{0/0}- Mauslinien führte zu der Entdeckung eines

paralogen Proteins von PrP, dem Doppelprotein (Moore et al., 1999). Doppel (Dpl) wird in den Gehirnen solcher PrP^{0/0}- Mäuse überexprimiert und induziert dort apoptoseartige Veränderungen (Anderson et al., 2004). Durch Zuführung von PrP kann dieser Effekt aufgehoben werden (Moore et al., 2001). PrP und Dpl sind in ihrer AS-Sequenz und Struktur ähnlich. Beide Proteine sind über einen GPI- Anker membranverankert und können Kupfer- Ionen binden, jedoch ist die physiologische Bedeutung noch unklar (Qin et al., 2006). Trotz dieser strukturellen Ähnlichkeiten scheinen die beiden Proteine antagonistische Wirkungen zu haben. Dpl aktiviert Caspase- 10-vermittelte Apoptose in transgenen Mäusen und Zellkulturen (Qin et al., 2006), wobei PrP^{0/0}- Zelllinien anfälliger als PrP exprimierende Zelllinien waren (Kuwahara et al., 1999). Entweder ist PrP ein spezifischer Antagonist von Dpl, oder PrP hat eine allgemein anti- apoptotische Funktion.

Für die anti- apoptotische Wirkung von zellulärem Prionprotein spricht ebenfalls, dass die Region der Octapeptid- Wiederholungen im N- Terminus des Proteins eine limitierte Strukturhomologie zu der BH2- Domäne der Bcl-2 Proteine hat (Bounhar et al., 2001). Bcl-2 Proteine sind zentral an der Regulation der Apoptose beteiligt. Die BH2- Domäne ist essentiell für die anti- apoptotische Wirkung des Proteins und für seine Wechselwirkung mit Bax- Protein. Bounhar et al. (2001) zeigten, dass PrP Zellen genauso effizient vor der Bax- gesteuerten Apoptose schützen kann, wie die Bcl-2 Proteine. Eliminiert man die Region der Octapeptid- Wiederholungen des Prionproteins, geht dieser schützende Effekt verloren, wohingegen der GPI- Anker nicht benötigt wird.

Zelluläres Prionprotein wird vor allem im Zentralen Nervensystem (ZNS) exprimiert, aber auch in nicht- neuronalen Geweben. In den Epithelzellen der bovinen Milchdrüse wird das Protein selektiv exprimiert, in besonders starken Leveln an der basolateralen Oberfläche dieser Zellen, wenn sie funktional aktiv sind (Didier et al., 2006). Das Protein scheint eine Rolle im interzellulären Kalzium- Gleichgewicht zu spielen und bewirkt eventuell dadurch einen erhöhten Schutz der Laktozyten während der Milchsekretion.

Papassotiropoulos et al. (2005) wiesen PrP^C eine Rolle beim humanen Langzeitgedächtnis zu. Sie postulierten, dass der Polymorphismus M129V nicht nur für erhöhte Anfälligkeit für die β - Faltblatt- Bildung des PrP verantwortlich ist (Parchi et al., 2000), sondern zu einem besseren Langzeitgedächtnis führt.

1.8) Verschiedene PrP- Expressionssysteme

Der definitive Beweis der „Prion- only“- Theorie wäre entweder die *in vitro*- Generation von infektiösem PrP^{Sc}, mit dem man Wildtyp- Mäuse infizieren kann, die dann eine TSE Erkrankung bekämen, oder infektiöses Prionprotein wieder in die zelluläre, nicht- infektiöse Form zu renaturieren (Prusiner, 1998). Bis heute konnte weder dieses Ziel erreicht, noch die genaue physiologische Funktion von zellulärem Prionprotein geklärt werden, obwohl in zahlreichen verschiedenen Systemen an Prionprotein und seinen Eigenschaften geforscht wurde. Einige dieser Systeme sollen hier kurz dargestellt werden:

1.8.1) Tiermodelle:

Transgene Mäuse werden in der TSE- Forschung überaus häufig eingesetzt und haben zu einem besseren Verständnis der Pathogenese, der Erregerreplikation, der Speziesbarriere und der pathogenetischen Bedeutung bestimmter Mutationen im *Prnp* Gen beigetragen.

Die von Büeler et al. (1992) publizierten PrP^{0/0}- Mäuse lieferten beispielsweise den Beweis, dass PrP^C essentiell für die Infektion mit PrP^{Sc} ist, da diese Mäuse vollständig resistent gegenüber einer TSE- Infektion sind.

Es ist allerdings recht aufwendig und zeitintensiv, transgene Tiere herzustellen und zu züchten.

1.8.2) Zellkultur:

Zellkulturen sind als *in vitro* -Modell für die Vermehrung von PrP^{Sc} optimal, da sie nah an die *in vivo*- Bedingungen von Eukaryoten heranreichen und relativ einfach zu handhaben sind. Allerdings sind die Unterschiede in der Expression und der Glykosylierung des Prionproteins von Zelllinie zu Zelllinie beträchtlich (Monnet et al., 2003) und nur manche Zelllinien sind mit PrP^{Sc} infizierbar (Butler et al., 1988; Monnet et al., 2003; Béranger et al., 2001).

1.8.3) Bakterien:

Die Expression von Prionprotein in Bakterien ist vor allem deswegen von Nachteil, weil die posttranslationalen Modifikationen, die in eukaryotischen Zellen stattfinden, in einem prokaryotischen System nicht stattfinden können und das Prionprotein außergewöhnlich viele posttranslationale Modifikationen erfährt. Der Vorteil ist die relativ schnelle Verfügbarkeit und hohe Ausbeute an rekombinantem Protein.

Da die Glykosylierungen des PrP^C und der GPI- Anker nicht für die Konversion in PrP^{Res} benötigt werden (Kocisko et al., 1995), kann man reifes Prionprotein ohne die N- terminale Signalsequenz AS 1- 22 und ohne die C- terminale Signalsequenz zur Anheftung des GPI- Ankers AS 231- 254 (die AS- Angaben beziehen sich auf das Prionprotein der Maus) in *E. coli* produzieren lassen und die Disulfidbrücke des Proteins reoxidieren (Bocharova et al., 2005; Jackson et al., 1999; Kirby et al., 2003).

Es konnte gezeigt werden, dass auch bakteriell produziertes Prionprotein *in vitro* in eine Proteinase- resistente Isoform konvertiert werden kann (Bocharova et al., 2005; Kirby et al., 2003).

Es wurden bereits Prionproteine mehrerer Spezies (Rind: Negro et al., 1997; Schaf: Baron et al., 1999; Mensch: Jackson et al., 1999; Maus: Kirby et al., 2003, Bocharova et al., 2005; Hamster: Weiss et al., 1995) in Bakterien exprimiert.

1.8.4) Baculo- System:

Das Baculo- Virus- System hat gegenüber der bakteriellen Expression den Vorteil, dass es ein eukaryotisches System darstellt, in dem posttranslationale Modifikationen eukaryotischer Proteine stattfinden können. Das Baculovirus infiziert natürlicherweise Insektenzellen. Arbeitet man mit rekombinantem Virus (in das man ein Ziel- Gen kloniert hat) kann man ähnlich hohe Ausbeuten wie bei bakteriellen Expressionssystemen erhalten. *In vitro* werden *Sf* (*Spodoptera frugiperda*) - Zellkulturen zur Infektion mit dem rekombinanten Virus verwendet.

1995 wurde zum ersten Mal Hamster- PrP in Baculovirus- infizierten Insektenzellen exprimiert (Weiss et al., 1995). Auch die Konversion von rekombinantem und Stamm- spezifischen Prionprotein (Iniguez et al., 2000; Zhang et al., 2002) aus diesem System war bereits erfolgreich.

1.8.5) *In vitro*- Konversionssysteme:

Die *in vitro*- Konversion von Prionprotein ermöglicht exakte Aussagen über die Bedingungen, die gewählt wurden, um eine Konversion von PrP^C zu PrP^{RES} zu erreichen. Auf diese Weise können die verschiedensten Faktoren direkt auf ihre Notwendigkeit für die Konversion überprüft werden. Kocisko et al. (1994) publizierten das erste zell- freie System zur Konversion von PrP^C in PrP^{Sc}. Dieses System wird bis heute mit verschiedenen Abweichungen angewandt, um rekombinante Prionproteine aller Art (Chimären, Fusionsproteine, Deletionsmutanten) in die -Proteinase resistente- Isoform zu überführen (Horiuchi et al., 1999; Jackson et al., 1999; Kim et al., 2005).

Bislang ist kein *in vitro* generiertes PrP^{Res} infektiös (Hill et al., 1999).

Sehr vielversprechend zur *in vitro* Generierung von infektiösem PrP^{RES} ist die von Saborio et al. (2001) entwickelte Methode, die PMCA (protein misfolding cyclic amplification) genannt wurde. Bei dieser Methode dient Gehirnhomogenat von gesunden Tieren als Quelle für PrP^C und wird durch die Zugabe geringer Mengen infektiösen Gehirnhomogenats und wiederholten Inkubations- Beschallungszyklen in die Proteinase K- resistente Isoform überführt. Castilla et al. (2005) wiesen die Infektiosität des mit dieser Methode neugebildeten PrP^{Res} nach.

Seit Publikation dieser neuartigen *in vitro* Konversionsmethode wurden zahlreiche Modifikationen der Methode publiziert (Lucassen et al., 2003; Kim et al., 2005).

Allerdings ist die Methode in ihrer bisherigen Form nicht geeignet, den endgültigen Beweis für die „Protein- only“- Theorie zu erbringen, weil erstens durch den anfänglichen Einsatz von PrP^{Sc} nicht mehr von einer *de novo* Generierung von PrP^{Sc} gesprochen werden kann, und zweitens in den verwendeten Gehirnhomogenaten essentielle Cofaktoren für die Generierung von infektiösem PrP^{RES} vorhanden sein können.

II Ergebnisse

Das Prionprotein ist durch seine Eigenschaft, in bestimmten Konformationen bei Mensch und Tier neurodegenerative Krankheiten zu verursachen bzw. als ein Charakteristikum von TSE- Erkrankungen im Gehirn zu akkumulieren, zum Gegenstand intensiver Forschung geworden.

Es ist ein durch die Evolution hoch konserviertes, mit einem GPI (Glykophosphatidylinositol)- Anker an die Plasmamembran gebundenes Protein, das in verschiedenen Konformationen unterschiedliche biochemische Eigenschaften (Löslichkeit, Sekundärstruktur, Proteinase K- Resistenz) hat. Trotz der seit Jahrzehnten andauernden, intensiven Forschung an der Prion- Thematik sind einige der grundlegenden Fragen, die das Prionprotein betreffen, bis heute nicht geklärt. So konnten beispielsweise weder die physiologische Funktion noch die Mechanismen der Prionprotein-Konversion eindeutig geklärt werden.

Um einige der noch offenen Fragen leichter beantworten zu können, war das Ziel der vorliegenden Arbeit die Generierung eines konvertierbaren, mit einem Reporterprotein fusionierten Prionproteins.

1.) Herstellung von PrP- Reporter-Gen- Konstrukten

Zur Herstellung von infektiösem markierten Prionprotein sollten in einem ersten Schritt Expressionskassetten für Prion- Reporter-Gen- Fusionsproteine hergestellt werden.

Reportergene, die fluoreszieren oder biolumineszieren, sind eine billige Alternative um Echtzeitanalysen von Genexpressionen in Tiermodellen (Nagetiere) zu bewerkstelligen. Bei fluoreszierenden Proteinen wie GFP wird eine externe Lichtquelle benötigt, biolumineszierende Reporterproteine können dagegen Licht mit Hilfe von geeigneten Ko- Substraten produzieren. Durch die Entwicklung und Verbesserung von hoch sensiblen Kameras (CCD- Kameras) kann man auch geringe Mengen an emittiertem Licht aus inneren Organen von Nagetieren detektieren. Die Verwendung von

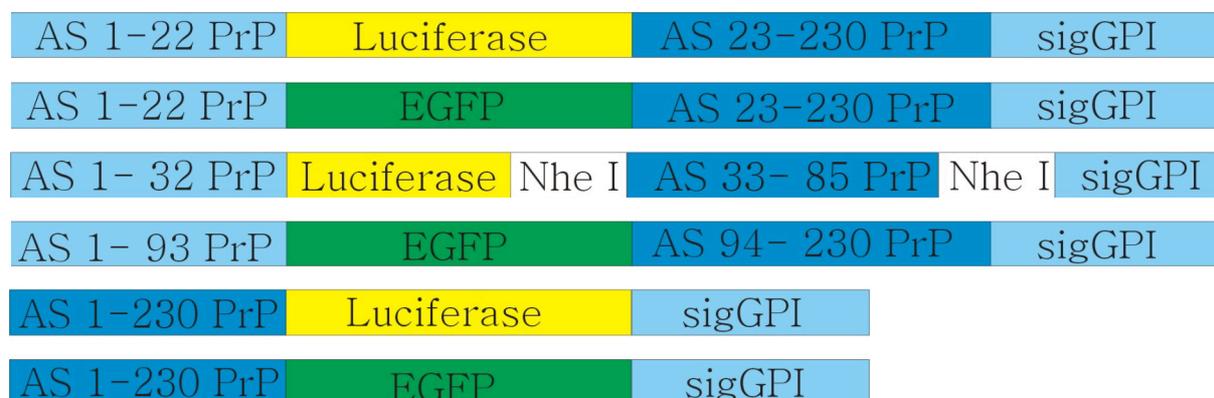
Luciferase oder EGFP als Reporteragen / -protein ermöglicht so die nicht- invasive Detektion von Fusionsproteinen am lebenden Modelltier (Bhaumik und Gambhir, 2002).

Als Reporter Gene wurden das Gen des enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) und das Luciferase- Gen verwendet. Die Fusion des *PRNP* mit *EGFP* ermöglicht den Nachweis des Fusionsproteins durch Fluoreszenz- Mikroskopie bzw. über Western blot Analyse mit Reporterprotein- spezifischen Antikörpern. Durch die Fusion von *PRNP* mit dem Gen der Luciferase können entsprechende Fusionsproteine durch die von Luciferase katalysierte Reaktion (nach Zugabe von Luciferin als Substrat) über einen Luciferase- Assay bzw. ebenfalls über Western blot Analyse mit Reporterprotein- spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden.

Das durch PCR- Mutagenese in die Mausprionsequenz eingeführte 3F4- Epitop (Punktmutationen L108M und V111M) des Hamsterprionproteins ermöglicht es, alle rekombinanten Prion- Reporter- Fusionsproteine über den monoklonalen 3F4- Antikörper (Kascsak et al., 1987) von endogenem murinem Prionprotein zu unterscheiden.

Zur Markierung des Prionproteins wurden zuerst Konstrukte erstellt, die das EGFP- oder Luciferasegen als C- terminale Fusion (AS Position 230) vor der Signalsequenz für den GPI- Anker des Prionproteins enthalten. Des Weiteren wurden Konstrukte erstellt, die die Markerproteine als N- terminale Fusion (AS Position 22 bzw. nur Luciferase nach AS Position 32) in verschiedenen Bereichen des Prionproteins enthalten. Das Gen für das EGFP wurde zusätzlich an AS Position 93 eingeführt, da durch verschiedene Arbeiten (Mella, 2000, Fischer et al., 1996 und Flechsig et al., 2000) kein negativer Einfluss nach Insertion in diesen Bereichen auf die Konversion in die pathologische Isoform des Prionproteins nachgewiesen werden konnte.

Abbildung 6: Schematische Darstellung der über PCR erstellten Prion- Reporter-Gen- Expressionskassetten



Alle Fusionskonstrukte wurden mittels PCR hergestellt. Die entsprechenden Primer wurden so gewählt, dass sie über die Fusionsstelle beider Gene reichen. Die schematische Darstellung des Konstruktzusammenbaus ist am Beispiel von Konstrukt 230egfp in Abb. 7 dargestellt.

Wie in Abb. 7 gezeigt, wurde in der ersten PCR- Runde das rekombinante murine *PRNP* in zwei Ansätzen mit jeweils einem Primer- Paar amplifiziert. In einem der beiden Ansätze wurde der 5`gelegene Abschnitt des ORF bis zu der Stelle, an der das Reporter gen fusioniert werden sollte, mit den Primern A-1 und dem reversen Primer mit dem entsprechenden Überhang vervielfältigt. In dem zweiten Ansatz wurde der 3`gelegene Abschnitt des ORF mit den Primern A-2 und dem entsprechenden seq-Überhangs- Primer amplifiziert. Zusätzlich wurde das gewünschte Reporter gen ebenfalls mit Primern mit den entsprechenden 5`- und 3`- Überhängen amplifiziert. Alle erhaltenen PCR- Produkte wurden in einem 1% -igen Agarosegel auf die richtige Größe hin überprüft und mit dem Nucleospin Extract II Kit (Machery Nagel) aufgereinigt.

In der nächsten PCR- Runde wurden zuerst zwei gereinigte PCR- Produkte als Matrize eingesetzt und mit den randständigen Primern amplifiziert und mit diesem PCR- Produkt und dem dritten PCR- Produkt aus Runde eins als Matrize wurde wiederum mit den randständigen Primern das Fusionskonstrukt amplifiziert. Nach der Überprüfung der Größe des PCR- Produkts und seiner Reinigung wurde das

PCR- Produkt mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Xho*I geschnitten und in den mit *Bam*HI und *Xho*I geschnittenen Vektor pcDNA3 kloniert.

Der Erfolg der Klonierung wurde durch Restriktionsverdau mit *Bam*HI und *Xho*I überprüft.

Konstrukte, deren Restriktionsmuster korrekt war, wurden anschließend durch Sequenzierung überprüft.

1.1) Expressionsanalyse der erstellten Fusionsproteine

a) Expression in humanen oder murinen Zellkulturen

Für Untersuchungen, durch die die verwendeten Fusionsproteine sowie deren Exprimierbarkeit und Expressionsmuster näher charakterisiert werden sollten, war es erforderlich, die Fusionsproteine für die entsprechenden posttranslationalen Proteinmodifikationen (u.a. Glykosylierung, Disulfidbrückenbildung und Anhängen des GPI- Ankers) in einem eukaryotischen System zu exprimieren.

In dem Plasmid pcDNA3 ist den Fusionskonstrukten der starke, konstitutive CMV (Cytomegalievirus)- Promotor vorgeschaltet, mit dessen Hilfe eine dauerhafte, hohe Expression der Fusionsproteine gewährleistet wird. Um zu überprüfen, ob die Fusionsproteine in eukaryotischen Zellen dasselbe Expressionsmuster zeigen, wie das Prionprotein, wurden humane 293- Zellkulturen bzw. murine N2a- Zellkulturen transient mit Prion- EGFP- oder mit Prion- Luciferase- Fusionskonstrukten transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 72 Std. konnten die transfizierten Zellen hinsichtlich Transfektionseffizienz und Expressionsmuster der Fusionsproteine ausgewertet werden.

Die Zellen hatten zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von etwa 40- 50%. Die besten Transfektionsergebnisse wurden mit dem Reagenz Effectene® des Herstellers Qiagen für Zellkulturschalen von 3 cm Durchmesser erzielt.

In beide Zelllinien wurden die Expressionsplasmide 230egfp-pcDNA3, 93egfp-pcDNA3, 22egfp- pcDNA3, 230Luc- pcDNA3, 32Luc- pcDNA3, 22Luc- pcDNA3, sowie als Kontrolle für die Transfektionseffizienz und die Fluoreszenz des EGFP das Expressionsplasmid pEGFP-N3 und als Kontrolle für die Aktivität der Luciferase das Expressionsplasmid Luciferase- pcDNA3 transfiziert. In beiden Kontrollplasmiden stehen die Reportergene ebenfalls unter Kontrolle des CMV- Promotors.

b) Nachweis von PrP- EGFP- Fusionsproteinen im Fluoreszenz- Mikroskop

Die mit EGFP markierten Fusionsproteine konnten nach der Transfektion der entsprechenden DNA in Zellen und der anschließend benötigten Inkubationszeit für die Proteinbiosynthese ohne weitere Bearbeitung direkt unter einem Fluoreszenz- Mikroskop

roskop ausgewertet werden (Abb. 8). EGFP ist eine Variante des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria*, bei dem die Löslichkeit verbessert wurde. Das Protein ist außerordentlich stabil, benötigt keine Cofaktoren für die Fluoreszenz und kann sowohl N-terminal als auch C-terminal mit anderen Proteinen fusioniert werden, ohne dass die Fluoreszenz verloren geht (Chalfie, 1995). Das Emissionsmaximum liegt bei 509 nm. Die Inkubationszeit der transfizierten Zellkulturen wurde auf 72 Std. festgesetzt, da sich diese Inkubationszeit in einer Kinetik als optimal herausstellte.

Die Fusionierung des *EGFP*- Gens mit der Sequenz für den GPI- Anker (Daten nicht gezeigt) ergab, dass die Fluoreszenz des EGFP durch die Membranverankerung des GPI- Ankers nicht beeinträchtigt wird.

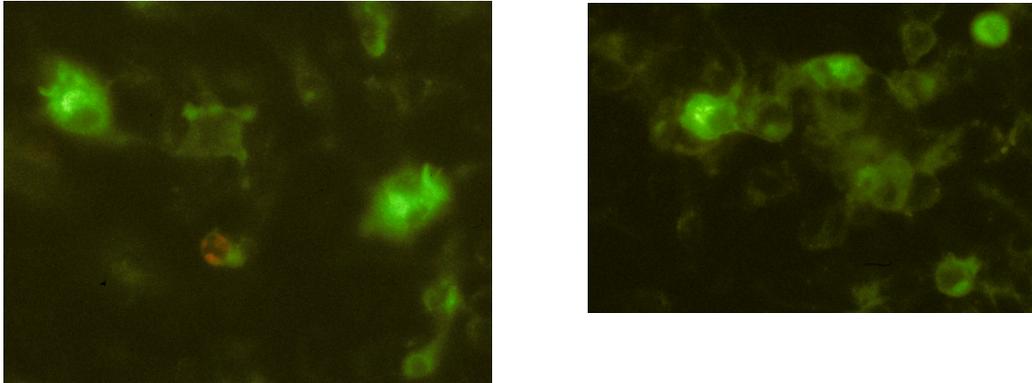
Um den Einfluss des GPI- Ankers auf die Lokalisation der Fusionsproteine zu überprüfen, wurden EGFP- markierte Fusionskonstrukte ohne Signalsequenz für den GPI- Anker erstellt und ebenfalls in 293- und N2a- Zellen transfiziert (Abb. 8 B).

Man sieht einen deutlichen Unterschied zwischen den membranverankerten Fusionskonstrukten mit GPI- Anker (Abb. 8 A) und den Fusionskonstrukten ohne GPI- Anker (Abb. 8 B), die cytosolisch exprimiert werden.

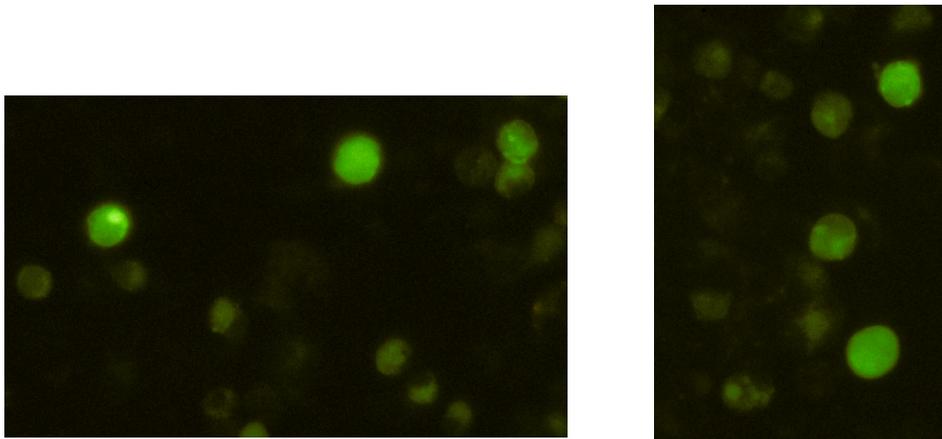
Die Insertion des EGFP an verschiedenen Stellen des Prionproteins bewirkt keine Unterschiede in der Expression der verschiedenen Fusionsproteine.

Abbildung 8: Fluoreszenz- Mikroskopie von in N2a- Zellen exprimierten Prion- EGFP- Fusionskonstrukten mit und ohne GPI- Anker

A



B



A: Expression von Prionprotein- EGFP- Fusionsproteinen mit GPI- Anker. Die membranständige Expression der Fusionsproteine ist deutlich zu erkennen.

B: Expression von Prionprotein- EGFP- Fusionsproteinen ohne GPI- Anker, die erwartungsgemäß cytosolisch exprimiert werden.

c) Nachweis der PrP- Luciferase- Fusionsproteine mit dem Luciferase- Assay

Luciferasen sind eine Gruppe von Photo- Proteinen, die aus verschiedenen Organismen (Insekten, marine Organismen, Prokaryoten) isoliert werden können. Alle Luciferase- Proteine katalysieren eine exogene Reaktion, bei der Sauerstoff mit Luciferase und dem Substrat Luciferin zu einem Luciferase- gebundenem Intermediat reagiert, dass Photonen im Bereich des sichtbaren Lichts (400- 620 nm) emittiert.

Die Funktionalität der Prion- Luciferase- Fusionsproteine wurde nach Transfektion in 293- oder N2a- Zellen über einen enzymatischen Nachweis der Luciferase überprüft. Es wurde hierzu das Luciferase Assay Kit (Promega) verwendet. Die Aktivität von Luciferase kann äußerst empfindlich durch Lumineszenz- Methoden gemessen werden. Der Zellextrakt, der das Luciferase- Prion- Fusionsprotein enthält, wird mit ATP und Luciferin im Luminometer versetzt. Die Reaktion führt zu einer schlagartigen Freisetzung von Photonen, die von Photomultiplier- Detektoren gemessen werden. Dadurch sind relative quantitative Messungen der Luciferase- Aktivität gut durchführbar. Die Messwerte werden in RLU (relative light units) angegeben.

Für das Fusionskonstrukt 230Luc konnte ein erfolgreicher Luciferase- Aktivitätstest durchgeführt werden, die Messwerte (Abb. 9) sind beinahe genauso hoch wie bei der Luciferase- Positivkontrolle (Luciferase- pcDNA3). Für das Konstrukt 32Luc ist die Luciferase- Aktivität etwas geringer und bei dem Konstrukt 22Luc ist die Aktivität der Luciferase auffällig niedrig.

Diese Ergebnisse sprechen für eine sterische Hemmung des Luciferase- Bereichs, wenn der im N- terminalen Bereich des PrPs fusioniert ist, es wurde allerdings keine Normierung hinsichtlich der Transfektionseffizienz der einzelnen Konstrukte durchgeführt. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die Transfektionseffizienz der Fusionskonstrukte 32Luc und 22Luc geringer war, als die Transfektionseffizienz der Positivkontrolle und von 230Luc.

Nicht transfizierte Zellen zeigen keine Reaktion in dem Luciferase- Assay.

Abbildung 9: Darstellung der Luciferase- Aktivität in den einzelnen Konstrukten

PKLuc	230Luc	32Luc	22Luc	N2a
++	++	+	-	--

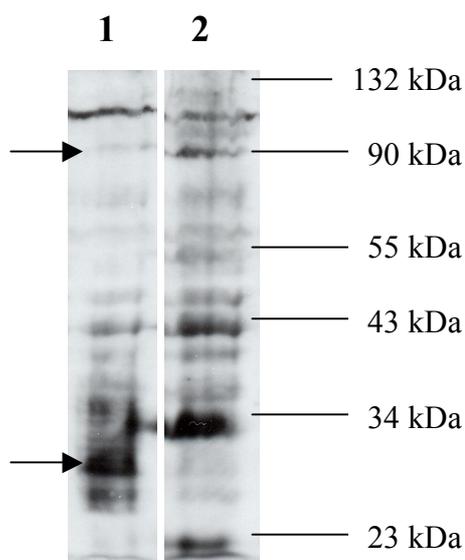
d) Nachweis der Fusionsproteine in der Western blot Analyse

Nach Transfektion der murinen N2a- Zellen mit den PrP- EGFP- oder PrP- Luciferase- Fusionskonstrukten und anschließender Aufarbeitung der rekombinanten Fusionsproteine aus den Zellen wurden die Fusionsproteine in eine SDS- PAGE mit anschließendem Western blot eingesetzt.

Um rekombinante Fusionsproteine aus eukaryotischen Zellen im Western blot nachweisen zu können, musste so viel Zelllysat aufgetragen werden, dass die hohe Gesamtproteinmenge starken Hintergrund verursachte. Abb. 10 zeigt exemplarisch die rekombinanten Proteine 3F4PrP (Spur 1) und 230Luc (Spur 2) nach Expression in N2a- Zellen, die Negativkontrolle ist nicht gezeigt. In beiden Spuren ist der Hintergrund sehr hoch und die Menge an rekombinantem Protein (Pfeile) vergleichsweise gering.

Auch eine vor dem Western blot durchgeführte Immunaффinitätschromatographie mit ProteinG- Sepharose konnte die Nachweisbarkeit von rekombinantem Protein nicht nennenswert erhöhen. Aus diesem Grund wurden die Versuche, aus eukaryotischen, transfizierten Zellen genügend rekombinantes Protein für Konversionsversuche zu erhalten, eingestellt.

Abbildung 10: Nachweis von Fusionsproteinen aus transfizierten N2a- Zellen in der Western blot Analyse am Beispiel von 3F4PrP und 230Luc



In Spur **1** ist rekombinantes 3F4PrP, das aus transfizierten murinen N2a Zellen aufgereinigt wurde, zu sehen (Pfeil unten). Das Protein ist etwa 30 kDa groß.

In Spur **2** ist rekombinantes 230Luc aus transfizierten N2a Zellen zu sehen (Pfeil oben). Dieses Protein ist etwa 90 kDa groß.

e) *In vitro* Transkription und Translation

Zur *in vitro* Transkription der Fusionskonstrukte mit dem Rabbit Reticulolysate System (Amersham Biosciences) mussten die in pcDNA3 vorliegenden Konstrukte von DNA in RNA umgeschrieben werden. Im pcDNA3 Vektor ist 5` der multiplen Klo-

nierungsstelle (MCS) der Promotor für die DNA- abhängige RNA- T7 Polymerase vorgeschaltet. Diese Polymerase erkennt keine Terminationssequenzen, weshalb die Plasmide zuerst 3` der Fusionskonstrukte mit *XhoI* linearisiert wurden. Die linearisierte DNA wurde mit Phenol- Chloroform- Fällung gereinigt und in die T7- RNA- Reaktion eingesetzt. Die erhaltene RNA wurde nochmals mit Phenol- Chloroform gereinigt und in einem denaturierenden Agarosegel überprüft.

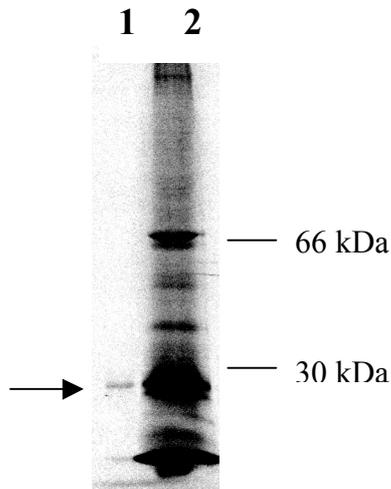
Die getestete RNA der Fusionskonstrukte war im Gel deutlich als eine Bande zu erkennen und nicht degradiert. Dieses Material wurde dann für die *in vitro*- Translation der Fusionsproteine eingesetzt.

Die *in vitro*- Translation der Fusionsproteine erfolgte in Gegenwart von [³⁵S]- Methionin mit dem Rabbit Reticulolysate System® (Amersham Biosciences), so dass die gebildeten Proteine radioaktiv markiert waren und nach Immunpräzipitation mittels Autoradiographie nachgewiesen werden konnten.

Zur Analyse der *in vitro* translatierten Fusionsproteine wurde ¹/₁₀ des 50 µl großen Gesamtansatzes direkt für die Analyse vorbereitet und bei -20°C aufbewahrt. Der restliche Ansatz wurde entweder in eine Konversionsreaktion oder in eine Immunpräzipitation (RIP) eingesetzt.

Es wurde 3F4PrP wie beschrieben *in vitro* transkribiert und translatiert. Das so generierte rekombinante 3F4PrP ist etwa 28 kDa groß (Abb. 11). Mit dem Rabbit Reticulolysate System® können Proteine nicht posttranslational modifiziert werden, daraus erklärt sich die etwas geringere Größe des *in vitro* transkribierten und translatierten 3F4PrP Proteins. Es ist nur eine Bande, die der unglykosylierten Form des Proteins entspricht, zu sehen.

In Abb. 11, Spur 2 ist ¹/₁₀ eines *in vitro* Translationsansatzes direkt aufgetragen. Der restliche Ansatz wurde mit MAK 3F4 immunpräzipitiert. Die Ausbeute an gebundenem Protein mit MAK 3F4 war nach der Immunpräzipitation gering (Abb. 11, Spur 1).

Abbildung 11: Radioimmunpräzipitation mit *in vitro* generiertem 3F4PrP

In vitro translatiertes 3F4PrP (Pfeil) nach Radioimmunpräzipitation.

Spur 1: $\frac{1}{2}$ Ansatz mit ProteinG- Sepharose und MAK 3F4 radioimmunpräzipitiert.

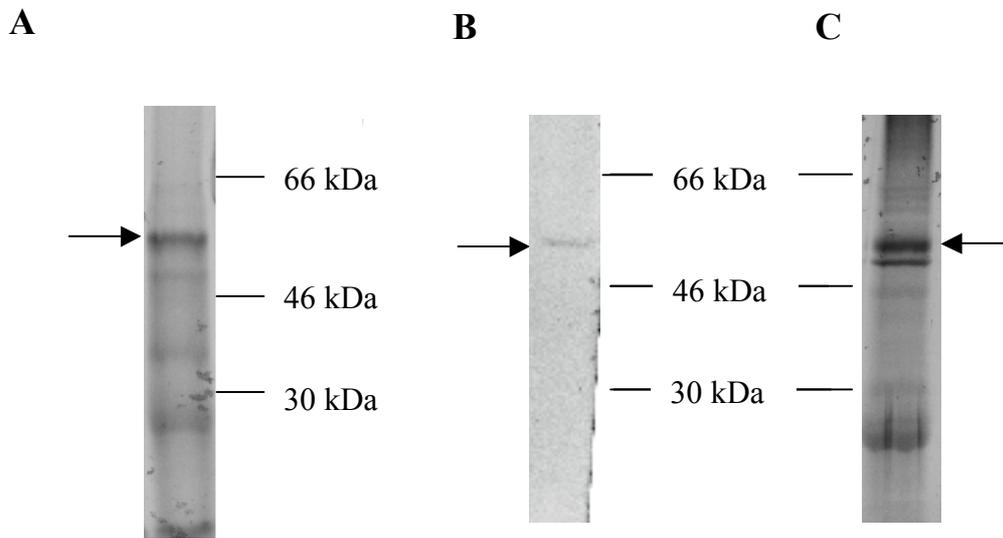
Spur 2: $\frac{1}{10}$ des Gesamtansatzes der *in vitro*- Translation direkt aufgetragen.

In vitro translatierte PrP- EGFP- Fusionsproteine sind ungefähr 58 kDa (Abb. 12 A und Abb. 13, Spur 1: 22egfp, Abb. 12 B: 93egfp und Abb. 12 C: 230egfp, Pfeile) groß und *in vitro* translatierte PrP- Luc- Fusionsproteine sind etwa 88 kDa groß (Abb. 13, Spuren 2 und 3: 22Luc und Abb.13, Spuren 4 und 5: 230Luc).

In Abb. 12 A ist $\frac{1}{10}$ eines *in vitro* Translationsansatzes von 22egfp ohne vorausgegangene Immunpräzipitation aufgetragen, in Abb. 13, Spur 1 ist ein gesamter Translationsansatz von 22egfp mit MAK 3F4 immunpräzipitiert worden. Abb. 12 B zeigt einen gesamten Translationsansatz von 93egfp, der mit MAK 3F4 immunpräzipitiert wurde und in Abb. 12 C ist ein Translationsansatz von 230egfp mit MAK 3F4 immunpräzipitiert worden. Abb. 13 zeigt die *in vitro* translatierten Fusionsproteine 22egfp (Abb. 13, Spur 1), 22Luc (Abb. 13, Spuren 2 und 3) und 230Luc (Abb. 13, Spuren 4 und 5). In Spur 1 ist der mit MAK 3F4 immunpräzipitierte Gesamtansatz der *in vitro* Translation von 22egfp in die SDS- PAGE eingesetzt worden, in Spur 2 ist $\frac{1}{10}$ des Translationsansatzes von 22Luc in die SDS- PAGE eingesetzt worden und in Spur 4 ist $\frac{1}{10}$ des Translationsansatzes von 230Luc aufgetragen. In Spur 3 ist der restliche Translationsansatz von 22Luc mit MAK 3F4 immunpräzipitiert worden, in Spur 5 ist der restliche Translationsansatz von 230Luc mit MAK 3F4 immunpräzipitiert worden. Die spezifischen Proteinbanden in Abb. 13, scheinen von der Menge

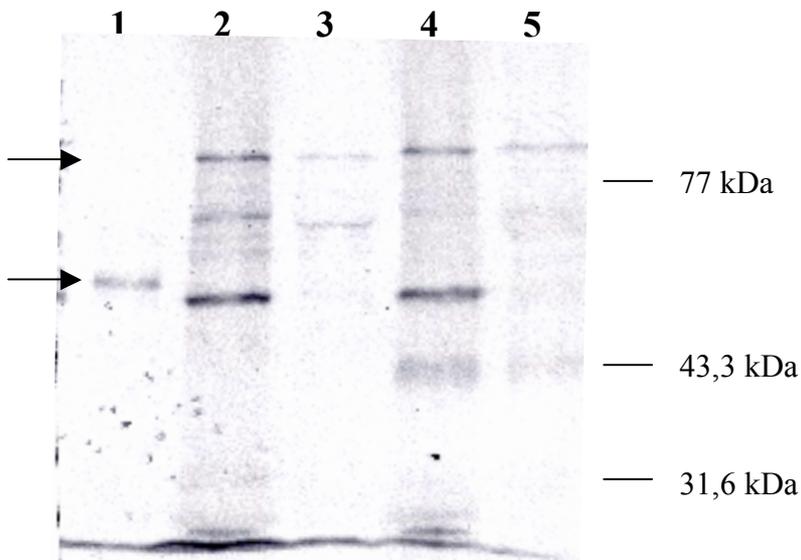
her annähernd gleich zu sein, aber die unspezifischen Hintergrundbanden in den Spuren 1, 3 und 5 sind deutlich geringer als in den Spuren 2 und 4.

Abbildung 12: *In vitro* generierte PrP- EGFP- Fusionsproteine nach Radioimmunpräzipitation



A: *In vitro* generiertes 22egfp. $\frac{1}{10}$ des Gesamtansatzes pur aufgetragen. **B:** *In vitro* generiertes 93egfp nach Radioimmunpräzipitation. **C:** *In vitro* translatiertes 230egfp nach Radioimmunpräzipitation.

Abbildung 13: *In vitro* generierte PrP- Luciferase- Fusionsproteine nach Radioimmunpräzipitation



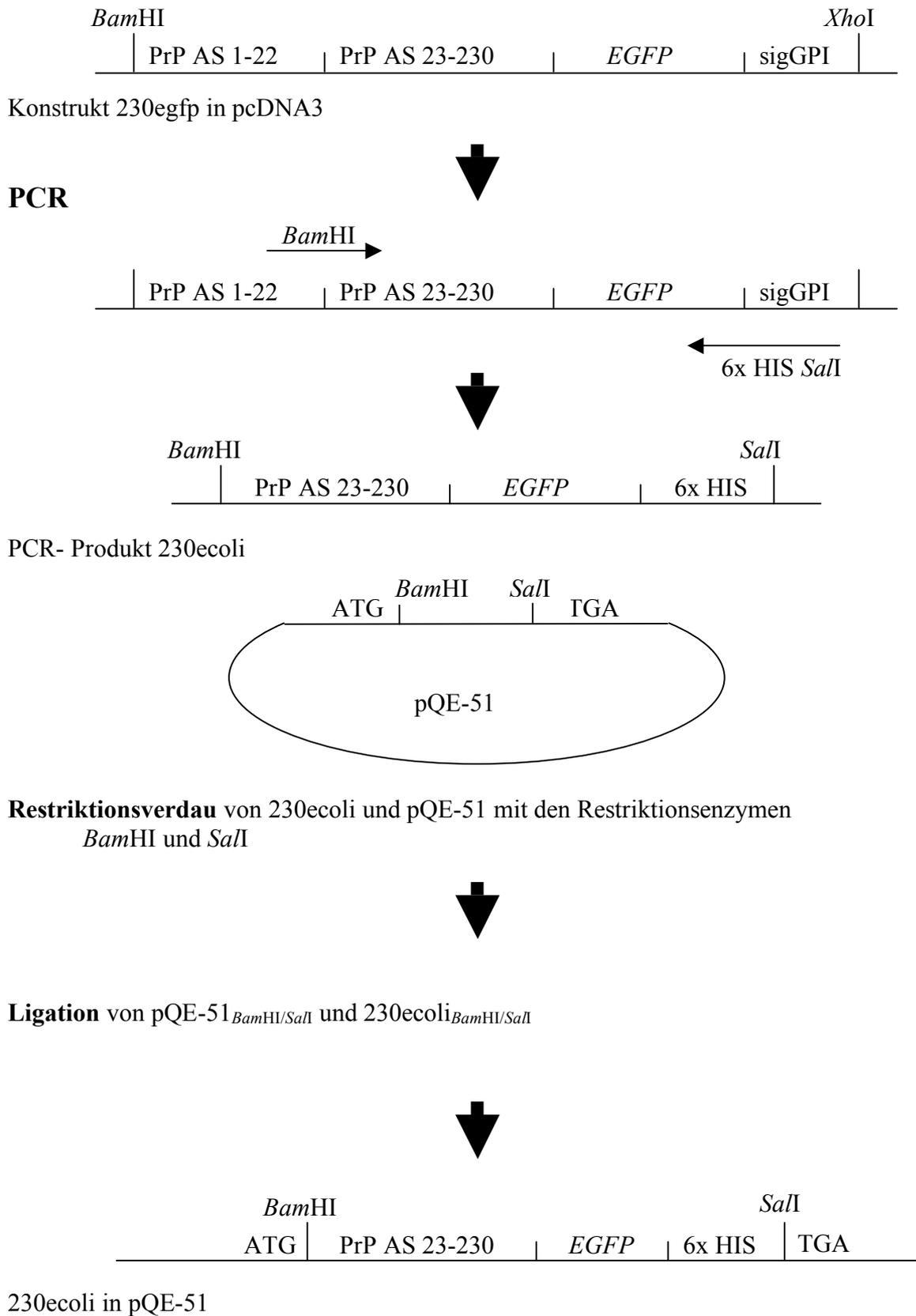
In **Spur 1** ist das Fusionsprotein 22egfp nach RIP mit MAK 3F4 aufgetragen. **Spuren 2 und 3:** 22Luc. In Spur 2 ist $\frac{1}{10}$ der Translationsreaktion direkt aufgetragen, der restliche *in vitro* Translationsansatz wurde mit MAK 3F4 immunpräzipitiert (Spur 3). **Spuren 4 und 5:** 230Luc. In Spur 4 ist $\frac{1}{10}$ der Reaktion direkt aufgetragen, der restliche *in vitro* Translationsansatz wurde mit MAK 3F4 immunpräzipitiert (Spur 5).

2.) Umklonierung der Expressionskassetten aus pcDNA3 in pQE-51

Die bakterielle Expression von Proteinen ermöglicht es, große Mengen des gewünschten Proteins zu generieren. Zur bakteriellen Expression der Prionfusionskonstrukte wurde das QIAexpress System (Qiagen) verwendet. Die Expressionskassetten der Konstrukte wurden bei der Umklonierung aus pcDNA3 in pQE-51 mit einer C-terminalen 6x Histidin-Sequenz versehen (Abb. 14). Mit Poly-Histidin markierte Proteine können nach der Expression über Ni²⁺-NTA Metall-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden.

Das Gen des Prionproteins besitzt eine aminoterminal Signalsequenz von 22 AS, die der Translokation des Proteins in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums dient und dort abgespalten wird (Basler et al., 1986). Die C-terminalen 23 AS (bei murinem PrP) werden im Endoplasmatischen Retikulum durch einen GPI-Anker ersetzt (Stahl et al., 1987). Diese beiden Signalsequenzen des Prion-Gens für die posttranslationalen Modifikationen im Endoplasmatischen Retikulum wurden für die bakterielle Expression der Prion-Fusionsproteine entfernt. Der Vektor pQE-51 enthält strangaufwärts der *Bam*HI Restriktionsschnittstelle ein ATG als Startcodon und strangabwärts der *Sal*I Restriktionsschnittstelle ein Stopcodon im Leseraster. Zur Umklonierung der Fusionskonstrukte aus pcDNA3 in pQE-51 (Abb. 14) wurden die Expressionskassetten mittels PCR amplifiziert. Mit den verwendeten Primern wurden die Restriktionsschnittstellen für *Bam*HI bzw. *Sal*I an den neuen 5'- bzw. 3'-Enden der Expressionskassetten eingeführt und gleichzeitig die aminoterminal und die carboxyterminale Signalsequenz des Prionproteingens deletiert (Abb. 14). Der Reverse-Primer führt 3' der Konstrukte noch eine 6x-Histidin Marker-Sequenz ein (Abb. 14). Anschließend wurden die über ein Agarose-Gel gereinigten PCR-Produkte und der Vektor pQE-51 mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Sal*I verdaut und ligiert. Die so erhaltenen Plasmide wurden in den *E. coli* Stamm XL-1 transformiert, über Restriktionsverdau mit *Bam*HI und *Sal*I überprüft und sequenziert. Zur anschließenden Expression der Fusionsproteine wurden die überprüften Plasmide in den *E. coli* Stamm M15 transformiert.

Abbildung 14: Schematische Darstellung der Umklonierung der Expressionskassetten aus pcDNA3 in pQE-51 zur bakteriellen Expression am Beispiel von 230egfp



2.1) Expressionsanalyse der erstellten Fusionsproteine

a) Bakterielle Expression

Zur bakteriellen Expression der verifizierten PrP- EGFP- Fusionskonstrukte wurden die Expressionsplasmide in den *E. coli* Stamm M15 transformiert. In dem Gesamtzelllysat der mit IPTG induzierten Kultur konnte man im Gegensatz zur nicht induzierten Kultur nach Coomassie- Färbung des PAA- Gels eine deutliche Expression des rekombinanten Proteins feststellen.

Um rekombinantes Protein aus den bakteriellen Einschlusskörperchen (inclusion bodies) isolieren zu können, musste vor der Affinitätschromatographie über eine Ni²⁺-NTA- Säule (Qiagen) eine denaturierende Aufreinigung gemacht werden.

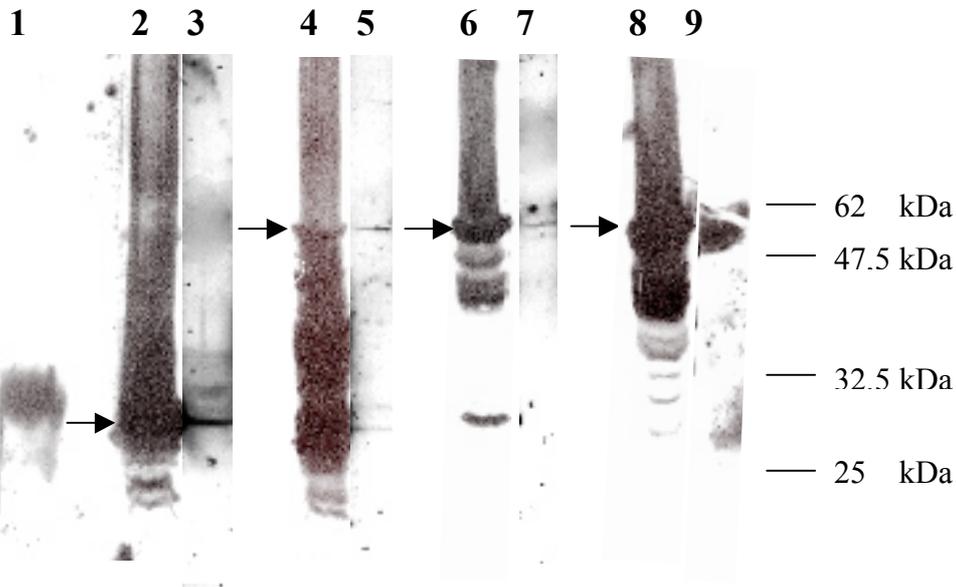
Die Zellen wurden hierfür pelletiert, in Puffer resuspendiert und eine Stunde auf dem Taumler inkubiert. Das Bakterienlysate wurde anschließend 3x 30 Sek. beschallt, wärmebehandelt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde nachfolgend für die Affinitätschromatographie eingesetzt. Die erhaltenen Fraktionen wurden im Western blot auf ihre Reinheit geprüft (Daten nicht gezeigt). Proteinhaltige Fraktionen wurden bei 4 °C gegen PBS dialysiert.

b) Nachweis in der Western blot Analyse

Die bakteriell exprimierten und aufgereinigten PrP- EGFP- Fusionsproteine (22ecoli, 93ecoli und 230ecoli) ließen sich alle im Western blot nach diskontinuierlicher SDS-PAGE mit dem monoklonalen Antikörper 3F4 (Abb. 15), sowie mit den monoklonalen Antikörpern α - HIS (Daten nicht gezeigt) und α - EGFP (Daten nicht gezeigt) bei einer Größe von 60 kDa nachweisen. Das rekombinante Protein PrP3F4coli wurde mit den monoklonalen Antikörpern 3F4 (Abb. 15) und α - HIS (Daten nicht gezeigt) bei einer Größe von etwa 30 kDa nachgewiesen.

Als Positivkontrolle wurden murine Scrapie Assoziierte Fibrillen (SAF), die aus dem Gehirn einer an Scrapie terminal erkrankten Maus isoliert wurden, mit auf die SDS-PAGE aufgetragen und mit MAK W226 detektiert (Abb.15, Spur 1). Anhand dieser Probe ist ein Größenvergleich zwischen dem Proteinase- resistenten Kern des murinen Prionproteins und dem bakteriell exprimierten 3F4coli- Protein möglich (Abb. 15, Spuren 2 und 3).

Abbildung 15: Bakteriell exprimierte Fusionsproteine in der Western blot Analyse



Bakteriell exprimierte PrP- EGFP- Fusionsproteine. In **Spur 1** sind murine, Proteinase K-verdaute SAFs aufgetragen. **Spur 2:** 3F4coli Zelllysate (Pfeil). **Spur 3:** 3F4coli aufgereinigt. **Spur 4:** 22ecoli Zelllysate (Pfeil). **Spur 5:** 22ecoli aufgereinigt. **Spur 6:** 93ecoli Zelllysate (Pfeil). **Spur 7:** 93ecoli aufgereinigt. **Spur 8:** 230ecoli Zelllysate (Pfeil). **Spur 9:** 230ecoli aufgereinigt. **Spuren 2- 10** wurden mit MAK 3F4 detektiert.

Murines, Proteinase- resistentes Prionprotein ist im Western blot bei 27- 30 kDa lokalisiert, bakteriell exprimiertes 3F4coli- Protein dagegen bei knapp 30 kDa. Da bakteriell exprimiertes Protein einen C- terminalen 6xHIS- Anker hat (siehe Abb. 14), aber nicht glykosyliert werden kann und keinen GPI- Anker hat, entspricht diese Beobachtung den theoretischen Erwartungen.

Die mit EGFP fusionierten Prionproteine 22ecoli (Abb. 15, Spuren 4 und 5), 93ecoli (Abb. 15, Spuren 6 und 7) und 230ecoli (Abb. 15, Spuren 8 und 9) lassen sich alle mit MAK 3F4 bei einer Größe von etwa 60 kDa nachweisen. EGFP ist 30 kDa groß, die Größe der Fusionsproteine entspricht den Berechnungen. Alle bakteriell exprimierten Proteine sind im Western blot als einzelne Bande zu erkennen, liegen also wie erwartet unglykosyliert vor. In Abb. 15, Spuren 3, 5, 7 und 9 sind die aufgereinigten Proteine zu sehen. In diesen Spuren sind nur die spezifischen (Fusions-) Proteine nachweisbar. In den Spuren 2, 4, 6 und 8 sind Zelllysate aufgetragen, wodurch sich der hohe Anteil an unspezifischem Hintergrund erklärt.

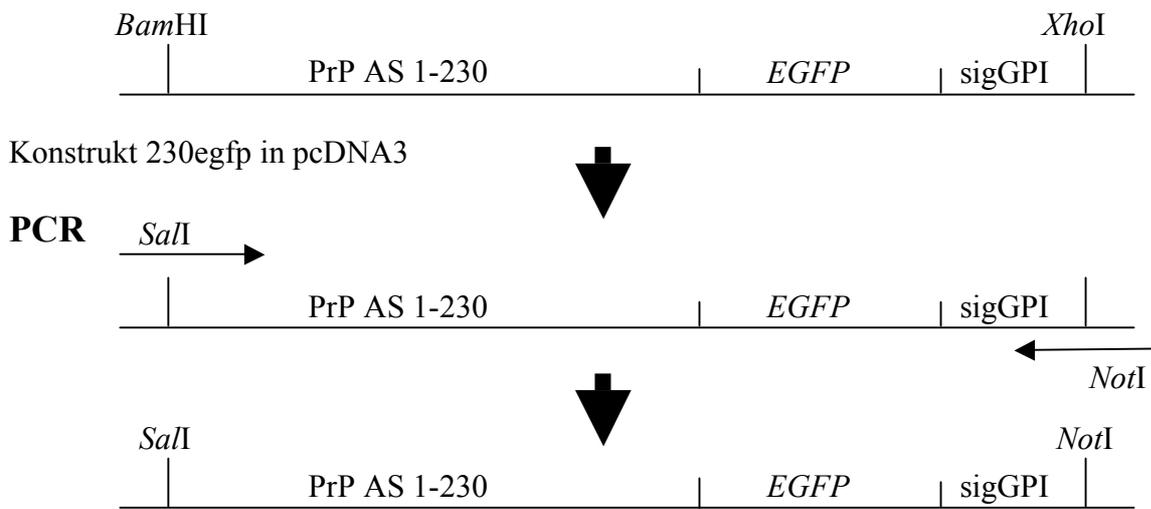
3.) Umklonierung der Expressionskassetten aus pcDNA3 in pENTR4

Um die Fusionsproteine in dem Baculo- Expressionssystem viral exprimieren zu können, das Gateway- System von Invitrogen verwendet.

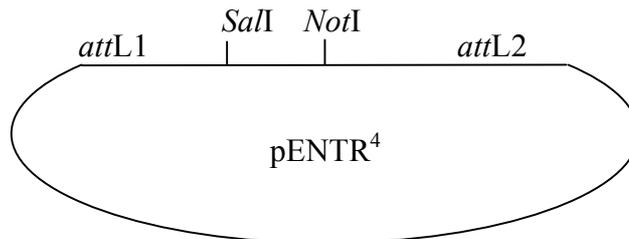
Die Expressionskassetten der rekombinanten Fusionsproteine wurden in den pENTR⁴- Vektor des Gateway- Systems einkloniert. Die Expressionskassetten wurden mittels PCR aus pcDNA3 amplifiziert, wobei durch die verwendeten Primer die Restriktionsschnittstelle für *SalI* bzw. *NotI* an den 5'- bzw. 3'- Enden der Expressionskassetten eingeführt wurde (Abb. 16). Die erhaltenen PCR- Produkte wurden aufgereinigt und, nach Restriktionsverdau der PCR- Produkte und des Vektors pENTR⁴ mit *SalI* und *NotI*, ligiert (Abb. 16).

Zur Kontrolle, ob die eingebauten Fusionsproteinkassetten die richtige Größe besitzen, wurden die über präparative Aufreinigung gewonnenen pENTR⁴- Plasmide mit *Sal I* und *Not I* verdaut und in einem 1% -igen Agarosegel aufgetrennt. Konstrukte, deren Laufmuster im Gel den errechneten Fragmentgrößen entsprachen, wurden mittels DNA- Sequenzierung überprüft.

Abbildung 16: Schematische Darstellung der Umklonierung der Expressionskassetten aus pcDNA3 in pENTR⁴



PCR- Produkt Bac230egfp



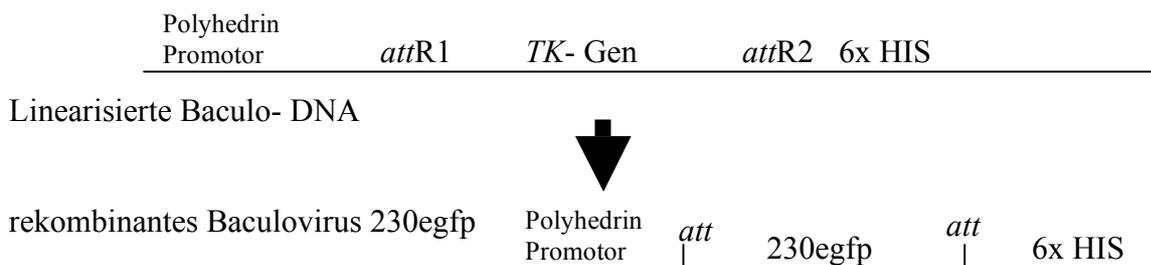
Restriktionsverdau von Bac230egfp und pENTR⁴ mit den Restriktionsenzymen *Sal*I und *Not*I

Ligation von pENTR⁴_{*Sal*I/*Not*I} und Bac230egfp_{*Sal*I/*Not*I}



Bac230egfp in pENTR⁴

+ Gateway® LR Clonase Enzym Mix



3.1) Expressionsanalyse der erstellten Fusionsproteine

a) Virale Expression in Sf9- Insektenzellen

Das Baculo- Expressionssystem ermöglicht die Herstellung rekombinanter Baculoviren, mit denen anschließend Sf9- Insektenzellen infiziert werden können, was zur Expression der im Virus inserierten Fremdgene in den Sf9- Zellen führt. Bei den Insektenzellen handelt es sich um Zellen von *Spodoptera frugiperda*. Diese Sf9- Zelllinie ist ein Isolat von IPLBSF21-AE (O'Reilly et al., 1992).

In diesem Expressionssystem sind posttranslationale Modifikationen von Proteinen möglich, und die inserierten Gene stehen in den rekombinanten Baculoviren unter Kontrolle des starken Polyhedrin- Promotors, wodurch besonders hohe Expressionsraten erzielt werden (Abb. 16). Deshalb schien dieses Expressionssystem zur eukaryotischen Expression der Fusionsproteine besser geeignet als die Expression in Säuger- Zelllinien.

Nach der LR- Reaktion wurde die DNA des rekombinanten Expressionsvirus über Liposomen- vermittelte Transfektion unter „Katalyse“ von Cellfectin® in Sf9- Zellen eingebracht. Nach einer Inkubationszeit von 168 Std. wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und ein Teil auf frische Zellen gegeben, um den Virustiter zu erhöhen.

Die Expression der Fusionskonstrukte in Sf9- Zellen mit dem Baculo- Expressionssystem wurde als Thema einer Diplomarbeit (Fuchs, 2004) im Rahmen dieser Doktorarbeit behandelt.

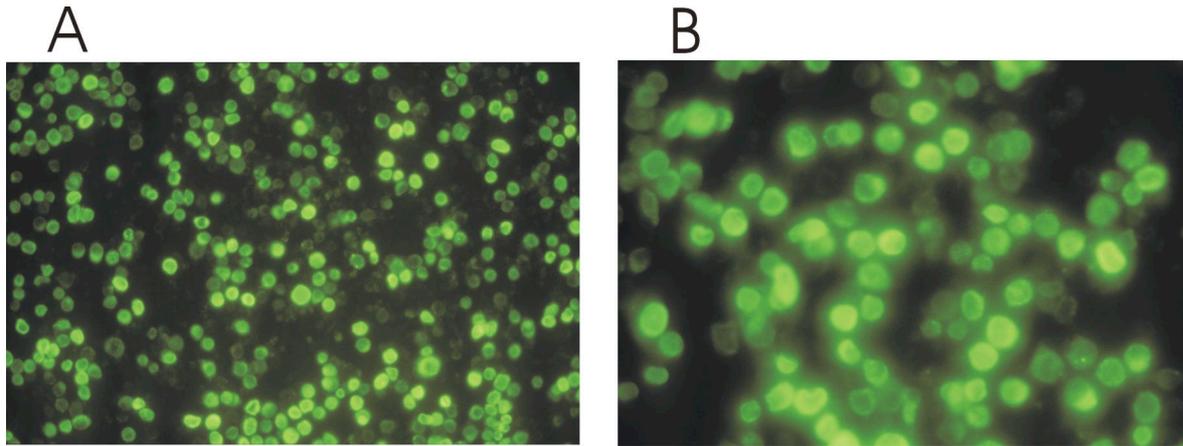
b) Nachweis der PrP- EGFP- Fusionsproteine mittels Fluoreszenz- Mikroskop

Um das Expressionsmuster der EGFP- Fusionsproteine in Sf9- Zellen zu überprüfen, wurden Sf9- Zellen in Six Well- Schalen mit rekombinantem Virus nach Angaben des Herstellers infiziert und für 72 Std. inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium abgezogen und die Zellen unter einem Fluoreszenz- Mikroskop ausgewertet.

Die Fusionskonstrukte 230egfp und 93egfp wurden beide funktional in *Sf9*- Zellen exprimiert (Abb. 17).

Nicht transfizierte Zellen zeigten keinerlei Fluoreszenz.

Abbildung 17: Fluoreszenz- mikroskopische Aufnahmen von mit rekombinatem Baculovirus infizierten *Sf9*- Zellen



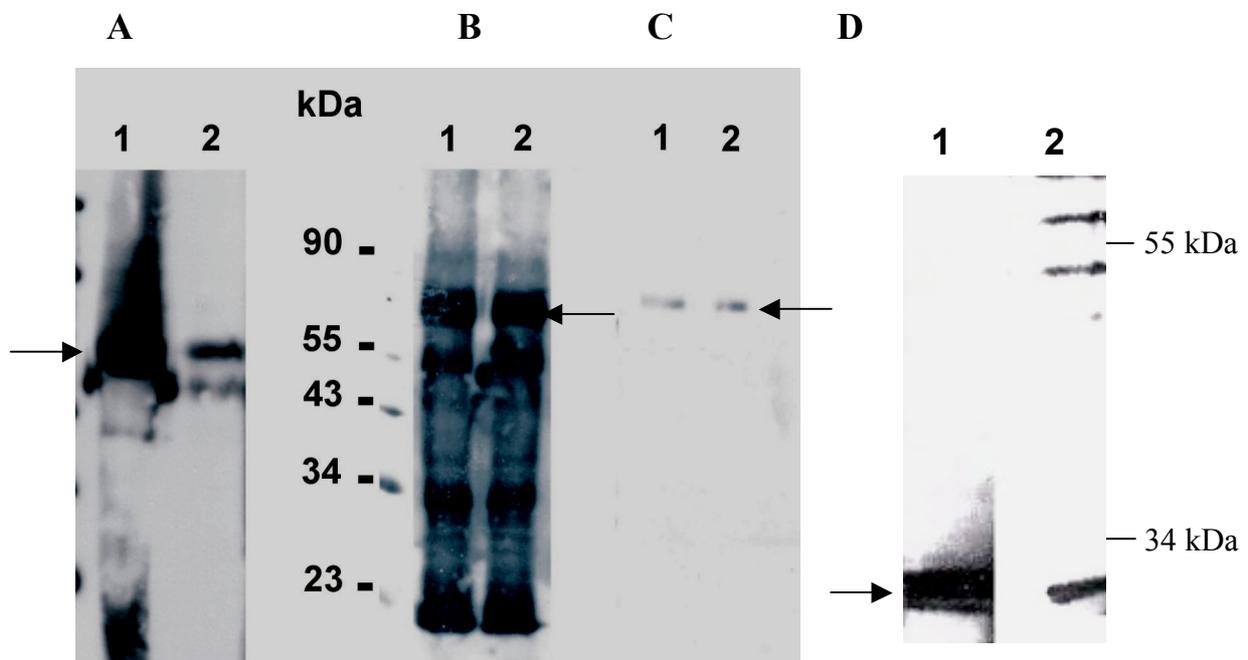
Fluoreszenz- mikroskopische Aufnahmen. **A:** Mit rekombinatem Baculovirus Bac230egfp infizierte *Sf9*- Zellen. **B:** Mit rekombinatem Baculovirus Bac93egfp infizierte *Sf9*- Zellen.

c) Nachweis der Fusionsproteine in der Western blot Analyse

Die in *Sf9*- Insektenzellen viral exprimierten Prionprotein- EGFP- Fusionsproteine mussten vor ihrer Weiterverwendung aus den Zellen isoliert werden. Da die Fusionsproteine einen 6x- Histidin- Marker an ihrem C- terminalen Ende angehängt hatten, konnten sie, wie die bakteriell exprimierten Fusionsproteine, über Ni²⁺- NTA- Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Die hierfür nötige Lyse der Zellen konnte unter nicht- denaturierenden Bedingungen durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurden die infizierten Zellen nach 168 Std. Inkubationszeit lysiert, beschallt und abzentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde direkt für die Affinitätschromatographie eingesetzt, das aus der Zentrifugation resultierende Pellet wurde mit 2% n-Octyl-β-D-Glucopyranosid resuspendiert, nochmals zentrifugiert und der Überstand anschließend ebenfalls für die Affinitätschromatographie eingesetzt. N-Octyl-β-D-Glucopyranosid ist ein Detergenz, das die funktionelle Isolierung von Proteinen aus der Membran ermöglicht. Bei jedem Schritt der Aufreinigung wurde eine Probe entnommen, die anschließend im Western blot auf ihre Reinheit und ih-

ren Proteingehalt überprüft wurden (Daten nicht gezeigt). Nach der Elution des Fusionsproteins mittels Imidazol von der Säule, die in drei Schritten erfolgte, wurden diese Fraktionen über Nacht bei 4 °C gegen PBS dialysiert. Anschließend wurden auch die Eluate im Western blot auf ihren Proteingehalt, ihre Reinheit und die richtige Größe hin überprüft. Verwendet wurden die Antikörper 3F4, α -EGFP und α -HIS (Abb. 18).

Abbildung 18: Western blot Analyse zum Nachweis der viral exprimierten PrP-EGFP- Fusionsproteine



Western blot Analyse zum Nachweis der viral exprimierten PrP- EGFP- Fusionsproteine Bac230egfp (in Spur 1) und Bac93egfp (in Spur 2). **A:** detektiert mit MAK 3F4, **B:** detektiert mit MAK α - GFP, **C:** detektiert mit MAK α - HIS. **D:** Western blot mit Bac3F4PrP. **Spur 1:** Detektion mit MAK α - HIS. **Spur 2:** Detektion mit MAK 3F4.

Für die mit rekombinantem Baculovirus- 230egfp und rekombinantem Baculovirus- 93egfp infizierten *Sf9*- Zellen konnte, wie erwartet, ein spezifisches ca. 60 kDa großes Prionprotein- EGFP- Fusionsprotein mit allen drei spezifischen Antikörpern detektiert werden (Abb. 18 A, B, C, Spuren 1 und 2).

Das rekombinante Baculovirus 3F4PrP ließ sich mit den spezifischen Antikörpern 3F4 (Abb. 18 D, Spur 2) und α - His (Abb. 18 D, Spur 1) bei etwa 30 kDa im Western blot nachweisen.

4.) Konversionsversuche

Das Ziel dieser Arbeit war die Generierung rekombinanter Prionprotein- EGFP- oder Luciferase- Fusionsproteine, die in die pathologische Isoform des Prionproteins konvertierbar sind. Nachdem die rekombinanten Prionproteine in verschiedenen Expressionssystemen auf ihre Exprimierbarkeit hin analysiert wurden, mussten die Proteine anschließend in die pathologische Isoform des Prionproteins konvertiert werden.

Eine hervorstechende Eigenschaft der pathologischen Isoform des Prionproteins ist seine partielle Resistenz gegen den Abbau durch Proteinase K, obwohl inzwischen einige Publikationen belegen, dass der Erwerb teilweiser Protease- Resistenz bei rekombinanten Prionproteinen nicht zwangsläufig zu Infektiosität führt (Hill et al., 1999; Bieschke et al., 2004). Die erworbene Infektiosität von rekombinantem Prionprotein kann nur im Tierversuch endgültig nachgewiesen werden. Es sollte deshalb zuerst der Nachweis erbracht werden, ob die erstellten rekombinanten Prionprotein- Fusionsproteine *in vitro* zumindest in eine Proteinase K- resistente Form (PrP^{RES}) konvertiert werden können.

4.1) Vorversuche zu den Konversionsversuchen

Alle Konversionsreaktionen mit den beschriebenen Fusionsproteinen wurden mit infektiösem, murinem 10% -igen Gehirnhomogenat (PrP^{Sc}) durchgeführt. Die eingesetzten Materialien wurden hinsichtlich ihrer Resistenz gegen Proteinase K- Verdau und auf ihre Reaktivität mit verschiedenen Antikörpern untersucht.

Zur Herstellung von Gehirnhomogenaten (HH) wurde murines Gehirn 1:10 (w/v) mit PBS nach Protokoll homogenisiert (Castilla et al., 2004). Es wurde jeweils Gehirnhomogenat aus einem ganzen Gehirn hergestellt. Das Gehirnhomogenat wurde anschließend für 10 Sek. bei 2000g zentrifugiert und der Überstand wurde bei Bedarf mit den Komponenten für den Konversionspuffer versetzt. Die Gehirnhomogenate wurden aliquotiert und bei - 70 °C gelagert.

Die Gehirne von transgenen PrP^{0/0}- Mäusen wurden in einer 1:4 Verdünnung homogenisiert und als 25% -iges Gehirnhomogenat in Konversionspuffer hergestellt.

Um aus vorhandenen infektiösen Gehirnhomogenaten PrP^{Sc}- Fibrillen (Scrapie Assoziierte Fibrillen, SAF) aufzureinigen, wurde eine modifizierte Version des Protokolls von Hilmert und Diringer (1984) verwendet.

a) Proteinase K- Resistenznachweis von infektiösen, murinen Gehirnhomogenaten

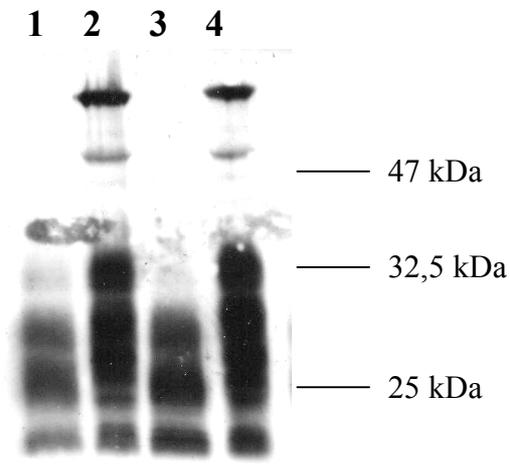
Die infektiösen Gehirne stammten von Balb/c- Mäusen, die intrazerebral mit dem RML PrP^{Sc}- Stamm infiziert worden waren und zum Zeitpunkt des Todes terminal krank waren.

Nach Herstellung von 10% -igem Gehirnhomogenat in PBS wurden je 15 µl der Homogenate mit Proteinase K für 30 Min. bei 37 °C verdaut (Abb.19, Spuren 1 und 3). Die Konzentration des Enzyms im Gesamtansatz betrug 14,7 µg/ml. Zur Kontrolle wurde die gleiche Menge an Gehirnhomogenat ohne Zugabe von Proteinase K inkubiert (Abb. 19, Spuren 2 und 4).

Alle Proben wurden anschließend mit 4x PP versetzt, 10 Min. bei 95 °C inkubiert und im Western blot mit den Antikörpern 12F10 oder W226 analysiert.

Die drei Glykosylierungsformen des Prionproteins (unglykosyliert, monoglykosyliert und diglykosyliert) mit einer Größe von 28 - 33 kDa im unverdauten Zustand (Abb. 19, Spuren 2 und 4) und 27 - 30 kDa nach Proteinase K- Verdau (Abb. 19, Spuren 1 und 3) sind jeweils deutlich zu erkennen. Das Gehirnhomogenat von nicht infizierten Tieren wurde durch die Behandlung mit dieser Konzentration an Proteinase K erwartungsgemäß vollständig abgedaut (Abb. 20 B, Spur 1).

Abbildung 19: Proteinase K- Verdau von Gehirnhomogenaten zum Nachweis von PrP^{Sc}



Die Detektion erfolgte mit MAK W226.

In den Spuren **1** und **2** und **3** und **4** sind Gehirnhomogenate von verschiedenen terminal kranken Mäusen aufgetragen, jeweils einmal ohne Proteinase K- Behandlung (Spuren **2** und **4**) und einmal nach Proteinase K- Verdau (Spuren **1** und **3**).

b) PMCA- Methode mit murinen Gehirnhomogenaten

Die PMCA (protein misfolding cyclic amplification) wurde 2001 von Castilla und Soto publiziert. Sie beruht auf der Annahme, dass infektiöses, fehlgefaltetes Prionprotein (PrP^{Sc}) in der Lage ist, in einem autokatalytischen Prozess zelluläres Prionprotein (PrP^C) in seine abnorme Isoform (PrP^{Sc} oder PrP^{PRES}) zu konvertieren. *In vitro* wird dieser *in vivo* sehr lange dauernde Prozess durch stündliche Beschallung beschleunigt. Für diese *in vitro* Konversionsmethode wird Gehirnhomogenat von gesunden Tieren in Konversionspuffer mit einem geringen Anteil an Gehirnhomogenat von terminal kranken Tieren in Konversionspuffer bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und währenddessen stündlich beschallt.

Veröffentlicht wurde diese Methode mit Gehirnmaterial von Hamstern. Es ist bekannt, dass aus Hamstern generiertes PrP^{Sc} bei Verdau mit Proteinase K stringenteren Bedingungen als murines PrP verträgt (Legname et al., 2004), und dass die PMCA-Methode für die verschiedenen Spezies hinsichtlich Mischungsverhältnis von PrP^{Sc} zu PrP^C, Länge der Inkubationszeiten und Intensität der Beschallungsschritte jeweils angepasst werden muß (Castilla et al., 2004).

Aus diesem Grund wurde diese Methode zuerst an die Bedingungen, die für murines Material optimal sind, adaptiert.

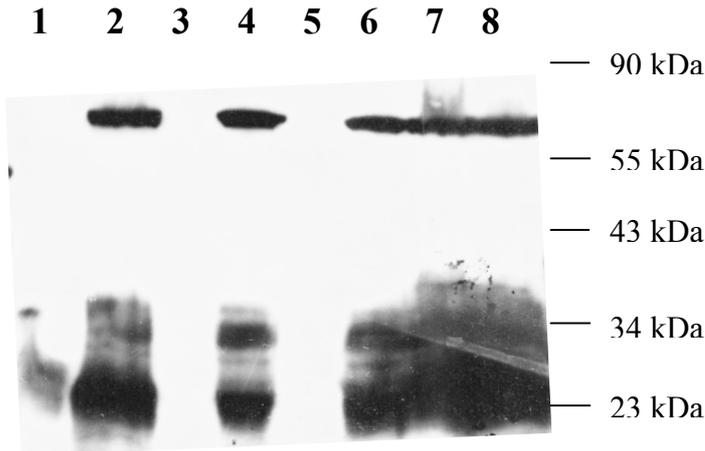
Es wurden verschiedene Verhältnisse von infektiösem Gehirnhomogenat (HH^{Sc}) zu gesundem Gehirnhomogenat (HH^C) (1:10, 1:100 und 1:1000), sowie der Einfluss, den Beschallen auf die Reaktion hat, getestet (Abb. 20 A und B). Während der 24 - stündigen Reaktionszeit bei 37 °C und schütteln, wurde jeweils ein Reaktionsansatz insgesamt 6-mal mit einer Intensität von 20 Watt (nach 3, 6, 21, 22, 23 und 24 Std.) beschallt und je ein Reaktionsansatz nicht. Anschließend wurden 15% der jeweiligen Ansätze Proteinase K verdaut (Endkonzentration des Enzyms: 14,7 µl/ml für 30 Min. bei 37 °C). Danach wurden die Proben im Western blot analysiert, wobei jeder PMCA- Ansatz einmal ohne (Abb. 20 A, Spuren 2, 4, 6, 7 und 8; B, Spuren 3, 5 und 7) und einmal nach (Abb. 20 A, Spuren 1, 3 und 5; B, Spuren 1, 2, 4, 6 und 8) Proteinase K- Verdau aufgetragen wurde. Als Antikörper wurde 12F10 verwendet.

In allen PMCA- Ansätzen ohne vorherigen Proteinase K- Verdau konnte PrP bei 28-33 kDa nachgewiesen werden, in den mit Proteinase K behandelten Proben, in denen PrP^{PRES} detektierbar war (Abb. 20 A, Spur 1; B, Spuren 2, 4, 6 und 8), war das Protein bei 27- 30 kDa zu sehen. Bei den nicht beschallten Ansätzen (Abb. 20 A) konnte nur in dem 1:10 (HH^{Sc} zu HH^C) verdünnten Material nach Proteinase K- Verdau PrP^{Sc} nachgewiesen werden (Abb. 20 A, Spur 1). Das nachweisbare PrP ist vermutlich das in die Reaktion eingesetzte PrP^{Sc}, das durch seine geringe Verdünnung nachzuweisen war. In den nicht beschallten Ansätzen, in denen HH^{Sc} 1:100 (Abb. 20 A, Spur 3) und 1:1000 (Abb. 20 A, Spur 5) verdünnt war, konnte nach Proteinase K- Verdau kein PrP^{PRES} nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu konnte bei allen Reaktionsansätzen, die während der Inkubationszeit beschallt wurden, nach Proteinase K- Verdau PrP^{PRES} mit einer Größe von 27- 30 kDa nachgewiesen werden (Abb. 20 B, Spur 4 (1:10), Spur 6 (1:100) und Spur 8 (1:1000)). Eine Neubildung von PrP^{PRES} hat also stattgefunden und wird durch die Beschallungsschritte während der Inkubation maßgeblich beeinflusst. Zur Kontrolle wurden die eingesetzten Gehirnhomogenate HH^C und HH^{Sc} ebenfalls sowohl ohne Proteinase K- Behandlung (HH^C: Abb. 20 A, Spur 8; HH^{Sc}: Abb. 20 A, Spur 7), als auch nach Proteinase K- Verdau (HH^C: Abb. 20 B, Spur 1; HH^{Sc}: Abb. 20 B, Spur 2) aufgetragen. In beiden Gehirnhomogenaten konnte PrP bei 28 - 33 kDa nachgewiesen werden. Das nicht infektiöse Material (HH^C: Abb. 20 B, Spur 1) war nach Proteinase K- Verdau im Western blot nicht mehr nachweisbar, bei

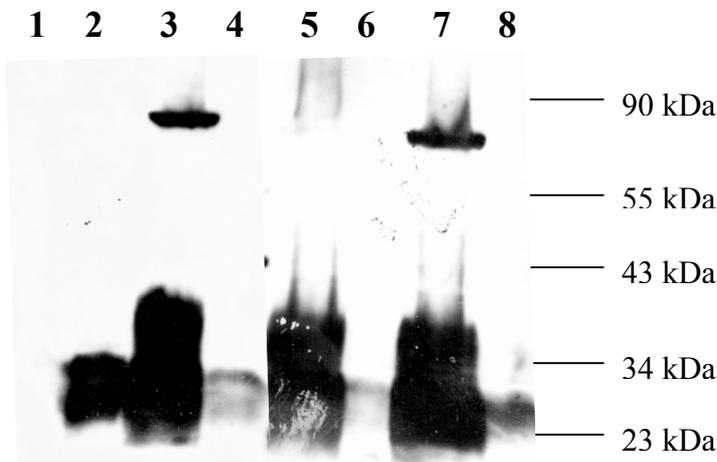
dem infektiösen Material (HH^{Sc}: Abb. 20 B, Spur 2) blieb der Proteinase K- resistente Teil des PrP^{Sc} deutlich nachweisbar.

Abbildung 20: Etablierung der PMCA- Methode mit murinen Gehirnhomogenaten

A



B



Western blot Analyse mit MAK 12F10. **A.** PMCA- Ansätze, die während der 24 -ständigen Inkubation (37 °C, 550 rpm) nicht beschallt wurden. **Spuren 1 und 2:** 1:10 HH^{Sc}:HH^C, **Spuren 3 und 4:** 1:100 HH^{Sc}:HH^C, **Spuren 5 und 6:** 1:1000 HH^{Sc}:HH^C **Spur 7:** HH^{Sc}, **Spur 8:** HH^C. Die Spuren **1, 3 und 5** sind PMCA- Ansätze nach PK- Verdau, die Spuren **2,4,6,7 und 8** sind PMCA- Ansätze ohne PK- Verdau. **B.** PMCA- Ansätze mit Beschallungsschritten während der Inkubation. **Spur 1:** HH^C, **Spur 2:** HH^{Sc}, **Spuren 3 und 4:** 1:10 HH^{Sc} : HH^C, **Spuren 5 und 6:** 1:100 HH^{Sc} : HH^C, **Spuren 7 und 8:** 1:1000 HH^{Sc} : HH^C. Die Spuren **1, 2, 4, 6 und 8** sind PMCA- Ansätze nach PK- Verdau, die Spuren **3, 5 und 7** sind PMCA- Ansätze ohne PK- Verdau.

c) Bestimmung der benötigten Proteinase K Konzentration für PMCA-Versuche mit rekombinantem Protein

Für die PMCA- Methode scheinen bestimmte Faktoren aus den Gehirnhomogenaten essentiell zu sein und der Anteil an HH^C sollte zwischen 85 und 99% des Gesamtansatzes betragen (Castilla et al., 2004). Um dieses System mit rekombinanten Fusionsproteinen simulieren zu können, wurden die rekombinanten Fusionsproteine mit Gehirnhomogenat von transgenen PrP^{0/0}- Mäusen (HH^{0/0}) gemischt und in dieser Form in PMCA- Reaktionen eingesetzt. Gehirnhomogenat von PrP^{0/0}- Mäusen wurde verwendet, da davon auszugehen war, dass bevorzugt murines PrP^C in der PMCA- Reaktion konvertiert würde, falls Gehirnhomogenat von gesunden Wildtypmäusen (HH^C) verwendet worden wäre. Man kann davon ausgehen, dass bei der Konversion von rekombinantem PrP- Fusionsprotein durch wildtypisches Prionprotein ähnliche Schwierigkeiten auftreten wie bei der Konversion von Prionprotein verschiedener Spezies. Deshalb sollte die Gesamtreaktionszeit und die Anzahl der Beschallungen, die für die PMCA- Reaktion mit murinen Gehirnhomogenaten verwendet wurde, erhöht werden. Die Konzentration an Proteinase K wurde für alle PMCA- Versuche neu austitriert, da die Anzahl der Beschallungszyklen einen Einfluss auf die Struktur der Proteine und damit auf die Zugänglichkeit der Proteinase K haben kann.

Für alle PMCA- Reaktionen mit rekombinanten Fusionsproteinen wurde die Konzentration der Proteinase K auf 29 µg/ml heraufgesetzt.

4.2) Konversionsversuche mit den rekombinanten Fusionsproteinen aus den verschiedenen Expressionssystemen

Konversionsversuche wurden mit den in Tab. 1 aufgelisteten rekombinanten Proteinen durchgeführt.

Konstrukt	Viral exprimiert	Bakteriell expri- miert	<i>In vitro</i> translatiert
230egfp	Ja	Ja	Ja
93egfp	Ja	Ja	Ja
22egfp	Nein	Ja	Ja
230Luc	Nein	---	Ja
32Luc	Nein	---	Ja
22Luc	Nein	---	Ja

Tabelle 1: Tabellarische Darstellung der insgesamt erstellten rekombinanten Proteine und mit welchen Konversionsversuche durchgeführt wurden

a) Konversionsversuche mit *in vitro* translatierten Fusionsproteinen

Für die Konversionsversuche von *in vitro* translatierten Fusionsproteinen wurden $\frac{9}{10}$ des nicht aufgereinigten *in vitro* Ansatzes (Gesamtansatz: 50 μ l) mit 1 μ l 10% muHH^{Sc} versetzt und mit Konversionspuffer auf 100 μ l aufgefüllt. Die Konversionsansätze wurden für 24 Std. bei 37 °C im Thermomixer geschüttelt und sowohl mit als auch ohne Beschallen inkubiert (Abb. 21 zeigt Konversionsversuche, die ohne Beschallung durchgeführt wurden). Nach der Inkubation wurden 15 μ l der Reaktion mit Proteinase K (14,7 μ l/ml) für 30 Min. bei 37° C verdaut. Die Proteinase K- Reaktion wurde durch Zugabe von 4x PP und 10 Min. Inkubieren bei 95 °C gestoppt. Der restliche Konversionsansatz von 85 μ l wurde mit Aceton gefällt, in 20 μ l 4x PP resuspendiert und 10 Min. bei 95 °C inkubiert. Alle Reaktionsansätze wurden mittels SDS- PAGE der Größe nach aufgetrennt und über Autoradiographie untersucht (Abb. 21, Spuren 4- 6: 22Luc; Spuren 7- 9: 230Luc). Immer 10% eines *in vitro* Translationsansatzes wurde pur (Abb. 21, Spur 4: 22Luc; Spur 7: 230Luc), 85% eines Konversionsansatzes wurden ohne PK- Verdau (Abb. 21, Spur 5: 22Luc; Spur 8: 230Luc) und

15% eines Konversionsansatzes wurden nach PK- Verdau (Abb. 21, Spur 6: 22Luc; Spur 9: 230Luc) aufgetragen. Da der Nachweis von radioaktiv markierten Proteinen mittels Autoradiographie besonders sensitiv ist und durch die Inkubation von Translationsansätzen mit Gehirnhomogenat ein störender Hintergrund entsteht, wurde nur ein geringer Anteil der Konversionsreaktion Proteinase K verdaut. So sollte ausgeschlossen werden, dass das eingesetzte PrP^{Sc} nach Proteinase K - Verdau in der Autoradiographie nachgewiesen wird.

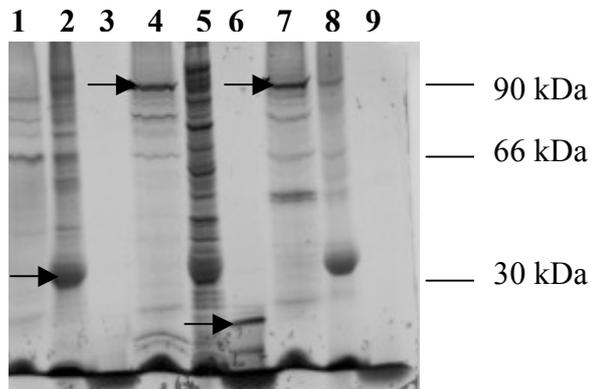
Als Negativkontrolle (NK) für die Konversionsreaktion wurde in einem weiteren Ansatz Reticulozytenlysat ohne RNA inkubiert (Abb. 21, Spur 1) und anschließend wie die *in vitro* generierten Fusionsproteine behandelt (Abb. 21, Spur 2: - PK ; Spur 3: + PK). Mit dieser Kontrolle sollte überprüft werden, ob das eingesetzte HH^{Sc} während der Konversionsreaktion von *in vitro* generiertem Fusionsprotein mit dem Reticulozytenlysat reagiert und dadurch störenden Hintergrund in der Autoradiographie verursacht.

Die Inkubation von HH^{Sc} mit Reticulozytenlysat bewirkt eine radioaktive Markierung von Bestandteilen des Gehirnhomogenates, die in der Autoradiographie sichtbar wird (Abb. 21, Spur 2). Vergleicht man den Hintergrund, den reines Reticulozytenlysat in der Autoradiographie verursacht (Abb. 21, Spur 1), mit Spur 2, in der das reine Reticulozytenlysat mit HH^{Sc} inkubiert wurde, so ist erstens generell mehr Hintergrund zu sehen und zweitens auf der Höhe des zellulären Prionproteins eine deutliche Proteinbande vorhanden. Radioimmunpräzipitation nach Proteinase K-Verdau bzw. direkt nach der Inkubation des Konversionsansatzes erbrachte keine Verbesserung der Ergebnisse bezüglich dieses Hintergrundes. Nach Proteinase K-Verdau der Negativkontrolle (Abb. 21, Spur 3) ist kein Protein mehr detektierbar. Um im Falle einer erfolgreichen Konversionsreaktion von *in vitro* translatierten Fusionsproteinen ausschließen zu können, dass die vorhandene teilweise Proteinase-resistente Proteinbande von dem eingesetzten Gehirnhomogenat stammt, wurde die Konzentration der Proteinase K (14, 7 µg/ml) für die Konversionsversuche mit *in vitro* translatierten Fusionsproteinen beibehalten.

Die Konversion von *in vitro* generiertem Fusionsprotein hat nicht funktioniert (Abb. 21), obwohl in Abb. 21, Spur 6 nach Proteinase K - Verdau und anschließender Autoradiographie des Konversionsansatzes von 22Luc noch eine Proteinbande bei 25 kDa zu sehen ist. Da nach Proteinase K- Verdau des Reaktionsansatzes mit 230Luc (Abb.

21, Spur 9) kein Protein mehr detektierbar war, ist die Proteinbande in Abb. 21, Spur 6 vermutlich durch ein Problem mit der Proteinase K in diesem Ansatz zu erklären. Eventuell war die Konzentration an Gesamtprotein in diesem Versuch zufällig etwas höher als üblich, so dass unter diesen Bedingungen kein vollständiger Proteinverdau möglich war. Dieses Ergebnis war einmalig und nicht reproduzierbar, es muß deshalb von einem zufälligen Produkt ausgegangen werden und nicht von einer erfolgreichen Konversion von *in vitro* translatiertem Fusionsprotein 22Luc durch Inkubation mit HH^{Sc}.

Abbildung 21: Konversion von *in vitro* translatierten Fusionsproteinen



Autoradiographie. **Spur 1:** Negativkontrolle. **Spur 2:** Negativkontrolle mit HH^{Sc} (Pfeil). **Spur 3:** Der Ansatz aus Spur 2 nach Proteinase K- Verdau. **Spur 4:** *In vitro* translatiertes 22Luc (Pfeil). **Spur 5:** Konversionsreaktion mit 22Luc. **Spur 6:** Der Ansatz aus Spur 5 nach Proteinase K- Verdau. Bei 25 kDa ist eine Bande zu sehen, deren Herkunft unklar ist (Pfeil). **Spur 7:** *In vitro* translatiertes 230Luc (Pfeil). **Spur 8:** Konversionsreaktion mit 230Luc. **Spur 9:** Der Ansatz aus Spur 8 nach Proteinase K- Verdau.

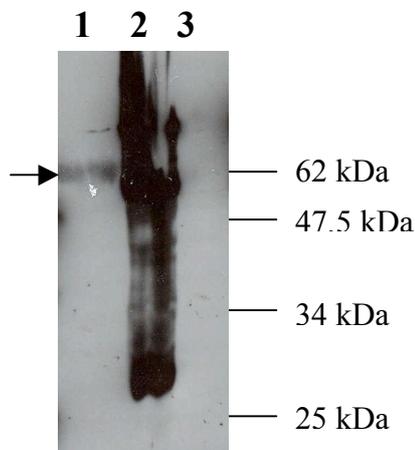
b) Konversionsversuche mit bakteriell exprimierten Fusionsproteinen

Die Konversion von bakteriell exprimierten Fusionsproteinen wurde mit der PMCA-Methode, wie sie für viral generierte Proteine beschrieben ist, versucht.

Die Aufreinigung der bakteriell exprimierten PrP-EGFP- Fusionsproteine erfolgte denaturierend. Die Disulfid- Brücke des rekombinanten Proteins wurde in Gegenwart von 1 µM CuSO₄ reoxidiert und anschließend gegen Natriumacetat (pH = 5,5) Vakuum- dialysiert (Jackson et al., 1999).

In den Proteinen konnten mit dem Ellman`s Reagenz (DTNB, 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)) keine freien Schwefelgruppen nachgewiesen werden. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe der Probe und einer Eichlösung (1,4-Dithio-DL-threitol) erstellt. Vorhandene Thiole reagieren mit dem Reagenz zu gemischten Disulfiden, wobei eine dem Thiol äquivalente Menge an 5-Thio-2-Nitrobenzoat entsteht. Diese Substanz ist intensiv gelb gefärbt und hat ein Absorptionsmaximum bei 412 nm. Nach der Dialyse wurde das rekombinante Protein in Coli- Konversionspuffer aufgenommen.

Abbildung 22: Konversionsversuch mit bakteriell exprimierten Fusionsproteinen



PMCA- Methode mit bakteriell exprimiertem Fusionsprotein.

Spur 1: Bakteriell exprimiertes 93ecoli- Fusionsprotein pur (Pfeil).

Spur 2: $\frac{1}{3}$ einer PMCA- Reaktion mit 93ecoli ohne PK- Verdau.

Spur 3: $\frac{2}{3}$ der PMCA- Reaktion mit 93ecoli nach Proteinase K- Verdau.

Der Versuch, bakteriell exprimiertes Protein in der modifizierten PMCA- Methode zu konvertieren, schlug unter den gewählten Bedingungen fehl. In Abb. 22 ist exemplarisch eine PMCA- Reaktion mit bakteriell exprimiertem 93ecoli zu sehen. Spur 1 zeigt das Fusionsprotein, das sich bei etwa 60 kDa (Pfeil) nachweisen lies. In Spur 2 ist $\frac{1}{3}$ der PMCA- Reaktion ohne Proteinase K- Behandlung aufgetragen, in Spur 3 sind die restlichen $\frac{2}{3}$ des PMCA- Ansatzes nach Proteinase K- Behandlung aufgetragen worden. Die bakteriell exprimierten Fusionsproteine konnten in keinem Versuch in eine teilweise Proteinase K- resistente Isoform konvertiert (Abb. 22, Spur 3: 93ecoli) werden.

c) Konversionsversuche mit viral exprimierten rekombinanten Proteinen

Zur Konversion der im Baculo- Expressionssystem exprimierten Fusionsproteine wurde aufgereinigtes rekombinantes Fusionsprotein in Konversionspuffer aufgenommen und mit 25% -igem murinem Gehirnhomogenat von PrP^{0/0}- Mäusen, sowie mit 10% -igem murinem PrP^{Sc}- Gehirnhomogenat versetzt. Die Endkonzentration von PrP^{0/0}- Gehirnhomogenat entsprach 90% 10% -igem Gehirnhomogenat im Gesamtansatz, infektiöses Gehirnhomogenat wurde im Verhältnis 1:100 zum Gesamtansatz (immer 150 µl) zugegeben. Beide Gehirnhomogenate sowie die rekombinanten Fusionsproteine lagen in Konversionspuffer vor.

Die Menge an eingesetztem Baculo- Fusionsprotein schwankte zwischen 15 und 90 µl. Es sollte so ein optimales Verhältnis von rekombinantem Protein zu HH^{Sc} gefunden werden.

Als Negativkontrolle wurde der gleiche Ansatz ohne PrP^{Sc} mitinkubiert.

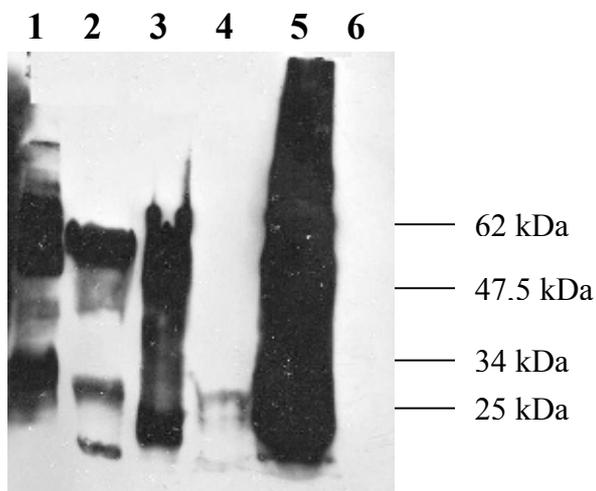
Die Reaktionszeit der Konversionsansätze variierte zwischen 25 bis 29 Std. mit unterschiedlichen häufigen Beschallungsschritten für je 2x 1 Sek. mit 20 Watt. Generell wird angenommen, dass mehr PrP²⁷⁻³⁰ konvertieren kann, je länger die Gesamtreaktionszeit ist (Castilla et al., 2005; Bieschke et al., 2004; Saborio et al., 2001). Bei der hier verwendeten Modifikation des PMCA- Protokolls muß beachtet werden, dass zum einen weniger rekombinantes Fusionsprotein in einem Ansatz vorhanden ist, als PrP^C in einem „Standard“- PMCA- Ansatz wäre und zum anderen die rekombinanten Fusionsproteine wahrscheinlich weniger stabil als endogenes PrP^C sind. Durch längere Gesamtreaktionszeiten könnte das vorhandene rekombinante Material degradiert werden, so dass es in der Western blot Analyse nicht mehr nachweisbar ist. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 50 µl der Proben (1/3 des Gesamtansatzes) mit Aceton über Nacht bei -20 °C gefällt, die restlichen 100 µl (2/3) wurden Proteinase K verdaut. Die Endkonzentration des Enzyms betrug 29 µg/ml. Inkubiert wurde der Proteinverdau für 30 Min. bei 37 °C.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 4 Vol. eiskaltem Aceton unterbrochen und anschließend über Nacht bei -20 °C gefällt.

Nach der Acetonfällung wurden die Proben in 4x PP resuspendiert, für 10 Min. bei 95 °C inkubiert und im Western blot mit MAK 3F4 analysiert.

In Abb. 23 ist eine PMCA- Reaktion mit viral exprimiertem Bac230egfp Fusionsprotein (Spuren 3 und 4) und eine PMCA- Reaktion mit bakteriell exprimiertem 230ecoli Fusionsprotein (Spuren 5 und 6) zu sehen. Als Positivkontrolle für MAK 3F4 wurde in Spur 1 Gehirnhomogenat eines Hamsters aufgetragen. Die spezifischen PrP- Banden sind zwischen 30 und 34 kDa nachweisbar. Der in dieser Spur zu sehende Proteinschmier bei 49 - 65 kDa ist unspezifisch und resultiert aus der großen Materialmenge und der notwendig starken Belichtung des Western blot, um die Proteinbande in Spur 4 nachweisen zu können. In Spur 2 ist bakteriell exprimiertes 93ecoli Fusionsprotein aufgetragen und bei einer Größe von 60 kDa zu sehen.

Abbildung 23: PMCA- Reaktionen mit viral (Bac230egfp) und bakteriell (230ecoli) exprimierten Fusionsproteinen



Western blot Analyse mit MAK 3F4. **Spur 1:** Positivkontrolle. **Spur 2:** Bakteriell exprimiertes Fusionsprotein 93ecoli mit einer Größe von 60 kDa. **Spur 3:** PMCA- Reaktion mit Bac230egfp. **Spur 4:** PMCA- Reaktion mit Bac230egfp nach Proteinase K- Verdau. **Spur 5:** PMCA- Reaktion mit 230ecoli. **Spur 6:** PMCA- Reaktion mit 230ecoli nach Proteinase K- Verdau.

Beide PMCA- Reaktionen wurden 25 Std. bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert, und insgesamt 8-mal beschallt (nach 3, 19, 20, 21, 22, 23, 24 und 25 Std.). Nach Ablauf der Reaktionszeit wurden die Proben wie oben beschrieben bearbeitet und nach SDS- PAGE im Western blot analysiert.

Es sieht so aus, als ob die PMCA- Reaktion mit dem viral exprimierten Fusionsprotein Bac230egfp in diesem Versuch (Abb. 23, Spuren 3 und 4) erfolgreich war, es könnte aber auch zu viel Gesamtprotein in dem PMCA- Ansatz gewesen sein, das nicht

vollständig abgebaut werden konnte. Das eingesetzte Fusionsprotein ist in der nicht PK- verdauten Probe (Spur 3) bei 60 kDa nicht als Proteinbande zu erkennen, da der Einsatz von Gehirnhomogenat zu einer unspezifischen Kreuzreaktion führt, die den Bereich von 45 – 65 kDa vollständig überdeckt. Nach PK- Verdau der PMCA- Reaktion mit Bac230egfp (Spur 4) ist bei etwa 29 kDa eine schwache Bande, die dem Proteinase- resistenten Kern des rekombinanten Fusionsproteins entsprechen könnte, zu sehen. In diesem Fall würde der EGFP- Anteil des Proteins durch die Behandlung mit Proteinase K abgebaut, so dass der Proteinase K- resistente Kern des konvertierten rekombinanten Proteins genauso groß wie der Proteinase K- resistente Kern von murinem PrP^{Sc} ist. Vergleicht man Abb. 23, Spur 1 und Spur 4, so ist ein 5– 6 kDa großer Shift, wie er für PrP²⁷⁻³⁰ charakteristisch ist, zwischen nicht PK- behandeltem PrP (Spur 1) und der Proteinbande in Spur 4 deutlich zu erkennen. Da außerdem das gesamte Protein des PMCA- Reaktionsansatzes mit 230ecoli Fusionsprotein (Abb. 23, Spur 6) unter den gewählten Bedingungen des Proteinase K- Verdaus vollständig abgebaut wird und murines PrP nicht von 3F4 erkannt wird, kann angenommen werden, dass die in Abb. 23, Spur 4 zu sehende Bande von frisch konvertiertem, teilweise Proteinase K- resistantem, rekombinantem Fusionsprotein stammt.

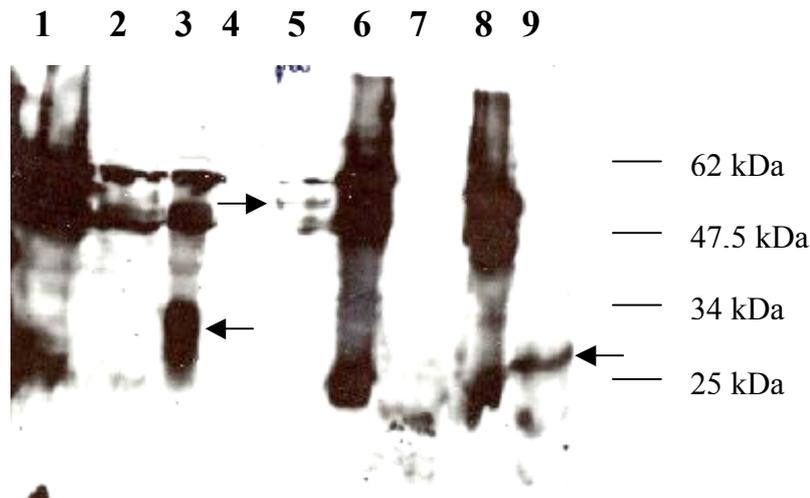
Die PMCA- Reaktion mit bakteriell exprimiertem 230ecoli Fusionsprotein (Abb. 23, Spuren 5 und 6) war nicht erfolgreich. In Spur 5 ist der nicht mit Proteinase K behandelte Teil der Reaktion aufgetragen. Auch hier ist die 60 kDa Proteinbande von 230ecoli durch unspezifische Kreuzreaktionen überdeckt. Nach Proteinase K- Behandlung (Spur 6) ist kein Protein mehr nachweisbar.

Der Nachweis einer Proteinase K- resistenten Bande in der modifizierten PMCA mit 25 Std. Reaktionszeit und 8-mal Beschallen gelang nur einmal mit Bac230e (Abb. 23, Spuren 3 und 4).

Um deshalb die Effizienz der Konversion zu erhöhen, wurde die Inkubationszeit auf 29 Std. und die Anzahl der Beschallungen auf insgesamt 11-mal (nach 3, 6, 9, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 und 29 Std.) erhöht (Abb. 24). Diese Steigerung der PMCA- Zyklen erbrachte eine Verstärkung der Proteinbande in der Proteinase K behandelten PMCA- Reaktion mit Bac230egfp (Abb. 24, Spur 9). Allerdings war nach Proteinase K- Verdau in der Negativkontrolle eine Proteinase K- resistente Bande zu sehen. Diese Bande (Abb. 24, Spur 7) ist etwas kleiner (ca. 22 kDa) und vergleichsweise schwächer, als die Proteinbanden in den Spuren mit Proteinase K- resistantem und mögli-

cherweise rekombinantem Protein (Abb. 23, Spur 4 und Abb. 24, Spur 9). Abb. 24, Spur 1 zeigt die Menge an HH^{0/0}, die in $\frac{1}{3}$ einer PMCA- Reaktion enthalten ist. Der Proteinschmier bei 23 – 25 kDa und bei 47 – 65 kDa resultiert aus unspezifischen Kreuzreaktionen mit dem verwendeten Sekundärantikörper. In Spur 2 ist als Negativkontrolle für 3F4 murines, infektiöses Gehirnhomogenat (muHH^{Sc}) aufgetragen. Es sind im Bereich von 49 kDa und von 62 kDa unspezifische Banden zu sehen, aber in dem für PrP relevanten Bereich von 28 – 35 kDa ist kein Protein nachweisbar. Als Positivkontrolle für MAK 3F4 wurde Gehirnhomogenat eines Hamsters (haHH) aufgetragen (Abb. 24, Spur 3). PrP ist im Bereich 28 – 33 kDa zu sehen (Pfeil). Viral exprimiertes Bac230egfp (Abb. 24, Spur 5, Pfeil) ist 60 kDa groß. In der nicht mit Proteinase K behandelten PMCA- Reaktion mit Bac230egfp (Abb. 24, Spur 6) kann das rekombinante Protein nicht als einzelne Proteinbande nachgewiesen werden, da die Kreuzreaktionen der eingesetzten Gehirnhomogenate zu stark sind (vgl. Spuren 1 und 2). Nach Proteinase K- Verdau der PMCA- Reaktion ist bei 29 kDa eine PK- resistente Proteinbande zu sehen, die etwa 5 kDa kleiner ist, als die Proteinbande des unverdauten haPrP aus Spur 3 und somit den Proteinase K- resistenten Kern von Bac230egfp darstellen kann. Als Negativkontrolle wurde ein PMCA- Ansatz ohne muHH^{Sc} verwendet. In Abb. 24, Spur 8 ist $\frac{1}{3}$ dieser Reaktion ohne PK- Behandlung aufgetragen, in Spur 7 sind $\frac{2}{3}$ der Reaktion nach Proteinase K- Verdau aufgetragen worden. Die zu sehende Proteinbande bei etwa 22 kDa scheint eine Folge der längeren Reaktionszeit mit häufigeren Beschallungsschritten der PMCA- Reaktion zu sein und war auch nach Inkubation und PK- Verdau von HH^{0/0} alleine nachweisbar, es handelt sich also nicht um eine Prionprotein- spezifische Bande.

Abbildung 24: PMCA- Reaktion mit 29 Std. Reaktionszeit



Western blot Analyse mit MAK 3F4. **Spur 1:** HH^{0/0}. **Spur 2:** murinen HH^{Sc}. **Spur 3:** Positivkontrolle für MAK 3F4. **Spur 4:** leer. **Spur 5:** Viral exprimiertes Fusionsprotein Bac230egfp. **Spur 6:** PMCA- Reaktion mit Bac230egfp ohne Proteinase K- Verdau. **Spur 7:** Negativkontrolle nach Proteinase K- Verdau. **Spur 8:** Negativkontrolle ohne Proteinase K- Verdau. **Spur 9:** PMCA- Reaktion mit Bac230egfp mit Proteinase K- Verdau.

Ein möglicherweise Proteinase K- resistenter Kern von Bac230egfp konnte nur in zwei Experimenten mit Protein aus derselben Aufreinigung (Abb. 23 und 24) nachgewiesen werden. In allen anderen Versuchen mit viral exprimiertem Protein war nach Proteinase K- Verdau keine Proteinbande nachweisbar. Die Fusionierung von PrP mit EGFP verändert unter Umständen die Eigenschaften des Fusionsproteins so, dass der Nachweis von konvertiertem Fusionsprotein nicht über erworbene partielle Proteinase K- Resistenz möglich ist. Konvertierte Fusionsproteine könnten entweder gar nicht oder nur in geringerem Ausmaß als wildtypisches Prionprotein Proteinase K- Resistenz erwerben. Um die Konvertierbarkeit der generierten Fusionsproteine eindeutig überprüfen zu können, müssen deshalb Bedingungen geschaffen werden, die ohne den Nachweis der erworbenen Proteinase K- Resistenz auskommen.

5) Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Generierung von *in vitro* konvertierbaren Prionprotein-Reporterprotein- Fusionskonstrukten zur weiteren Erforschung des Prionproteins und seiner Rolle bei TSE- Erkrankungen.

Um dieses Ziel zu erreichen, wurden verschiedene Prionprotein- EGFP- und Prionprotein- Luciferase- Fusionskonstrukte erstellt und in verschiedenen Expressionssystemen exprimiert und analysiert.

Die transiente Transfektion eukaryotischer Zellkulturen war für diese Ziele nicht geeignet, da die Transfektionseffizienz schwankte und die Expressionsraten der rekombinanten Proteine sehr niedrig waren. Ähnliche Probleme traten bei der *in vitro* Transkription und Translation der Proteine auf, da die Menge an generierten Proteinen für weiterführende Analysen zu gering war.

Große Mengen an rekombinantem Protein konnten durch bakterielle Expression erhalten werden, aber die Aufreinigung der Proteine musste denaturierend erfolgen, was im Anschluss recht aufwendige Renaturierungsschritte derselben erforderte.

Durch die virale Expression der rekombinanten Proteine in Insektenzellen wurden ausreichende Mengen an rekombinantem Protein erhalten. Die Aufreinigung der Proteine konnte nativ erfolgen und erforderte keine Renaturierung.

Die Expression der Fusionskonstrukte in *Sf9*- Zellen mit dem Baculoexpressionssystem wurde als Thema einer Diplomarbeit von C. Fuchs (2004) im Rahmen dieser Doktorarbeit bearbeitet.

Aus diesen Gründen wurden Konversionsversuche vor allem mit Fusionsproteinen aus Baculo- infizierten Insektenzellen durchgeführt.

Die Analyse von Prion- EGFP- und von Prion- Luciferase- Fusionsproteinen ergab für die mit Luciferase markierten Fusionsproteine eine mögliche sterische Hemmung bei N- terminaler Fusionierung des Enzyms mit dem Prionprotein. Bei Prionprotein-EGFP- Fusionskonstrukten wurden bis zu den Konversionsversuchen keine Beobachtungen dieser Art gefunden, weshalb die Konversionsversuche auf die mit EGFP markierten Fusionsproteine gerichtet waren.

Die Konversion der Fusionsproteine wurde mit einer modifizierten PMCA untersucht. Für Bac230egfp gab es in zwei Experimenten Hinweise auf eine Konversion des rekombinanten Proteins in eine Proteinase K- resistente Form. Dieses Ergebnis ist

als vorläufig zu betrachten und muß bezüglich der Konversionsbedingungen und Nachweismethoden optimiert werden.

Abstract

The Goals of this thesis were the generation of *in vitro* convertible prion- reporter- fusionproteins for further research of prion protein and its role in TSE diseases.

In order to achieve this goal different prion - EGFP- and prion- luciferase- fusionconstructs were developed and expressed and analysed in different expression systems.

Transient transfection of eukaryotic cells did not qualify to achieve these goals as the efficiency of transfection varied and expression rates of the recombinant proteins were low. Similar problems emerged by *in vitro* transcription and translation of the recombinant proteins because the amount of generated proteins were too low for continuative work.

High yields of recombinant proteins were given by bacterial expression but purification of proteins had to be done under denaturing conditions. Subsequently complex renaturation of the protein was required.

It was found that viral expression of recombinant proteins in insect cells obtained sufficient amounts of proteins. Purification of these proteins could be done under native conditions and required no renaturation.

Within this thesis the expression of fusionconstructs in *Sf9*- cells with Baculo- expression system were an issue of a diploma thesis of C. Fuchs (2004).

For these reasons the conversion experiments were mainly carried out with fusionproteins of Baculo- infected cells.

The analysis of prion- luciferase- fusionproteins showed a possible steric hindrance by n- terminal fusion of the prion protein with the enzyme. This observation was made with both viral expressed and mammalian expressed prion- luciferase- fusionproteins. No observations like this were found for the prion- EGFP- fusionproteins and for this reason the conversion experiments were aimed at the EGFP- tagged prion proteins.

Conversion of recombinant proteins were analysed with an *in vitro* PrP^{Sc} amplification technique adapted from protein misfolding cyclic amplification. For Bac230e there were in two experiments references to a conversion of the recombinant protein

in a proteinase K- resistant form. This result is to be regarded as temporary and must be optimised with regard to the conversion terms and proof methods.

III Diskussion

1.) Herstellung der Prion- Reporter- Fusionsproteine

Ziel dieser Arbeit war die Generierung markierter Prionproteine, die *in vitro* in die Proteinase K- resistente Form des Prionproteins konvertierbar sein und die Eigenschaften des Prionproteins weitgehend beibehalten sollten.

Um dies zu bewerkstelligen, wurden als Reportergene das Gen des *EGFP* und das Gen der Luciferase verwendet. Die Fusion des *PRNP* mit *EGFP* ermöglicht den Nachweis des Fusionsproteins durch Fluoreszenz- Mikroskopie bzw. über Western blot Analyse mit Reporterprotein- spezifischen Antikörpern. Durch die Fusion von *PRNP* mit dem Gen der Luciferase können entsprechende Fusionsproteine durch die von Luciferase katalysierte Reaktion (nach Zugabe von Luciferin als Substrat) über einen Luciferase- Assay bzw. ebenfalls über Western blot Analyse mit Reporterprotein- spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Mit beiden Reporterproteinen ist der nicht invasive Nachweis des Fusionsproteins auch im lebenden Tier möglich (Bhaumik und Gambhir, 2002). Mit diesen Prion- Reporter- Kassetten sollen in weiteren Arbeiten transgene Mäuse vor $Pr^{P0/0}$ - Hintergrund erstellt werden. Mit Hilfe solcher transgener Tiere, die nur Prion- Reporter- Fusionsproteine exprimieren, wäre es beispielsweise möglich, den Verlauf einer Prioninfektion im lebenden Tier zu untersuchen.

Das durch PCR- Mutagenese in die Mausprionsequenz eingeführte 3F4- Epitop (L108M und V111M) des Hamsterprionproteins ermöglicht es, alle rekombinanten Prion- Reporter- Fusionsproteine über den monoklonalen 3F4- Antikörper (Kascsak et al., 1987) von endogenem murinem Prionprotein zu unterscheiden.

Beide Reportergene wurden an verschiedenen Stellen in die Sequenz des murinen Prionproteins inseriert. Beide Reportergene wurden jeweils C- und N- terminal der Sequenz des reifen Prionproteins inseriert, das heißt hinter die aminoternale Gensequenz der ersten 22 AS (22egfp und 22Luc), die der Translokation des Proteins in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums dient und dort abgespalten wird (Basler et al., 1986), und vor die C- terminale Gensequenz (230egfp und 230Luc) zur Anheftung eines Glycosylphosphatidyinositol- Ankers (Stahl et al., 1987). Lee et al.

(2001) konnten zeigen, dass ein Fusionsprotein, bei dem das *EGFP*- Gen hinter die aminoterminal Signalsequenz des Prionprotein- Gens fusioniert ist, sich in Zellkulturen ähnlich wie endogenes Prionprotein verhält. Ivanova et al. (2001) publizierten ein ebenfalls in Zellkulturen korrekt prozessiertes und lokalisiertes PrP- EGFP- Fusionsprotein, bei dem das EGFP hinter AS 223 des Prionproteins fusioniert ist.

Ein Fusionskonstrukt mit Luciferase wurde so generiert, dass die Fusion des Reporterproteins hinter AS 32 des Prionproteins (32Luc) lag. Durch Vorarbeiten von Mella (2000) war bekannt, dass Insertionen an dieser Stelle des Prionproteins keinen Einfluß auf die Konvertierbarkeit des Prionproteins haben. Der N- terminale Bereich des PrP ist hochflexibel und wenig strukturiert (Riek et al., 1996; Norstrom und Mastrianni, 2006). In diesem Bereich des Prionproteins befinden sich mehrere Wiederholungen von Octapeptiden, die in ihrer Sequenz, aber nicht in ihrer Anzahl hoch konserviert sind (5 in murinem PrP), an denen Kupfer gebunden werden kann (Cox et al., 2006). In diesem Fusionskonstrukt sind zusätzlich zwei Restriktionsschnittstellen so eingefügt, dass die Octapeptid- Region deletiert werden kann. Lorenz et al. (2002) publizierten ein PrP- EGFP- Fusionsprotein, bei dem EGFP hinter AS 39 des Prionproteins fusioniert ist und das sich in Zellkultur wie Wildtyp- Prionprotein verhält. Zusätzlich wurde das Gen für das EGFP einmal an AS Position 93 (93egfp) eingeführt, da durch Arbeiten von Mella, 2000, Fischer et al., 1996 und Flechsig et al., 2000 kein negativer Einfluss nach Insertion in diesem Bereich auf die Konversion in die pathologische Isoform des Prionproteins nachgewiesen werden konnte.

Alle hier genannten publizierten Fusionsproteine enthielten „Spacer“- Aminosäuren N- und C- terminal des EGFPs. Um möglichst wenig Fremdsequenz in den Fusionsproteinen zu haben, die eventuell einen störenden Einfluß auf die Konvertierbarkeit der rekombinanten Proteine haben könnten (Supattapone et al., 2001), wurde bei den hier generierten Fusionsproteinen auf Spacersequenzen verzichtet.

2.) Expression der Prion- Reporter- Fusionsproteine in verschiedenen Expressionssystemen

Für die Expression der verschiedenen Fusionskonstrukte wurden mehrere Expressionssysteme verwendet, um ein möglichst breites Spektrum für die Expression der Fusionsproteine nutzen zu können.

Alle Fusionsproteine ließen sich in verschiedenen Expressionssystemen exprimieren, wobei zwischen den einzelnen Expressionssystemen und den verschiedenen Konstrukten große Unterschiede in der Expressionsstärke festzustellen waren.

2.1) Transiente Expression der Prion- Reporter- Fusionsproteine in eukaryotischen Zellkulturen

Das Prionprotein wird stark posttranslational modifiziert. Die Exprimierbarkeit und das Expressionsmuster der hier verwendeten Fusionsproteine sollten deshalb in einem eukaryotischen Expressionssystem, das Proteine posttranslational modifizieren kann, analysiert werden. Eukaryotische Zellkulturen sind daher als *in vitro*-Modell für die Vermehrung von PrP optimal, da sie nah an die *in vivo*-Bedingungen von Eukaryoten heranreichen und relativ einfach zu handhaben sind. Nachteile sind die geringe Ausbeute an exprimiertem Protein und die Tatsache, dass die Expression und die Glykosylierung des Prionproteins von Zelllinie zu Zelllinie sehr stark variieren (Butler et al., 1988; Béranger et al., 2001; Monnet et al., 2003).

Nach der Transfektion konnten Fusionsproteine aus N2a- oder 293- Zellen im Western blot nicht gut nachgewiesen werden, die Expressionsrate der Fusionsproteine war dafür zu gering. Für die Aufarbeitung von rekombinantem Prionprotein aus Zellkulturen mussten große Mengen an Zellen verwendet werden, was zu enormem Hintergrund im Western blot führte.

2.1.1) Expression von Prion- EGFP- Fusionsproteinen

Die Transfektion der Fusionsproteine in murinen N2a- Zellen oder in humanen 293- Zellen ermöglichte ohne weitere Bearbeitung die Analyse der Prion- EGFP- Fusions-

proteine mittels Fluoreszenz- Mikroskop. Als Positivkontrolle wurde *EGFP* unter Kontrolle desselben Promotors (CMV) transfiziert. Im Vergleich der Fusionsproteine mit der Positivkontrolle schien die Transfektionseffizienz der Fusionsproteine etwas geringer zu sein.

Die Expression von Prionprotein- EGFP- Fusionskonstrukten mit und ohne den GPI- Anker des Prionproteins ergab, dass sie einen funktionalen GPI- Anker hatten, der die Fusionsproteine membranständig verankerte. Fusionskonstrukte, die ohne Signalsequenz für den GPI- Anker erstellt und transfiziert wurden, wurden erwartungsgemäß im Cytoplasma angereichert. Die Insertion des EGFP an verschiedenen Stellen des Prionproteins bewirkt keine Unterschiede in der Funktionalität des EGFP, in der Expressionsstärke oder der Lokalisation der rekombinanten Fusionsproteine.

2.1.2) Expression von Prion- Luciferase- Fusionsproteinen

Zur Analyse von Prion- Luciferase- Fusionsproteinen aus N2a- oder 293- Zellen wurde ein Luciferase- Assay mit Zelllysate durchgeführt. Die quantitative Messung der Luciferase- Aktivität in den Fusionsproteinen im Vergleich zu der bei der Transfektion eingesetzten Positivkontrolle ergab eine stetig abnehmende Aktivität der Luciferase abhängig von der Fusionierungsstelle des Luciferase- Gens im Gen des Prionproteins. Die C- terminale Fusionierung des Luciferase- Gens mit dem Prionprotein (230Luc) ergab ähnlich hohe Messwerte der Luciferase- Aktivität wie in der Positivkontrolle.

Bei den Fusionskonstrukten, bei denen das Luciferase- Gen im N- terminalen Bereich des Prion- Gens fusioniert wurde (hinter Aminosäure 32 des PRNP (32Luc) bzw. hinter der N- terminalen Signalsequenz des PRNP (22Luc), war die Aktivität der Luciferase im Luciferase- Assay deutlich geringer als bei der Positivkontrolle und als bei 230Luc. Zwischen den Fusionsproteinen 32Luc und 22Luc war nochmals ein großer Unterschied in der Aktivität der Luciferase festzustellen. Entweder war die Transfektionseffizienz der Fusionskonstrukte mit aminoterminaler Fusionierung der Luciferase deutlich geringer als die der Positivkontrolle und von 230Luc, oder die Luciferase scheint sterisch gehemmt zu werden, wenn sie in der aminoterminalen Region des Prionproteins fusioniert ist. Dies könnte an der Struktur des Prionproteins liegen, da von dem N- terminalen Bereich bekannt ist, dass er wenig strukturiert ist und wahr-

scheinlich eine stabilisierende Funktion für den C- terminalen Bereich des Prionproteins inne hat (Yao et al., 2003; Norstrom und Mastrianni, 2006). Eventuell wird die Interaktion des N- terminalen Bereichs mit der C- terminalen globulären Domäne des Prionproteins gestört, wenn die Luciferase in diesem Bereich fusioniert ist. Es könnte sein, dass durch die Größe der Luciferase die miteinander interagierenden Bereiche des Prionproteins so weit voneinander entfernt werden, dass sie statt miteinander zu interagieren, stattdessen die Funktionalität der Luciferase beeinflussen.

2.2) *In vitro*- Transkription und *In vitro*- Translation der Fusionsproteine

Allen in pcDNA3 vorliegenden Konstrukten war der Promotor für die T7- DNA- abhängige RNA- Polymerase vorgeschaltet, mittels dem eine *in vitro* Transkription der Fusionskonstrukte erfolgen konnte. Die *in vitro*- Transkription und Translation der Proteine wurde durch die DNA- abhängige RNA- Polymerase und das Rabbit Reticulolysate System® in Gegenwart von [³⁵S]- markiertem Methionin bewerkstelligt.

Alle so translatierten Proteine konnten in der Autoradiographie nachgewiesen werden. Die Translation des kleinsten Proteins (3F4PrP) verlief mit der höchsten Effizienz, die PrP- EGFP- und PrP- Luciferase- Fusionsproteine wurden eher schwach translatiert. Pro Translationsreaktion wurde generell nur wenig Fusionsprotein generiert, und durch die Aufreinigung der gebildeten Proteine mittels Immunpräzipitation war die Ausbeute an Proteinmaterial noch geringer. Das *in vitro* exprimierte 3F4PrP ist kleiner als zelluläres PrP und hat eine Größe von 28 kDa. Da Proteine mit dem verwendeten *in vitro* Expressionssystem nicht posttranslational modifiziert werden können, erklärt sich daraus die geringere Größe des *in vitro* exprimierten Proteins. Proteine können in diesem Expressionssystem nicht glykosyliert werden, weshalb alle *in vitro* translatierten Fusionsproteine nach Immunpräzipitation in der Autoradiographie als einzelne Bande zu sehen waren. Prion- EGFP- Fusionsproteine haben entsprechend eine Größe von 58 kDa und Prion- Luciferase- Fusionsproteine eine Größe von 88 kDa.

2.3) Bakterielle Expression der Fusionskonstrukte

Die bakterielle Expression von Proteinen ermöglicht es, große Mengen rekombinanter Proteine zu generieren. Da in prokaryotischen Systemen keine posttranslationalen Modifikationen von Proteinen möglich sind, mussten die amino- und carboxyterminalen Signalsequenzen der Fusionskonstrukte bei der Umklonierung in einen geeigneten Vektor deletiert werden. Zusätzlich wurde am C- Terminus der Fusionskonstrukte eine Polyhistidin- Sequenz (6x HIS) eingeführt, die die Aufreinigung der rekombinanten Fusionsproteine über Ni²⁺- NTA- Affinitätschromatographie ermöglichte. Das verwendete bakterielle Expressionssystem ist ein mit IPTG induzierbares System. Die bakteriell exprimierte rekombinante Proteine mussten unter stark denaturierenden Bedingungen aus Einschlusskörperchen aufgereinigt werden, weshalb die aufgereinigten Proteine nach der Aufarbeitung durch Dialyse gegen PBS renaturiert werden mussten. Aufgrund der stark hydrophoben Natur des Prionproteins neigt das Protein dazu, Aggregate in wässrigen Lösungen zu bilden, was die Renaturierung erschwert. Die Fusionsproteine 3F4PrP ohne Marker (3F4PrPcoli) und die PrP- EGFP- Fusionskonstrukte (22ecoli, 93ecoli und 230ecoli) konnten alle in großen Mengen bakteriell exprimiert werden. In der Western blot- Analyse ließen sich alle bakteriell generierten rekombinanten Proteine (3F4PrPcoli, 22ecoli, 93ecoli und 230ecoli) mit den Antikörpern 3F4 und α - HIS nachweisen, die Fusionsproteine 22ecoli, 93ecoli und 230ecoli konnten zudem mit α - EGFP nachgewiesen werden. Bakteriell exprimiertes 3F4PrP hat in der SDS- PAGE eine apparente Größe von knapp 30 kDa, PrP- EGFP- Fusionsproteine haben eine apparente Größe von knapp 60 kDa. *Escherichia coli* kann keine Proteine glykosylieren, weshalb alle bakteriell exprimierten Proteine in der Western blot Analyse als einzelne Bande zu sehen waren.

2.4) Virale Expression der Prion- Fusionsproteine

Die virale Expression der Prion- Fusionsproteine erfolgte in Sf9- Insektenzellen mit dem Baculo- Expressionssystem. In diesem Expressionssystem sind posttranslationale Modifikationen von Proteinen möglich, und in den Baculoviren stehen die inserierten Gene unter Kontrolle des starken Polyhedrin- Promotors, was hohe Expressi-

onsraten der rekombinanten Proteine ermöglicht. Die Fusionskonstrukte wurden hierfür in einen geeigneten Vektor umkloniert, mit dem dann mittels linearisierter Baculo- DNA rekombinante Baculoviren generiert werden konnten, die die inserierten Gene mit C- terminaler Polyhistidinsequenz (6x HIS) exprimierten. Mit diesen rekombinanten Baculoviren wurden anschließend *Sf9*- Insektenzellen infiziert und hochtitrige Virusstöcke erstellt.

Beide in diesem System exprimierten PrP- EGFP- Fusionsproteine (Bac93egfp und Bac230egfp) waren in der Fluoreszenzmikroskopie nachweisbar. Die Expression in diesem System war deutlich höher als die Expression derselben Fusionsproteine nach Transfektion in N2a- oder 293- Zellen.

Im Fluoreszenzmikroskop waren die Fusionsproteine im Cytoplasma der infizierten Zellen nachweisbar. Eine weitergehende Untersuchung zur Lokalisation der Fusionsproteine erfolgte nicht, aber für eine andere Insektenzell- Linie (*Trichoplusia ni* High 5 -H5, Invitrogen) wurde beschrieben, dass die Synthese des GPI- Ankers nach Transfektion mit rekombinanten und mit Wildtyp- Baculoviren im Verlauf der Infektion blockiert wird (Azzouz et al., 2000).

Die Aufarbeitung der rekombinanten Fusionsproteine aus infizierten *Sf9*- Zellen erfolgte unter nativen Bedingungen mittels Ni²⁺- NTA- Affinitätschromatographie, eine Renaturierung dieser Proteine entfiel somit.

Alle in diesem System exprimierten rekombinanten Proteine ließen sich mit spezifischen Antikörpern für den Prionproteinanteil (3F4), mit α - HIS und mit spezifischen Antikörpern für den EGFP- Anteil (α - EGFP) der Fusionsproteine nachweisen. Die Expression und Konversion von radioaktivem rekombinantes Hamster- PrP (ohne GPI- Anker) in diesem System wurde bereits beschrieben (Iniguez et al., 2000). Bac-HaPrP wurde in dieser Publikation in der Western blot- Analyse vor allem in der unglykosylierten Form bei 27 kDa nachgewiesen, deutlich weniger Protein war in den glykosylierten Formen bei 28– 30 kDa nachzuweisen. Diese Ergebnisse ähneln den hier dargestellten Ergebnissen: wenn Baculo- generiertes Prion- (Fusions-) Protein glykosyliert ist, dann in deutlich geringerer Form, als aus Gehirnmateriale stammendes Prionprotein. Das hier beschriebene Bac3F4PrP ist allerdings etwas größer (30- 33 kDa) und es sind keine getrennten Banden zu erkennen. Der Größenunterschied ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass in der beschriebenen Publikation mit rekombinantes Hamsterprionprotein ohne GPI- Anker gearbeitet wurde,

während das hier generierte murine 3F4PrP mit GPI- Anker synthetisiert wurde. Außerdem wurden zwei verschiedene Zell- Linien von *Spodoptera frugiperda* (bei Iniguez et al. Sf21, hier Sf9) verwendet. Die heterologe Expression von PrP wurde bereits für verschiedene Säugetier- Zellkulturen beschrieben (Monnet et al., 2003), eventuell tritt dieses Phänomenen auch bei der viralen Expression von rekombinanten Prionproteinen in verschiedenen Insektzelllinien auf. PrP- EGFP- Fusionsproteine waren in einer Höhe von 60- 63 kDa zu lokalisieren.

3.) Konversion der rekombinanten Prion- Reporter- Fusionsproteine

Die erfolgreiche Konversion rekombinanter Fusionsproteine in eine partiell Proteinase K- resistente Isoform gelang nur mit einer modifizierten PMCA- Version. Die PMCA (protein misfolding cyclic amplification)- Methode wurde zur Konversion von zellulärem Prionprotein aus gesunden Hamster- Gehirnhomogenaten etabliert (Saborio et al., 2001) und besteht aus Zyklen beschleunigter PrP^{PRES}- Vermehrung. Um dies zu erreichen, wird Gehirnhomogenat eines gesunden Hamsters mit einem geringen Anteil von Gehirnhomogenat eines zum Zeitpunkt des Todes terminal kranken Hamsters gemischt und in einem ersten Schritt inkubiert, um das Wachstum von PrP^{PRES}- Polymeren zu induzieren. In der zweiten Phase wird die Probe beschallt, um die entstandenen PrP^{PRES}- Polymere in kleinere Polymere aufzubrechen, die dann wiederum als neue „Kerne“ zur weiteren Bildung von PrP^{PRES}- Polymeren dienen. Diese Zyklen können beliebig häufig wiederholt werden, um die gewünschte Menge an PrP^{PRES} zu erhalten. Da andere Faktoren aus dem Gehirnhomogenat, das in der Originalmethode als Quelle für PrP^{PC} dient, unter Umständen wichtig für die Konversion sein könnten (Saborio et al., 2001), wurde in der hier adaptierten Version der PMCA- Methode zur Konversion der rekombinanten Fusionsproteine Gehirnhomogenat von PrP^{0/0}- Mäusen mit rekombinantem Prionprotein und murinem infektiösem Gehirnhomogenat gemischt.

Als erstes wurde die PMCA- Methode für Arbeiten mit murinem Material angepasst, da generell die Bedingungen des Proteinase K- Verdaus für PrP^{PRES} verschiedener Spezies variieren (Legname et al., 2004) und bei der PMCA- Methode das Verhältnis

von PrP^{Sc}:PrP^C, die Länge der Inkubationszeiten und die Intensität und Häufigkeit der Beschallungsschritte für Arbeiten mit Prionprotein verschiedener Spezies adaptiert werden muß (Castilla et al., 2004).

Die Beschallungsschritte während der Inkubationszeit erwiesen sich als essentiell für die Neubildung von PrP^{RES}. Nur bei einem Verhältnis von 1:10 (PrP^{Sc}:PrP^C) konnte ohne Beschallung der Proben nach Proteinase K- Verdau PrP^{RES} nachgewiesen werden. Es handelte sich hierbei vermutlich um das eingesetzte PrP^{Sc}, das durch die geringe Verdünnung nachweisbar war. Nachdem anfangs verschiedene Mischungsverhältnisse von PrP^{Sc}:PrP^C getestet wurden, wurden in alle weiteren PMCA- Versuche PrP^{Sc} in einer 1:100 Verdünnung eingesetzt. Eine 1:1000 Verdünnung von PrP^{Sc} erschien als zu hoch für die Konversion rekombinanter Fusionsproteine, da für die erfolgreiche Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} auch die Menge des eingesetzten infektiösen Materials eine Rolle spielt (Legname et al., 2005).

3.1) Konversion von Fusionsproteinen aus eukaryotischen Zellkulturen

Die Proteinausbeute aus transient transfizierten eukaryotischen Zellkulturen war so gering, dass nicht versucht wurde, diese rekombinanten Proteine zu konvertieren. Es war davon auszugehen, dass wenn schon die Aufreinigung der exprimierten Proteine so wenig Ausbeute erbrachte, die Aufreinigung bzw. die Detektion von Proteinase K- resistenten Formen der rekombinanten Proteine nicht möglich sein würde.

3.2) Konversion von *in vitro* translatierten Fusionsproteinen

In vitro translatierte rekombinante Prionproteine wurden in eine modifizierte PMCA-Methode ohne Gehirnhomogenat von PrP^{0/0}- Mäusen eingesetzt. Es wurde mit und ohne Beschallung der Proben während der Inkubationszeit versucht, *in vitro* translatierte Fusionsproteine zu konvertieren. Das zur Konversion eingesetzte infektiöse Gehirnhomogenat reagiert mit dem Reticulocytelysate und dem [³⁵S]- Methionin während der Inkubationszeit und verursacht dadurch Hintergrund auf dem Röntgenfilm. Aus diesem Grund wurde auf die Zugabe von HH^{0/0} verzichtet und der

größere Anteil dieser Konversionsansätze wurde ohne Proteinase K - Behandlung analysiert. Durch den Proteinase K - Verdau eines geringen Anteils der Reaktion sollte ausgeschlossen werden, dass Proteinase K - resistente Banden von eingesetztem infektiösen HH^{Sc} in der Autoradiographie nachweisbar sind, da PrP^{Sc} durch seine Unlöslichkeit in Detergentien (Meyer et al., 1986) während einer Immunpräzipitation unspezifisch gefällt wird und in der Autoradiographie nachweisbar bleibt. Mit *in vitro* translatierten Fusionsproteinen konnte unter diesen Bedingungen der Nachweis einer erfolgreichen Konversion der rekombinanten Proteine nicht eindeutig erbracht werden.

3.3) Konversion mit bakteriell exprimierten Fusionsproteinen

Bakteriell exprimierte rekombinante PrP- Fusionsproteine wurden in die modifizierte PMCA- Analyse eingesetzt.

Zur Ausbildung der Disulfidbrücke des Prionproteins, deren intakter Zustand für die Konversion notwendig ist (Jackson et al., 1999), wurde die Konzentration der Proteine herabgesetzt, mit Kupfersulfat (CuSO₄) in Gegenwart von atmosphärischem Sauerstoff inkubiert und anschließend gegen Natriumacetat in saurem Milieu dialysiert. Die Absenkung der Proteinkonzentration vor der Oxidation der Proteine war notwendig, um die Bildung von unlöslichen Aggregaten durch die reduzierten Proteine zu verhindern (Jackson et al., 1999).

Die bakteriell exprimierten Fusionsproteine ließen sich nicht in eine Proteinase K- resistente Form konvertieren. Bakteriell exprimiertes PrP kann verschiedene Konformationen annehmen, die vom pH, von den gewählten Redox- Bedingungen und von der Detergenz- Konzentration abhängig sind (Jackson et al. 1999). Mit DTNB konnten keine freien Thiol- Gruppen in den bakteriell exprimierten und aufgereinigten Fusionsproteinen nachgewiesen werden. Da bei der Dialyse dieser Proteine gegen Natriumacetat (pH= 5,5) Aggregatbildung zu beobachten war, ist anzunehmen, dass ein Teil der rekombinanten Proteine während der Reoxidation intermolekulare Disulfidbrücken gebildet hat. Eine intakte Disulfidbrücke ist für die Konversion des Prionproteins essentiell (Lucassen et al., 2003; Kirby et al., 2003; Jackson et al., 1999). Es

ist noch unklar, ob die Disulfidbrücke des Prionproteins während der Konformationsänderung zu PrP^{Sc} aufgebrochen wird oder nicht, aber die Blockade freier Schwefelgruppen inhibiert die PrP^{Sc} Amplifikation *in vitro* (Lucassen et al., 2003).

3.4) Konversion viral exprimierter Fusionsproteine

Viral exprimierte rekombinante Prion-EGFP-Fusionsproteine (Bac230egfp und Bac93egfp) aus Insektenzellen wurden mit der modifizierten PMCA-Methode zu konvertieren versucht. Bei zwei unabhängigen Versuchen mit unterschiedlichen Protokollen konnte in PMCA-Ansätzen mit Bac230egfp eine Proteinase K-resistente Bande in der Western blot Analyse nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis war nicht reproduzierbar und auch mit Bac93egfp konnte ein ähnliches Ergebnis nicht erzielt werden. Das Proteinase K-resistente, rekombinante Protein war im Western blot in der gleichen Höhe wie aus Gehirn stammendes, Proteinase K-resistentes Prionprotein zu detektieren (bei etwa 28-29 kDa). Dieses Ergebnis legt nahe, dass der EGFP-Anteil von Bac230egfp durch den Proteinase K-Verdau degradiert wurde.

Dieses Ergebnis ist mit der Publikation von Bian et al. (2006) übereinstimmend, die 22egfp mit eingeführtem 3F4 Epitop in chronisch infizierte SMB-Zellen transfiziert haben. Nach Aufarbeitung der Zellextrakte und Proteinase K-Verdau, konnte Proteinase K-resistentes Prionprotein mit dem monoklonalen 3F4 Antikörper auf der Höhe von PrP 27-30 detektiert werden.

Eine Proteinase K-resistente Bande konnte nur in zwei Fällen mit rekombinantem Protein Bac230egfp aus derselben Aufreinigung detektiert werden. Diese geringe Reproduzierbarkeit könnte mit der Dauer der Inkubations-Beschallungszyklen, die manuell durchgeführt wurden, und mit den verwendeten biologischen Materialien zusammenhängen. Die PMCA-Methode ist eine junge Methode, die noch für die verschiedenen Prionprotein-Quellen optimiert werden muß (Castilla et al., 2004). Die in dieser Arbeit beschriebene Modifikation wurde eigens für die Konversionsversuche der rekombinanten Prionproteine entwickelt. Bisher gibt es noch keine Publikation von PMCA-Anwendungen mit murinem Material.

Es muß weiterhin davon ausgegangen werden, dass das Verhältnis von PrP^{0/0}-Gehirnhomogenat, PrP^{Sc}-Gehirnhomogenat und rekombinantem Prionprotein nur in einem sehr engen Feld variabel ist, um eine Konversion des rekombinanten Proteins

zu erreichen, da auch in der normalen PMCA- Methode die Menge an gesundem Gehirnhomogenat eine wichtige Rolle spielt (Castilla et al., 2004).

3.5) Zusammenfassung der Konversionsversuche

Die in dieser Arbeit entwickelte Variante der PMCA- Methode zur Konversion rekombinanter Fusionsproteine ist für den Fall, dass tatsächlich zusätzliche Faktoren aus Gehirnhomogenat eine Rolle bei der Konversion und dem Erwerb von Infektiosität eine Rolle spielen, vielversprechend. Es scheint mit der PMCA- Methode die *de novo* Generation von infektiösem Prionprotein gelungen zu sein (Castilla et al., 2005).

In den hier dargestellten Versuchen konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden, ob die erstellten Prion- Reporter- Fusionsproteine in eine pathologische Isoform konvertierbar sind. Es gelang in zwei Fällen in PMCA- Versuchen mit viral exprimiertem Bac230egfp nach Proteinase K- Verdau in der Western blot Analyse eine Proteinase K- resistente Proteinbande mit einer Größe von 29 kDa zu detektieren. In einem Konversionsversuch mit *in vitro* translatiertem 22Luc war nach Proteinase K- Verdau eine Proteinbande in der Autoradiographie bei etwa 25 kDa nachweisbar. Bei allen anderen Fusionsproteinen konnte nach Konversionsversuchen kein Proteinase K- resistentes Protein nachgewiesen werden.

Die Proteinase K- resistenten Proteinbanden könnten durch unvollständigen Proteinabbau der jeweiligen Reaktionen erklärt werden, da durch die Verwendung von Gehirnhomogenaten in den Konversionsreaktionen Schwankungen in der Gesamtproteinmenge nicht auszuschließen sind. Da jedoch bei den PMCA- Reaktionen mit Bac230egfp in beiden Fällen nach Proteinase K- Verdau eine einzelne Proteinbande von 29 kDa zu sehen ist und bei einer unvollständigen Proteinase K- Reaktion mehrere Proteinfragmente geringer Größe zu erwarten wären, ist diese Annahme unwahrscheinlich. Um die Proteinbande herum, die nach Proteinase K- Verdau einer Konversionsreaktion mit *in vitro* translatiertem 22Luc bei 25 kDa detektiert wurde, sind mehrere schwache Proteinbanden sichtbar. Es ist daher möglich, dass in dieser Reaktion tatsächlich der Proteinabbau nicht vollständig erfolgen konnte. Allerdings wurde in einem *in vitro*- Modell der Speziesbarriere eine gesteigerte Menge an PrP^{Res} mit anderer Konformation und anderen PK- Spaltstellen detektiert (Lawson et al.,

2004). Dies könnte ein Teil des Inter- Spezies- Adaptionsprozesses des Prionproteins sein. Der monoklonale Antikörper 3F4 kann diese verkürzten PrP^{Res}- Formen nicht detektieren (Lawson et al., 2004). Da die *in vitro* translatierten Fusionsproteine mittels Autoradiographie analysiert wurden, könnten die zu sehenden Proteinbanden in dieser Reaktion auch durch unterschiedliche Konformationen und andere Proteinase K- Spaltstellen des Fusionsproteins zustande gekommen sein.

Die 93egfp- Fusionskonstrukte konnten weder nach *in vitro* Translation noch nach bakterieller oder viraler Expression in eine Proteinase K- resistente Form konvertiert werden. Eventuell stört die Fusion von EGFP an AS 93 des Prionproteins die Bindung von PrP^{Sc} an den Prionproteinanteil des Fusionsproteins. Der N- Terminus des Prionproteins ist relativ unstrukturiert, Modifikationen in diesem Bereich können starke Veränderungen in der Proteinfaltung verursachen (Yao et al., 2003) und einen Einfluß auf die Bildung von PrP^{Res} *in vitro* haben (Lawson et al., 2004). Hill et al. (1999) produzierten ein chimäres Prionprotein (MH2M PrP^C), bei dem in der murinen *PRNP*- Sequenz die den AS 94- 188 entsprechenden Codons durch die Sequenz des Hamster Prionproteins ersetzt worden waren. Diese Chimäre kann durch Ha-PrP^{Sc} in eine auch für Wildtyp- Mäuse infektiöse Form konvertiert werden, was für die wichtige Funktion dieses Bereichs des Prionproteins bei Konversionsreaktionen spricht. Die Fusion von EGFP in diesem Bereich könnte für die Konversion des Prionproteins benötigte Strukturbereiche unzugänglich machen, oder intermolekulare Interaktionen zwischen rekPrP und PrP^{Sc} blockieren.

Legname et al. publizierten 2005 Versuche mit synthetischen Prionstämmen, die für bestimmte transgene Mäuse infektiös und dabei Proteinase K- sensitiv sind. Da die Fusionierung eines Reporterproteins mit dem Prionprotein einen Einfluß auf die strukturellen Eigenschaften des Fusionsproteins haben kann, könnte es sein, dass die hier vorgestellten Fusionsproteine durchaus in eine pathologische, aber nicht Proteinase K- resistente Isoform konvertierbar sind. Unter Umständen sind die generierten Fusionsproteine deutlich weniger resistent gegen Proteinase K als murines Prionprotein. Da in den hier vorgestellten Versuchen die Konzentration der Proteinase K anhand der für murines Prionprotein nötigen Konzentration bestimmt wurde, könnten diese Konzentrationen für partiell Proteinase K- resistente Fusionsproteine zu hoch gewesen sein. Es muß deshalb eine andere Nachweismethode für die Konversion

von Fusionsproteinen gefunden werden, als der Erwerb partieller Proteinase K- Resistenz nach Konversion.

Mit einem solchen Nachweis sollten auch die Fusionsproteine, bei denen in keinem Versuch eine Proteinase K- resistente Proteinbande nachgewiesen werden konnte, nochmals überprüft werden.

IV Material und Methoden

1.) MATERIAL

1.1) Bakterienstämme

<i>E.coli</i> XL 1-Blue	Stratagene
<i>E.coli</i> M15	Qiagen

1.1.1) Bakterienmedien

LB- Medium	10g Bacto Trypton 5g Bacto Hefeextrakt 5g NaCl ad 1l
LB- Agar	LB- Medium + 1,5% Agar
Selektion:	50 µg/ml Kanamycin (Stock: 25 mg/ml) oder 100 µg/ml Ampicillin (Stock: 100 mg/ml)

1.2) Zelllinien

293	humane Nierenzelllinie (ATCC: CRL-1573)
N2a	murine Neuroblastom- Zelllinie (ATCC: CCL-131)
Sf9	Zelllinie von <i>Spodoptera frugiperda</i> aus Puppen- Ovarien (ATCC: CRL-1711)

1.2.1) Zellkulturmedien

RPMI- Medium:	RPMI 1640- Medium mit L- Glutamin und NaHCO ₃ (PAA)
---------------	---

SF900 II SFM: serumfreies Medium

Dulbeccos- MEM (BFA 34): Dulbeccos- MEM 13,4 g
NaHCO₃ 2,2 g
ad 1,0 l.

Trypsin (BFA 40): 0,125% Trypsin
0,025% EDTA
0,4% NaCl
0,01% KCl
0,01% KH₂PO₄
0,057% Na₂HPO₄.

Fötales bovines Serum (FBS):

Steril- filtriertes, Endotoxin- getestetes fötales bovines Serum (PAA) wurde zur Komplementinaktivierung vor Gebrauch 30 Min. bei 56 °C inaktiviert.

Penicillin/Streptomycin- Stammlösung: 1 Mio I.E. Penicillin
1 g Streptomycin
in 10 ml Aq_{DEST} lösen, steril filtrieren
und bei 4 °C lagern.

Alle Kulturmedien wurden im Verhältnis 1:1000 mit der Penicillin/Streptomycin-
Stammlösung versetzt.

Glutamin- Stammlösung: 1,462 g Glutamin
in 100 ml Aq_{DEST} lösen, steril filtrieren
und bei -20 °C lagern.

MEM Medien wurden im Verhältnis 1:100 mit der Glutamin- Stammlösung versetzt
(entspricht 1mM Glutamin).

1.3) Mäusegehirne

Infektiöses Gehirn- Material von Balb/c Mäusen, infiziert mit RML PrP^{Sc}, terminal
krank

Nicht- infektiöses Gehirn von Balb/c Mäusen

Nicht- infektiöses Gehirn von PrP^{0/0}- Mäusen (Bueler et al. 1993)

Nicht- infektiöses Gehirn von Syrischen Hamstern

Infektiöses Gehirn von Syrischen Hamstern, infiziert mit Sc237 PrP^{Sc}, terminal krank

Sämtliche Tiere stammen aus der Kleintierzucht des Friedrich- Loeffler- Instituts, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für Immunologie, Standort Tübingen.

1.4) Plasmide und Nukleinsäuren

1.4.1) Plasmide

pcDNA3	Invitrogen
pQE-51	Qiagen
pENTR ⁴	Invitrogen
pBi-L	Clontech
pEGFP-N3	Clontech

Folgende Konstrukte wurden von Dr. Daniel Wienhold übernommen:

pcDNA3-mu3F4PrP
pcDNA3-230egfp

1.4.2) Nukleinsäuren

DNA 1 kb Größenmarker New England Biolabs, Bio-Rad

1.5) Oligonukleotide

Bezeichnung Nukleotidsequenz 5' → 3'

A-1	ttttt ggatcc ATGGCGAACCTTGGCTACTGG
A-2	aaaaa actcgag TCATCCCACGATCAGGAAGATG
A-3	CTATTACGACGGGAGAAGATCCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT
A-4	AGCTCCTCGCCCTTGCTCACGGATCTTCTCCCGTCGTAATAG
A-5	GGCATGGACGAGCTGTACAAGAGCAGCACCGTGCTTTTCTCC
A-6	GGAGAAAAGCACGGTGCTGCTCTTGATCAGCTCGTCCATGCC

A-7	CTATTACGACGGGAGAAGATCCGAAGACGCCAAAAACATAAA GAAAG
A-8	CTTTCTTTATGTTTTTGGCGTCTTCGGATCTTCTCCCGTCGT AATAG
A-9	GAAGGGCGGAAAGTCCAAATTGAGCAGCACCGTGCTTTTCTCC
A-10	GGAGAAAAGCACGGTGCTGCTCAATTTGGACTTTCCGCCCTTC
A-11	GGCCAAGGAGGGGGTACCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT
A-12	AGCTCCTCGCCCTTGCTCACGGATCCCCCTCCTTGGCCC
A-13	GGCATGGACGAGCTGTACAAGCATAATCAGTGGAACAAGCCCA
A-14	TGGGCTTGTTCCACTGATTATGCTTGTACAGCTCGTCAATGCC
A-15	GCCTGGAGGGTGGAACACCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT
A-16	AGCTCCTCGCCCTTGCTCACGGTGTTCACCCTCCAGGC
A-17	GGCATGGACGAGCTGTACAAG gctagc GGTGGAAAGCCGGTATCCCG
A-18	CGGGATAACCGGCTTCCACC gctagc CTTGTACAGCTCGTCCATGCC
A-19	CGGTGGATGGGGCCAAGG gctagc GGGGGTACCCATAATCAGTGG
A-20	CCACTGATTATGGGTACCCCC gctagc TCCTTGGCCCCATCCACCG
A-21	GCCTGGAGGGTGGAACACCGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAA G
A-22	CTTTCTTTATGTTTTTGGCGTCTTCGGTGTTCACCCTCCAGGC
A-23	GAAGGGCGGAAAGTCCAAATTG gctagc GGTGGAAAGCCGGTATCCG
A-24	CGGGATAACCGGCTTCCACC gctagc CAATTTGGACTTTCCGCCCTTC
Vkor.seq	GAGCGCCGTGAGCAGGCC
Vkor.rev	GGCCTGCTCACGGCGCTC
Bsiwi.seq	GAACATCACGTACGCGGAATAC
Bsiwi.rev	GTATTCCGCGTACGTGATGTTC
Pac.seq	GAAGTCTTTAATTAATAACAAAGGATA
Pac.rev	TATCCTTTGTATTTAATTAAGACTTC
Rettung1	GTGAGCAAGGGCGAGGAGC
Rettung2	TGTACAGCTCGTCCATGCCG
22egfp.seq	GGACTGATGTCGGCCTCTGCGTGAGCAAGGGCGAGGAGC
22egfp.rev	GCTCCTCGCCCTTGCTCACGCAGAGGCCGACATCAGTCC

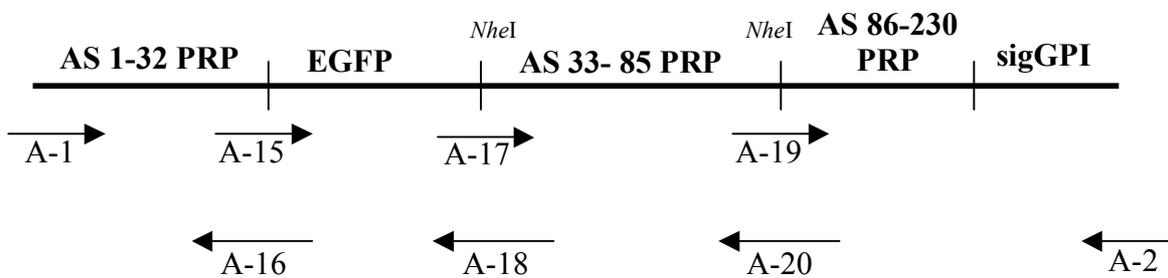
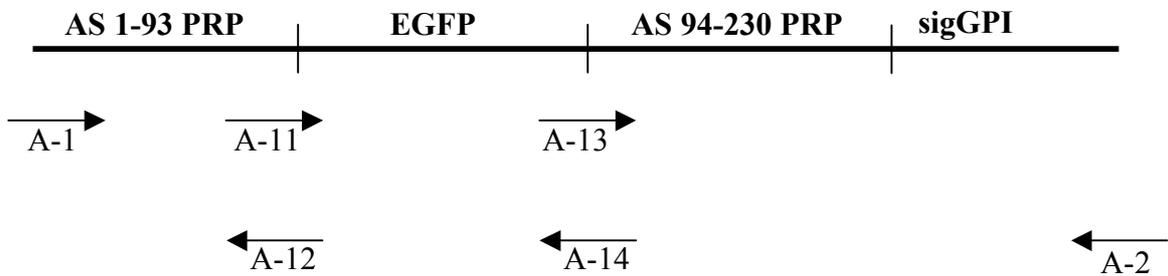
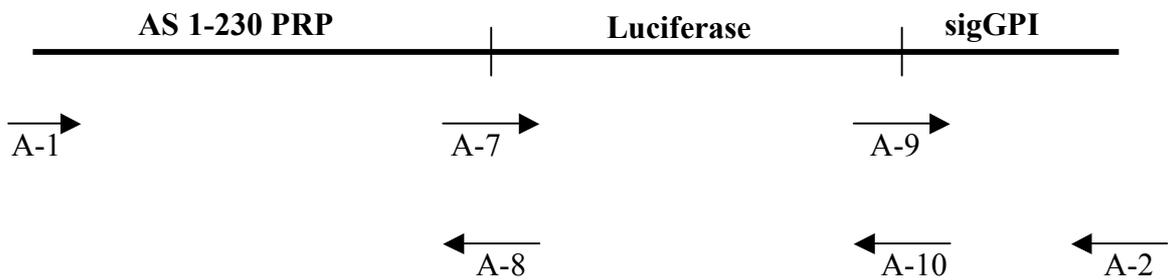
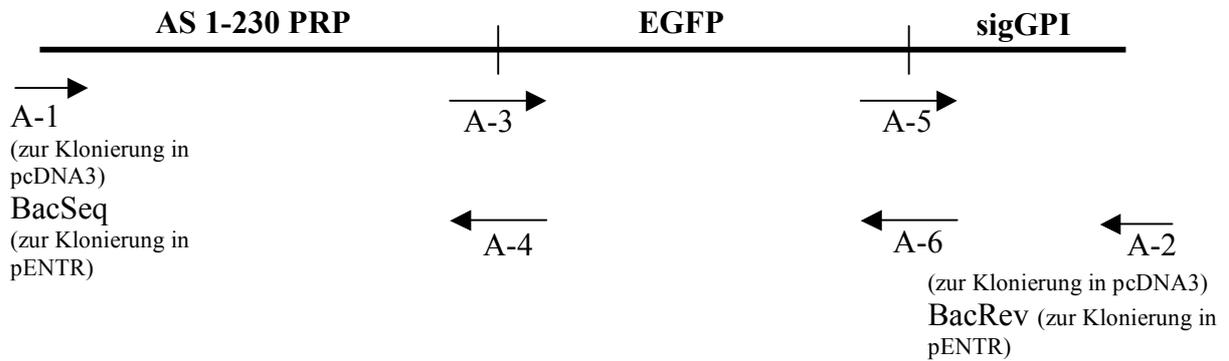
egfp23.seq	GGCATGGACGAGCTGTACAAGAAAAAGCGGCCAAAGCCTGGA
egfp23.rev	TCCAGGCTTTGGCCGCTTTTTTCTTGTACAGCTCGTCCATGCC
22luc.seq	GGACTGATGTCGGCCTCTGCGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAA
22luc.rev	TTTCTTTATGTTTTTTGGCGTCTTCGCAGAGGCCGACATCAGTCC
luc23.seq	GAAGGGCGGAAAGTCCAAATTGAAAAAGCGGCCAAAGCCTGGA
luc23.rev	TCCAGGCTTTGGCCGCTTTTTCAATTTGGACTTTCCGCCCTTC
Luci.seq	GATATA aggattc ATGGAAGACGCCAAAAACATAAAG
Luci.rev	GATCA actcgag TTACAATTTGGACTTTCCGCCCT
1L	ATGGCGAACCTTGGCTACTGG
Mprpcoli.seq	ttttt ggatcct AAAAAGCGGCCAAAGCCTGGA
Egfpcoli.seq	ttttt ggatcct GTGAGCAAGGGCGAGGAGC
Prpcoli.rev	ttttt gtcgacat ggtgatggtgatggtgGGATCTTCTCCCGTCGTAATA
Egfpcoli.rev	ttttt gtcgacat ggtgatggtgatggtgCTTGTACAGCTCGTCCATGCC
BacSeq	ttttt gtcgac ATGGCGAACCTTGGCTACTGG
BacRev	aaaaa agcgccgcac TCCCACGATCAGGAAGATGAG
BacRev1	aaaaa agcgccgcac GGATCTTCTCCCGTCGTAATAG
EGFP1.seq	TGCACCACCGGCAAGCTGC
EGFP1.rev	GCAGCTTGCCGGTGGTGCA

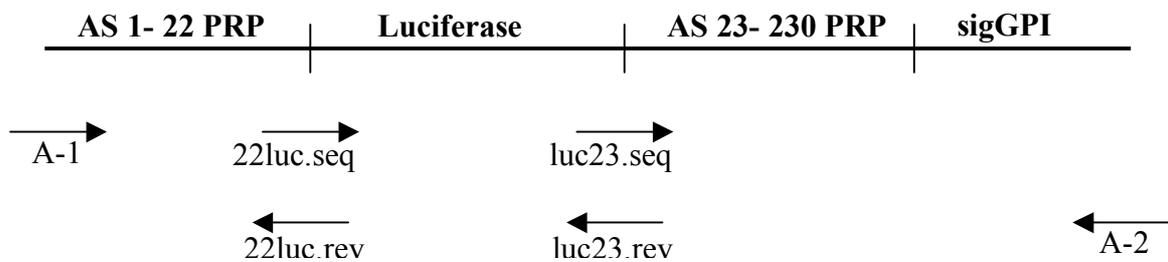
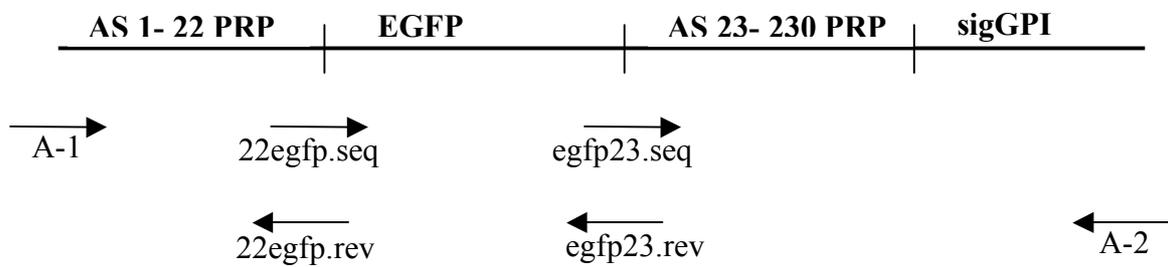
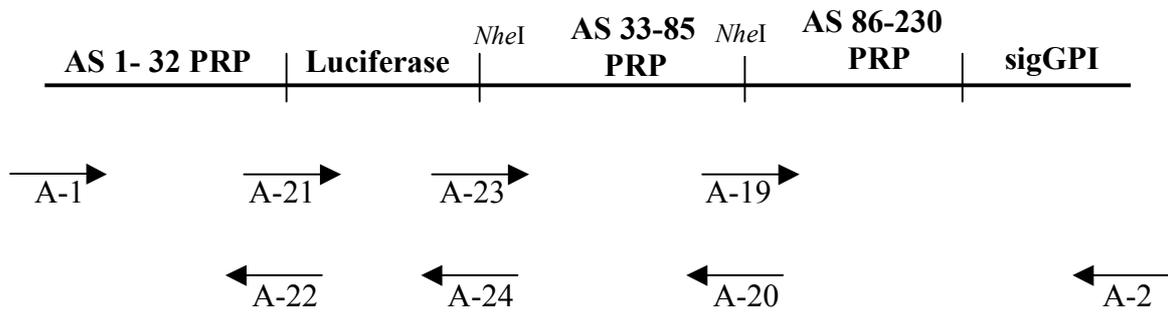
Großbuchstaben kennzeichnen authentische Nukleotidsequenzen, Kleinbuchstaben eingeführte Nukleotide und fett geschriebene Kleinbuchstaben kennzeichnen eingeführte Schnittstellen.

Für Sequenzreaktionen wurden entsprechende, sequenz- und plasmidspezifische Primer eingesetzt.

Alle Primer wurden von Invitrogen bezogen.

Position der Primer - Schemazeichnung





Bei den bakteriell exprimierten PrP- EGFP – Konstrukten fehlen beide Signalsequenzen des Prionproteins (AS 1-22 und sigGPI). Zur Klonierung der Konstrukte in pQE-51 wurden die Primer Mprpcoli.seq und entweder Prpcoli.rev oder Egfpcoli.rev verwendet.

Murines PRP cDNA, Gesamtlänge 764 bp

→
vkor.seq (bp 388-406)

←
vkor.rev (bp 406-388)

EGFP-Gen, Gesamtlänge 720 bp

→
Rettung1
(bp 4 – 23)

→
EGFP1.seq
(bp 145 – 163)

→
egfp.seq
(bp601-619)

←
Rettung2
(bp 715-696)

←
EGFP.rev (bp 163- 145)

Luciferase- Gen, Gesamtlänge 1653 bp

→
Bsiwi.seq (bp 146-168)

→
Pac.seq (bp 1314 – 1340)

←
Bsiwi.rev (bp 168-146)

←
Pac.rev (bp 1340- 1314)

1.6) Enzyme und Kits

1.6.1) Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP)	Roche
AMV Reverse Transkriptase	Promega
DNA Polymerase I, Klenow Fragment	New England Biolabs
DNase I	Roche
Luciferase Assay System	Promega
TripelMaster™ PCR System	Eppendorf
Proteinase K	QIAGEN
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, AGS
RNase A	Roche
RNAsin	Promega
Rabbit Reticulocyte Lysate System®	Amersham Biosciences
T4 DNA Ligase	New England Biolabs
T7 RNA- Polymerase	Roche

Für Reaktionen mit diesen Enzymen wurden die vom jeweiligen Enzymhersteller mitgelieferten Puffer eingesetzt.

1.6.2) Kits

BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	AB Applied Biosystems
NucleoBond® PC 100 Midi-Prep	NucleoBond®
NucleoSpin Extract II	Macherey- Nagel
Ready-to-go™ PCR Beads	Amersham Pharmacia

1.7) Antikörper

Monoklonal Maus anti-3F4 (1: 5000)	DAKO
Monoklonal Maus anti-GFP (B-2) -HRP (1:4000)	Santa Cruz Biotechnology
Monoklonal Maus anti-His-probe (H-3) -HRP (1:500)	Santa Cruz Biotechnology

Monoklonal Maus W226 (1:4000)	Benjamin Petsch, unveröffentlicht
Ziege-anti-Maus IgG-HRP (1:1000)	Santa Cruz Biotechnology
Monoklonal Maus anti-Pom I (1:7500)	BFAV-Tübingen AG Stitz
Polyklonal Kaninchen anti- EGFP (FL)	Santa Cruz Biotechnology

1.8) Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid- Stammlösungen	AppliChem, Roth
Agar	Difco
Agarose für Gelelektrophorese	Gibco BRL
Ammoniumpersulfat	Serva
Ampicillin	Boehringer Mannheim
Bacto Hefeextrakt	Difco
Bacto Trypton	Difco
Bromphenolblau	Serva
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma
Cäsiumchlorid	Sigma
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva
DMSO	Merck
EDTA, Dinatriumsalz	Serva
Ethidiumbromid	Serva
FCS (fötale Kälberserum)	PAA
Formamid, deionisiert	Gibco BRL
Kanamycin	Sigma
Ni ²⁺ - NTA- Agarose	Qiagen
Nukleosidtriphosphate	Roche
Tris- gesättigtes Phenol für DNA- Extraktion	AppliChem, Roth
H ₂ O- gesättigtes Phenol für RNA- Extraktion	AppliChem, Roth
Complete Mini, EDTA- free	Roche
Prestained Protein Marker, broad range	Bio-Rad, New England Biolabs
Cruz Marker Molecular Weight Standards	Santa Cruz Biotechnology
TEMED	Sigma
Triton X-100	Sigma

Tween-20	Sigma
Xylencyanol	Fluka
<u>Zusätze für Zellkultur:</u>	
FBS (fötale Kälberserum)	PAA
Gentamycin	PAA
Penicillin G	Grünenthal
Streptomycin	Hefa Pharma
Wasserstoffperoxid	Merck

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Roth, Sigma oder Scharlau bezogen.

1.9) Radiochemikalien

[³⁵ S] Methionin	MP Biomedicals
[¹⁴ C] Methylated proteins	Amersham Biosciences

1.10) Verbrauchsmaterial

Chromatographiepapier 3 mm	Whatman
Dialysierschläuche	Serva, Roth
Hyperfilm™ ECL	Amersham Biosciences
Immun-Blot™ PVDF Membran	Bio-Rad
Kanülen und Plastikspritzen	Bachhofer, Braun, Terumo
Lysing Matrix D	BIO 101 Systems
Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf
Nitrozellulose	Schleicher & Schuell
Röhren / Tubes	Sarstedt
Pipettenspitzen	Greiner
Röntgenfilme BioMax MR	Kodak
Zellkulturplastikwaren	Greiner
Zentrifugenröhrchen	Beckman Instruments
Mikrotiterplatten, Rundboden	Greiner
Mikrotiterplatten, Flachboden	Greiner

1.11) Geräte und Laborhilfsmittel

ABI-PRISM 377 DNA Sequencer	Perkin Elmer
Begasungsbrutschrank	Heraeus
Entwicklermaschine Sakura QX60	Sakura
Fast Prep™ FP120	BIO 101 Savant
Filmkassetten	Agfa-Gevaert
Fluoreszenz- Mikroskop, Axioskop	Zeiss
Geldokumentationssystem	LFT
Geltrockner 1125B	Bio-Rad
Gene Pulser™	Bio-Rad
Heißluftofen	Heraeus
Heizblock	Liebisch
Horizontal- Elektrophoresekammern	BFAV
Inkubationsschüttler	New Brunswick Scienitific
Lumat LB 9501	Berthold
Magnetrührer	Heidolph
Mikroprozessor pH- Meter	Schott
Mikroskop Labovert	Leitz
Mikrowellengerät HMG 760/62.B	Bosch
Minigel- Elektrophoreseapparatur	Hoefer, Bio-Rad
Power Supplies	Pharmacia, LKB, Bio-Rad
Reaktionsgefäßmischer 5432	Eppendorf
Slab Gel Dryer	Bachofer
Spektrophotometer Ultrospec 2100 <i>pro</i>	Amersham Pharmacia biotech
Speed Vac Concentrator	Bachofer
Sterilbank LaminAir	Heraeus
T3 Thermocycler	Biometra
Taumler Reax 2	Heidolph
Thermostat 5320	Eppendorf
Trans-Blot SD Transfer Cell	Bio-Rad
Trio- Thermoblock	Biometra
Ultraschall; Sonifier B12 und B 15	Branson

Vertikal- Elektrophoresekammern	BFAV
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Wasserbäder	Köttermann/Julabo

1.11.1) Zentrifugen

Biofuge A	Heraeus
Biofuge 13	Heraeus
Biofuge pico	Heraeus
Eppendorf Tischzentrifuge 5415	Bachofer
Omnifuge 2.0 RS	Heraeus
Ultrazentrifuge Centrikon T-1055	Kontron Instruments
Zentrifuge J2-21	Beckman Instruments

1.11.2) Rotoren

TFT 65.13	Kontron Instruments
JA-10, -14, -17	Beckman Instruments

1.11.3) Software

Die Analyse und der Vergleich der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen wurde mit Hilfe der *University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG)* Software (Devereux, 1984) durchgeführt.

2.) METHODEN

2.1) Prokaryotische Zellkultur

2.1.1) Kultivierung und Kryokonservierung von *Escherichia coli*

Der verwendete *E. coli* Stamm wurde in LB- Medium angezogen oder auf LB- Agarplatten kultiviert, wobei die Selektion über die Zugabe von Ampicillin oder Ampicillin und Kanamycin erfolgte. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht. Suspensionskulturen wurden bei 200 rpm geschüttelt. Für eine Kryokonservierung wurden 300 µl Kultur mit 150 µl Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

2.1.2) Herstellung Transformations- kompetenter *E.coli*

Zur Herstellung transformationskompetenter *E.coli* wurde LB- Medium mit einer *E.coli* Übernachtskultur (145ml LB- Medium + 5ml Übernachtskultur) angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₅₅₀ von etwa 0,4- 0,5 geschüttelt. Nach Abkühlen auf Eis wurden die Bakterien pelletiert (4000 rpm, 10 Min., 4 °C), in 0,5 Volumen eiskalter 50 mM CaCl₂- Lösung aufgenommen und 30 Min. auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (4000 rpm, 2 Min., 4 °C) wurde das Bakterienpellet in 0,05 Volumen eiskalter 50mM CaCl₂- Lösung vorsichtig resuspendiert. Die kompetenten Bakterien wurden daraufhin entweder direkt zur Transformation eingesetzt oder nach Zugabe von 15% Glycerin zu je 200 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C bis zur Verwendung gelagert.

2.1.3) Transformation

Für die Transformation wurde 0,1- 1 ng Plasmid- DNA oder 5 µl Ligationsansatz zu je 100 µl kompetenten Bakterien gegeben. Der Ansatz wurde für 30 Min. auf Eis inkubiert. Nach einem 2- minütigen Hitzeschock bei 42 °C und 2 Min. auf Eis erfolgte die Zugabe von 1 ml antibiotikafreiem LB- Medium und eine anschließende Inkubation des Ansatzes für 1 Std. bei 37 °C. Nach kurzer Zentrifugation (4000 rpm, 5 Min.) wurde das Pellet in 100- 200 µl antibiotikafreiem LB- Medium resuspendiert, auf LB-

Selektionsagar ausplattiert oder direkt in 1- 2 ml LB- Medium mit Selektionsantibiotikum überführt (Re-Transformation aus Plasmid- DNA) und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2) Eukaryotische Zellkultur

2.2.1) Arbeiten mit humanen und murinen Zelllinien

2.2.1.1) Kultivierung und Kryokonservierung

Die Kultivierung der adhärent wachsenden Zellen erfolgte standardmäßig in einem Zellkulturbrutschrank bei 37 °C in feuchter Atmosphäre und mit 5% CO₂. 293- Zellen wurden hierbei in MEM, N2a- Zellen in RPMI 1640 kultiviert. Die Medien wurden jeweils mit 1mM Glutamin, 10% FBS und Penicillin G/Streptomycin komplementiert. Bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 95% wurden die Kulturen im Verhältnis 1:4 bis 1:5 subkultiviert. 293- und N2a- Zellen wurden durch Inkubation mittels Trypsin-Lösung bei 37 °C abgelöst.

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen abgelöst, abzentrifugiert (1000 rpm, 5 Min.), 2x mit PBS gewaschen und in Aliquots von 5x10⁶ bis 1x10⁷ Zellen in 1 ml 90% FCS/10% DMSO bei -70 °C langsam eingefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Eingefrorene Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C bis zum Gefrierpunkt aufgetaut und mit 10- 20 ml Medium in T75- Zellkulturflaschen gegeben. Nach 12- 24 Std. wurde das Medium gewechselt und die Zellen bis zur Konfluenz kultiviert.

2.2.1.2) Transfektion eukaryotischer Zellen

Bestimmung der Transfektionseffizienz:

Zur Bestimmung der Transfizierbarkeit verschiedener Zelllinien oder um die Transfektionseffizienz einzelner Methoden zu prüfen wurden Zellen mit dem EGFP- Expressionsplasmid pEGFP-N3 transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurde das Medium abgenommen und die Zellen ohne weitere Fixierung unter einem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Das Verhältnis von fluoreszierenden zu nicht fluoreszierenden Zellen und damit die Transfektionseffizienz wurde optisch abgeschätzt.

Transfektionsmethoden:

Für transiente Transfektionen von Plasmid- DNA wurde nach Abschätzung der Transfektionseffizienz hauptsächlich die Liposomen- vermittelte Transfektion mittels Effectene angewandt.

Elektroporation:

2×10^6 Zellen wurden pelletiert (1000 rpm, 5 Min.), 2x in PBS gewaschen und in 100 μ l PBS aufgenommen. Nach Zugabe der zu transfizierenden DNA wurde die vorsichtig, jedoch gut gemischte Zellsuspension in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte im *Gene Pulser* der Firma Bio-Rad für 293- Zellen bei 25 μ F und 800 V. Anschließend wurden die Zellen in Kulturschalen überführt ($\varnothing=3,5$ cm) und in entsprechendem Medium kultiviert.

Kalziumphosphat- Transfektion:

Kalziumphosphat- Transfektionen wurden mit dem *Mammalian Transfection Kit*® (Stratagene) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Standardmäßig wurden auf „6-well“- Platten (6 Zellkulturschalen mit 3,5 cm Durchmesser auf einer Platte) ausgesäte Zellen transfiziert.

Liposomen- vermittelte Transfektion:

Für die Liposomen- vermittelte Transfektion wurde das Effectene® Transfektionsreagenz (Qiagen) wie im Protokoll des Herstellers angegeben, verwendet.

2.2.1.3) Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen

Zur Bestimmung der Anzahl lebender Zellen wurden 10 μ l einer Zellsuspension mit 90 μ l Trypanblau- Lösung (0,2% in 0,15 M NaCl) verdünnt. Ungefärbte lebende Zellen wurden in einer Neubauer- Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Zellzahl pro ml Zellsuspension ergab sich aus der Zellzahl in 4 Großquadraten (Z), dem Kammerfaktor (KF= 10^4) und dem Verdünnungsfaktor (V; hier: 10) wie folgt:

$$T \text{ (Zellen/ml)} = \text{KF} \times Z \times V$$

2.3) Allgemeine Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.3.1) Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren in wässriger Lösung wurde photometrisch bestimmt. Hierzu wurden UV- Absorptionsspektren im Wellenlängenbereich von $\lambda=320- 220$ nm aufgenommen. Die Konzentration der Nukleinsäuren errechnet sich aus der Extinktion bei $\lambda=260$ nm (OD_{260}). Eine OD_{260} von 1,0 entspricht dabei einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA, 33 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger DNA bzw. 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA. Aus dem Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) lässt sich der Reinheitsgrad der Nukleinsäure ableiten. Für reine DNA liegt dieser Quotient zwischen 1,8 und 2,0, für reine RNA zwischen 1,9 und 2,1.

2.3.2) Phenol/Chloroform- Extraktion

Zur Entfernung von Proteinen wurden wässrige Nukleinsäure- Lösungen nacheinander mit je einem Volumen Phenol, Phenol/Chloroform (1:1) und Chloroform ausgeschüttelt. Für die Extraktion von DNA wurde eine Tris- gesättigte Phenollösung (pH 7,6), für RNA eine H_2O - gesättigte Phenollösung verwendet (pH 4,0). Um die Trennung der Phasen zu beschleunigen und die Abnahme der wässrigen Oberphase zu erleichtern, wurden die ausgeschüttelten Fraktionen jeweils kurz zentrifugiert (1 Min., 12000 rpm). Nach den Extraktionsschritten wurde die in der wässrigen Phase gelösten Nukleinsäuren mit Ethanol präzipitiert.

2.3.4) Ethanolpräzipitation

Für die Fällung von DNA wurde die wässrige Nukleinsäurelösung mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen 100% -igem Ethanol versetzt und 5 Min. bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (10 Min., 14000 rpm) wurde das Pellet mit 70% -igem Ethanol gewaschen, getrocknet und je nach Verwendungszweck in H_2O oder Puffer aufgenommen. Die Präzipitation von RNA erfolgte mit 1/10 Volumen 4 M Lithiumchlorid und 3 Volumen kaltem 100% -igem Ethanol. Nach Inkubation für 30 Min. bei -70 °C oder 2 Std. bei -20 °C wurde die gefällte RNA bei 4 °C ab-

zenrifugiert (15 Min., 12000 rpm) und mit kaltem 70% -igen Ethanol gewaschen. Das bei RT getrocknete Pellet wurde anschließend in RNase freiem H₂O aufgenommen.

2.4) Präparation, Analyse und Modifikation von DNA

2.4.1) Agarosegelelektrophorese

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA wurden je nach Größe der zu trennenden Moleküle 0,7-2 % -ige horizontale Agarosegele mit 1x E- Puffer als Gel- und Elektrophoresepuffer eingesetzt (Sambrook, 1989). Nach Versetzen der Proben mit DNA- Probenpuffer erfolgte die Auftrennung bei einer konstanten Spannung von 5 V/cm. Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 10 Min. in Ethidiumbromid- Lösung (0,5 µg/ml) gefärbt. Die Detektion von DNA- Fragmenten, die aus dem Gel isoliert und weiterführend verwendet wurden, erfolgte auf einer Leuchtplatte mit langwelligem UV- Licht ($\lambda=366$ nm). Für photographische Aufnahmen wurde ein digitales Geldokumentationssystem eingesetzt, bei welchem die Gele bei kurzwelligem UV- Licht ($\lambda=312$ nm) analysiert wurden.

20 x E- Puffer: 800 mM Tris
 400 mM Natriumacetat
 40 mM EDTA
 mit Eisessig auf pH 8,3 eingestellt.

10x DNA- Probenpuffer: 20 mM EDTA, pH 8,0
 50% Glycerin
 0,2% OrangeG
 0,2% Xylencyanol
 0,1% Bromphenolblau.

2.4.2) Isolierung von DNA aus Agarose- Gelen

Nach Auftrennung in einem präparativen Agarosegel und Färbung mit Ethidiumbromid wurden gewünschte DNA- Fragmente unter langwelligem UV- Licht ($\lambda=366$ nm) ausgeschnitten und mittels des NucleoSpin Extract II (Machery Nagel) nach Angaben des Herstellers aus dem Gel isoliert.

2.4.3) Restriktionsverdau von DNA

Für die Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen wurde für einen analytischen Ansatz 0,5- 1 µg DNA in 20 µl, für einen präparativen Ansatz 5 µg DNA in 100 µl Reaktionsvolumen für 1- 6 Stunden bei entsprechender Temperatur im Wasserbad inkubiert. Pro µg DNA wurden 1- 3 U Enzym eingesetzt. Die Reaktions- und Inkubationsbedingungen wurden entsprechend den Angaben des Enzymherstellers gewählt. Die Überprüfung der DNA- Spaltungen erfolgte auf analytischen Agarosegelen.

2.4.4) Dephosphorylierung von DNA

Um die Religation von linearisierten Vektorfragmenten bei Klonierungen zu verhindern wurden die 5`terminalen Phosphatgruppen der DNA- Moleküle mit der Alkalischen Phosphatase aus Kalberdarm (CIP) entfernt. Der Reaktionsansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

Reaktionsansatz: 1- 5 µg linearisierte Plasmid- DNA
5 µl 10x Phosphatasepuffer
1 U CIP
ad 50 µl Aq_{DEST}

Inaktivierung erfolgte durch 20 Min. Inkubation bei 75 °C.

2.4.5) Ligation von DNA

Für die Ligation von Vektor- und Insert- DNA wurde die T4-DNA- Ligase verwendet. Eingesetzt wurden jeweils ca. 200 ng Vektor- DNA und ein äquimolares Verhältnis an Insert- DNA. Die Ligation erfolgte mit 200 U T4-DNA- Ligase in 1x T4-DNA- Ligase- Puffer und einem Gesamtvolumen von 20 µl. Bei glatten Enden der DNA- Moleküle („*blunt/blunt*“-Ligation) wie auch bei der Ligation von kohäsiven Enden („*sticky/sticky*“) wurde die Reaktion über Nacht bei 13 °C oder für 3 Tage bei 4 °C durchgeführt.

2.4.6) Amplifikation von DNA- Fragmenten über PCR

Die Polymerase- Kettenreaktionen (PCR) wurden in Thermocyclern mit beheizbaren Deckeln durchgeführt. Ein Überschichten der Reaktionsansätze mit Mineralöl war aus diesem Grund nicht nötig.

2.4.6.1) Präparative PCR- Ansätze

Amplifizierte DNA- Fragmente, die nachfolgend für Klonierungen in Plasmid- Vektoren eingesetzt wurden, wurden mittels des TripelMaster™ PCR Systems (Eppendorf) hergestellt. Der in diesem System eingesetzte Enzymmix aus einer *Taq* und einer *Pfu* DNA- Polymerase resultiert in einer extrem niedrigen Fehlerrate der amplifizierten Sequenz. Reaktionsansätze, -bedingungen und PCR- Zyklen wurden nach den Angaben des Herstellers gewählt. Die Annealing- Temperatur (T_a) für die Hybridisierung der Primer an die Matrizen- DNA wurde in Abhängigkeit des GC- Gehaltes der Primersequenz entsprechend der „4+2“- Regel ($T_a = T_m - 2^\circ\text{C}$; $T_m = 4^\circ\text{C} (\text{G+C}) + 2^\circ\text{C} (\text{A+T})$) bestimmt. Nach Reaktionsende wurde $1/10$ des PCR- Ansatzes gelelektrophoretisch analysiert, die für Klonierungen gewünschten Fragmente wurden aus präparativen Agarosegelen isoliert und gereinigt

Standardprotokoll für Amplifikate mit weniger als 500 bp Länge:

MM1:	MM2:
150 ng Template	4 μl Hifi- Puffer
1 μl Primer (c= 20 pmol/ μl)	0,4 μl dNTPs (je 10 mM)
	0,3 μl Polymerase
Aq _{DEST} ad 12,5 μl	Aq _{DEST} ad 12,5 ml

PCR- Programm:

Schritt 1	95 °C	5 Min.	1x
Schritt 2	96 °C	15 Sek.	
	T_a	20 Sek.	
	73 °C	35 Sek.	35x
Schritt 3	73 °C	10 Min.	1x
Schritt 4	4 °C	∞	1x

Standardprotokoll für Amplifikate mit mehr als 500 bp Länge:

MM1:	MM2:
150 ng Template	2,5 µl Hifi- Puffer
1 µl Primer (c= 20 pmol/µl)	0,4 µl dNTPs (je 10 mM)
	0,4 µl Polymerase
Aq _{DEST} ad 12,5 µl	Aq _{DEST} ad 12,5 µl

PCR- Programm:

Schritt 1	95 °C	5 Min.	1x
Schritt 2	96 °C	15 Sek.	
	T _a	20 Sek.	
	73 °C	45 Sek.	35x
Schritt 3	73 °C	10 Min.	1x
Schritt 4	4 °C	∞	1x

2.4.6.2) Analytische PCR- Ansätze

Für die Analyse isolierter Gene hinsichtlich der Größe des Zielgens wurden PCRs mit „Ready-to go“® PCR Beads (Amersham Pharmacia) durchgeführt. Diese lyophilisierten Reaktions“kugeln“ enthalten alle benötigten Reaktionssubstanzen mit Ausnahme der jeweils eingesetzten DNA- Matrize sowie des entsprechenden Primerpaares. Nach Zugabe dieser fehlenden Komponenten wurde der Reaktionsansatz mit Aq_{DEST} auf 25 µl aufgefüllt und die lyophilisierten „PCR- Kugeln“ darin gelöst.

Reaktionsansatz für die Analyse isolierter Gene :

0,4 µl Plasmid DNA
+ je 25 pmol seq/rev Primer

PCR- Programm:

Schritt 1	94 °C	1 Min.	1x
Schritt 2	70 °C	30 Sek.	
	T _a	1 Min.	
	72 °C	1 Min.	30x
Schritt 3	4 °C	∞	1x

Je 1/10 der PCR- Ansätze wurde anschließend gelelektrophoretisch analysiert.

2.4.7) Präparation von Plasmid- DNA

2.4.7.1) Analytische Isolierung von Plasmid- DNA

„Schnellminipräparation“ bakterieller Plasmid- DNA (LeGouill et al., 1991)

Für eine schnelle Überprüfung von transformierten Bakterienklonen auf das Vorhandensein rekombinanter Plasmide kann mit dieser Schnellmethode Plasmid- DNA direkt aus Bakterienkolonien, die entweder auf einer Agarplatte oder in Flüssigkulturen angezogen wurden, isoliert werden. Die Bakterienklone werden hierbei mit einer Pipettenspitze direkt von der Agarplatte gepickt oder es werden 50 µl Flüssigkultur abzentrifugiert und in einem Eppendorfgefäß in 16 µl Lysepuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 3 µl Lösung 2 wird für 4 Min. bei 14000 rpm zentrifugiert und der gesamte nukleinsäurehaltige Überstand in einem Agarosegel aufgetrennt.

Lysepuffer: 9 Vol. 10x Auftragspuffer
 11 Vol. H₂O
 40 Vol. 0,2 N NaOH/1% SDS.

10x Auftragspuffer: 0,25% Xylencyanol
 0,25% Bromphenolblau
 25% Ficoll 400.

Lösung 2: 3 M Kaliumacetat
 1,8 M Ameisensäure.

Plasmid- Schnellpräparation (Birnboim et al., 1979)

3 ml LB- Medium, komplettiert mit dem entsprechenden Antibiotikum, wurden hierfür mit einer transformierten Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Je 1,5 ml dieser Übernachtskultur wurden kurz abzentrifugiert (5 Min., 13000 rpm) das Pellet in 100 µl Lösung A resuspendiert und 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die alkalische Lyse der Zellen erfolgte anschließend durch die Zugabe von 100 µl Lösung B und nach kurzem, vorsichtigen Mischen und erneuter Inkubation von 5 Min. bei Raumtemperatur und durch die Zugabe von 150 µl Lösung C. Proteine und chromosomale DNA wurden hierbei präzipitiert und nach Inkubation der Proben für 20 Min. auf Eis abzentrifugiert (10 Min., 14000 rpm). Die Plasmid- DNA im Überstand wurde für 10 Min. bei Raumtemperatur mit 3 Vol. 100% -igem Ethanol gefällt, nach Zentrifugation (10 Min., 14000 rpm) mit 70% -igem Ethanol gewaschen,

unter Vakuum getrocknet und in 50 µl TE- Puffer mit 10 µg/ml RNase A aufgenommen. Nach Abdau der RNA bei 37 °C für 30 Min. wurden je 3 µl der Proben im Agarsegel analysiert.

Lösung A: 50 mM Glucose
25 mM Tris/Cl pH 8,0
10 mM EDTA
2 mg/ml Lysozym.

Lösung B: 0,1 N NaOH
1% SDS.

Lösung C: 3 M Na- Acetat pH 4,8

TE-Puffer: 10 mM Tris- HCl, pH 7,6
1 mM EDTA.

2.4.7.2) Präparative Isolierung von Plasmid- DNA

Midi- Plasmidpräparation

Zur Isolierung größerer Mengen reiner Plasmid- DNA, wie sie für Klonierungen, Sequenzierungen oder Transfektionen benötigt wurden, erfolgte die Präparation mit dem NucleoBond® PC 100- Kit nach Anleitung des Herstellers.

Maxipräparation

18 l einer Übernachtskultur wurden abzentrifugiert (5000 rpm, 5 Min., Rotor JA 10), das Bakterienpellet in 1 l Lösung A resuspendiert und 20 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 1 l Lösung B wurde kurz durchmischt, anschließend 1,4 l kalte Lösung C zupipettiert und wieder geschüttelt. Es folgte eine Inkubation für 20- 30 Min. auf Eis. Die dadurch ausgefällte hochmolekulare DNA sowie Protein wurden abzentrifugiert (10000 rpm, 25 Min., 4 °C, Rotor JA 10), die im Überstand enthaltene Plasmid- DNA mit 0.6 Volumen Isopropanol bei Raumtemperatur für 30 Min. gefällt und anschließend pelletiert (8000 rpm, 20 Min., 4 °C, Rotor JA 10). Das Pellet wurde kurz an der Luft getrocknet, in 150 ml Aq_{DEST} aufgenommen und dreimal mit Phenol/Chloroform extrahiert (1 Vol. Phenol, je 0.5 Vol. Phenol u. Chl., 1 Vol. Chl.; 3000 rpm, 5 Min., Minifuge T). Der letzte Überstand wurde mit 3 Volumen Ethanol versetzt, die DNA eine Stunde bei -70 °C gefällt und mit 70% -igem Ethanol

gewaschen. Nach Zentrifugation (12000 rpm, 20 Min., 4 °C, Rotor JA 14) wurde das DNA- Pellet an der Luft getrocknet, in 9 ml CsCl in 20 mM Tris/Cl pH 7.5 aufgenommen und in *Quick-Seal-Tubes* (5/8x3 inch, 16x76 mm) gefüllt. Es wurden 400 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben, die *Tubes* mit Paraffin austariert und verschweißt. Durch die anschließende Dichtegradientenzentrifugation (50000 rpm, 20 Std., 20 °C, Rotor TFT 65.13) erfolgte eine Trennung der Plasmid- DNA von chromosomaler DNA und RNA. Unter UV wurde die Plasmid- DNA- Bande abgezogen und einer zweiten Dichtegradientenzentrifugation unterzogen (*Tubes*: 1/2x2 inch; 60000 rpm, 4 Std., 20 °C, Rotor VTi 65.2). Eine nochmalige Zugabe von Ethidiumbromid war nicht nötig. Die Plasmidbande wurde erneut abgezogen und das Ethidiumbromid durch mehrmaliges Ausschütteln mit CsCl gesättigtem Isopropanol vollständig entfernt. Um das CsCl zu entfernen, wurde die DNA gegen 5 mM Tris/Cl pH 7.5 dialysiert. Die Konzentration der Plasmid- DNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt.

Lösung A: 50 mM Glukose
 25 mM Tris/Cl pH 8.0
 10 mM EDTA
 2 mg/ml Lysozym *vor Gebrauch* zugeben

Lösung B: 0.1 N NaOH
 1 % SDS

Lösung C: 3 M Na- Acetat pH 4.8 in 2 M Essigsäure

2.4.8) Sequenzierung von DNA

Für Sequenzierungen von DNA wurde der Applied Biosystems *Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* verwendet. Die *Cycle Sequencing PCR* (Sequenzreaktion) wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. DNA aus analytischen Präparationen wurde zuvor nochmals mit Ethanol präzipitiert, während DNA aus präparativen Isolierungen direkt in die PCR eingesetzt wurde.

Reaktionsansatz: 1 µg DNA
 1,5- 3 pmol Primer
 2 µl *Big Dye reaction mix*
 ad 10 µl H₂O

Cycle Sequencing PCR: 30 Sek., 96 °C
 15 Sek., 50 °C
 4 Min., 60 °C
 24 Zyklen

Der Reaktionsansatz wurde anschließend mit 56 µl 100% -igem Ethanol und 26 µl H₂O 15 Min. bei Raumtemperatur gefällt und 45 Min. bei 13000 rpm zentrifugiert. Die pelletierte DNA wurde mit 100 µl 70% -igem Ethanol gewaschen, 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert, 10 Min. bei 13000 rpm zentrifugiert, getrocknet und bis zum weiteren Gebrauch bei 4 °C gelagert. Für die Analyse der Sequenzreaktion auf einem denaturierenden DNA- Sequenzgel wurde die Probe in 2,3 µl Probenpuffer (Perkin Elmer) resuspendiert und 2 Min. bei 95 °C denaturiert. Auf das Gel aufgetragen wurden jeweils 2 µl der Probe.

Die gelelektrophoretische Analyse der Sequenzreaktionen erfolgte mit dem ABI PRISM 377 *DNA Sequencer* der Firma Perkin Elmer. Für die benötigten 48 cm langen, 4,75% -igen denaturierenden Gele wurden 5,7 ml 30% -ige Acrylamidstammmlösung, 6 ml 10x TBE und 21,6 g Harnstoff und 31,5 ml H₂O gemischt, über ein 0,2 µm Zellosefilter filtriert und entgast. Nach Zugabe von 300 µl 10% APS und 42 µl TEMED wurde die Lösung mit Hilfe einer Spritze in die zum System gehörende Gelkammer gedrückt. Nach zweistündiger Polymerisation des Gels erfolgte der Einbau in die *Sequencer* Apparatur, mit 1x TBE als Laufpuffer. Sobald beim Vorlauf (50 W) eine konstante Geltemperatur von 51°C erreicht war, wurden die Proben aufgetragen und der Hauptlauf gestartet (2700 V, 12 Std.). Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte automatisch mittels der zum System gehörenden Software (DNA Sequencing Analysis Software, Version 2.1.1).

10x TBE: 108 g Tris
 55 g Borsäure
 ad 900 ml Aq_{DEST}
 40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
 ad 1 l

2.5) Präparation und Analyse von RNA

Für Arbeiten mit RNA wurden fabrikverpackte Chemikalien und Verbrauchsmaterialien benutzt. Zur Inaktivierung möglicher RNasen wurden Elektrophoresekammern mit H₂O₂ oder aktivem DEPC- H₂O behandelt, Glaswaren und Eppendorfreaktionsgefäße wurden für 3 Tage bei 100°C gebacken. H₂O und Lösungen, die keine Amine enthielten, wurden mit 0,1% DEPC versetzt und über Nacht gerührt. Das DEPC wurde anschließend durch Autoklavieren inaktiviert.

2.5.1) Isolierung von RNA aus Eukaryoten- Zellen

Die Präparation von Gesamtzell- RNA aus eukaryotischen Zellen erfolgte mittels des *peqGold TriFast*- Reagenz (Peqlab) nach Angaben des Herstellers. (Chomczynski und Sacchi, 1987).

2.5.2) RNA- Agarosegelelektrophorese (Kroczek und Siebert, 1990)

Einzelsträngige RNA- Moleküle bilden im nativen Zustand Sekundärstrukturen aus, die das Laufverhalten der RNA während der Elektrophorese beeinträchtigen. Daher erfolgt zum einen die Vorbereitung der Proben für den Gelauftrag wie auch die elektrophoretische Auftrennung der RNA unter denaturierenden Bedingungen. Für die Denaturierung der RNA vor der Elektrophorese wurde die RNA mit einem Formaldehyd/Formamid- haltigen Probenpuffer im Verhältnis 5:1 gemischt, 15 Min. bei 65 °C erhitzt und auf Eis abgeschreckt. Die anschließende Auftrennung der RNA erfolgte in 1,3% -igen, formaldehydhaltigen Agarosegelen. Hierzu wurden 1,3 g Agarose in 80 ml DEPC- behandeltem H₂O aufgekocht. Nach Abkühlen der Agarose auf etwa 60 °C wurden 10 ml 10x MOPS/EDTA und 3 ml Formaldehyd zugegeben. Nach einem 30- minütigen Vorlauf bei 50 V wurden die Proben aufgetragen und bei 80 V über 3- 4 Stunden aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1x MOPS/EDTA.

10x MOPS/EDTA: 0,2 M MOPS
 10 mM Natriumacetat
 10 mM EDTA pH 7,0 (eingestellt mit Eisessig).

RNA- Probenpuffer:	200 µl 10x MOPS/EDTA 1 ml Formamid (deionisiert) 345 µl Formaldehyd (37%) 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) 100 µl Formamid- Dye.
Formamid- Dye:	0,1% Bromphenolblau 0,1% Xylenyanol 10 mM EDTA.

2.5.3) *In vitro* Transkription

Die Herstellung der Transkripte für die *in vitro* Translation erfolgte über *in vitro* Transkriptionsreaktionen mit T7 RNA- Polymerase (Roche). Die zu transkribierende Plasmid- DNA („Transkriptions- Matrize“) wurde zuvor mit einem entsprechenden Restriktionsenzym linearisiert, mit Phenol/Chloroform extrahiert, mit Ethanol präzipitiert und für 10 Min. bei 67 °C inkubiert. Die Vollständigkeit der Linearisierung wurde in der Gelelektrophorese überprüft.

Reaktionsansatz: 1 µg DNA
2 µl 10x Transkriptionspuffer (Roche)
2 µl 10 mM rNTPs
1 µl RNase Inhibitor, 20 U/µl
2 µl T7 RNA- Polymerase, 20 U/µl (Roche)
ad 20 µl H₂O, DEPC- behandelt

Die Reaktion wurde für 2 Std. bei 37 °C inkubiert.

Die Analyse der Transkripte erfolgte in denaturierenden RNA- Agarosegelen.

2.5.4) *In vitro* Translation

Zur *in vitro* Synthese der gewünschten Proteine wurde das Rabbit Reticulocyte Lysate System (Amersham Biosciences) verwendet. Der Reaktionsansatz von 50 µl wurde nach Angaben des Herstellers erstellt und 60 - 90 Min. bei 30 °C inkubiert. Als markierte Aminosäure wurde [³⁵S]- Methionin (Amersham Biosciences) verwendet.

2.6) Protein- analytische Methoden

2.6.1) Konzentrationsbestimmung

Proteinbestimmungen wurden nach der Methode von Bradford (1976) mit dem Proteinassay- Farbreagenz von Bio-Rad nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zu 800 μl Probenvolumen ($\leq 25 \mu\text{g}$ Protein) wurden je 200 μl Farbreagenz zugegeben und sorgfältig vermischt. Nach 10 Min. wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen und die Proteinkonzentration der Probe durch Vergleich mit zuvor durchgeführten BSA- Standardreihen bestimmt.

2.6.2) Proteinfällung mit Aceton

Zu 1 Volumen Proteinlösung wurden 4 Volumen eiskaltes Aceton zugegeben und gut gemischt. Der Ansatz wurde mindestens 90 Min. bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert, bei wenig Protein im Ansatz, wurde über Nacht bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gefällt.

Anschließend wurde der Ansatz in einer Tischzentrifuge bei max. Geschwindigkeit 15 Min. bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ abzenrifugiert, dann wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und die Proben unter Vakuum 15 Min. getrocknet. Für eine nachfolgende SDS-PAGE wurden die Proben in der gewünschten Menge 4x PP resuspendiert.

2.6.3) Immunpräzipitation

Pro Probe wurden 10 mg ProteinG- Sepharose 30 Min. in 2 ml Aq_{DEST} bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert und anschließend 4x in je 100 μl 1% -igem Tritonpuffer gewaschen. Die ProteinG- Sepharose wurde dann in 250 μl 1% -igem Tritonpuffer aufgenommen und mit 1 (polyklonaler α - GFP- AK) oder 10 (MAK 3F4) μl Antikörper versetzt. Nach 1 Std. Inkubation bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ (Taumler) wurde der Antikörper(AK) Sepharosekomplex 4x mit je 1 ml 1% -igem Tritonpuffer gewaschen und 45 μl Translationsansatz zugegeben. Zur Ausbildung des Protein- AK- Komplexes wurde mindestens 1 Std. bei RT oder bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ über Nacht getaumelt. Die Suspension wurde für 10 Min. bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert, das Pellet anschließend 3x mit je 500 μl 0,2% -igem Tritonpuffer gewaschen und in 30 μl 4x Probenpuffer resuspendiert. Zur Abtrennung der ProteinG- Sepharose wurde 10 Min. auf $95 \text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt und die Probe auf

ein SDS- Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Marker wurden 7 μ l [14 C] Methylated Proteins (Amersham Biosciences) mit aufgetragen.

Nach abgeschlossener SDS- PAGE wurde das Gel entweder für 2 Std. bei RT oder über Nacht bei 4 °C in 7% Essigsäure (Schüttler) und danach ebenfalls entweder für 2 Std. bei RT oder über Nacht bei 4 °C in 20% Methanol und 3% Glycerol inkubiert. Anschließend wurde das Gel getrocknet und auf einem Röntgenfilm bei RT exponiert. Die Dauer der Exposition richtete sich nach der Stärke des Signals und konnte bis zu 7 Tagen betragen.

RIP- Grundpuffer: 20 mM Tris- HCl
 100 mM NaCl
 1 mM EDTA
 2 mg/ ml BSA (frisch einwiegen)

1% Tritonpuffer: 1% Triton X-100
 0,5% DOC
 0,1% SDS
 aufgefüllt mit RIP- Grundpuffer

0,2% Tritonpuffer: 0,2% Triton X-100
 auffüllen mit RIP- Grundpuffer

2.6.4) Diskontinuierliche SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte durch eine diskontinuierliche SDS- PAGE nach Laemmli (1970). Soweit im Text nicht anders vermerkt wurden Trenngele mit einer Konzentration von 12,5% Acrylamid und Sammelgele mit 5% Acrylamid verwendet. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 0,25 Volumen 4x SDS- Probenpuffer (4x PP) versetzt und durch 10- minütiges Kochen bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte in Tris- Glycin- Puffer bei einer konstanten Stromstärke von 35 mA in einer Minigelapparatur.

2.6.7) Western blot Analyse mit ECL- Färbung

Der Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf die Immun- Blot™ PVDF Membran oder auf Nitrocellulose erfolgte nach dem „semi-dry“- Verfahren mit der *Trans-Blot SD*- Apparatur der Firma Bio-Rad. Entsprechend den Angaben des Herstellers wurden Minigele für 30 Min. bei 10 V geblottet. Anschließend wurde die PVDF- Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 Std. in Blocking- Puffer geschwenkt.

Die Inkubation mit dem ersten Antikörper (Verdünnung in Blocking- Puffer) erfolgte über Nacht bei 4 °C oder für mindestens 1 Std. bei Raumtemperatur. Nach dem Waschen der Membran für 3x 10 Min. in Waschpuffer wurde der zweite Antikörper (Verdünnung in Blocking- Puffer) zugegeben und mindestens 45 Min. bei Raumtemperatur oder über Nacht inkubiert. Die Membran wurde danach erneut 3x für je 10 Min. in Waschpuffer gewaschen und anschließend gefärbt.

Die Detektion erfolgte mit Hilfe der verstärkten Chemilumineszenz (ECL). Die Färbereaktion erfolgte für 1 Min. in 10 ml Färbelösung (Lsg 1 + Lsg 2), wobei die Chemilumineszenz- Signale der markierten Proteine mittels ECL Hyperfilm (Amersham) detektiert wurden.

Blocking- Puffer: 5% Magermilch- Puffer
 0,1% Tween20
 in PBS ansetzen.

Waschpuffer NaCl 40g
 KCl 1g
 Na₂HPO₄ 14,5g
 KH₂PO₄ 1g
 TWEEN 20 5ml
 Ad 5 l.

ECL- Färbelösung	Lösung 1	Lösung 2
	4,4ml H ₂ O	4,5ml H ₂ O
	0,5ml 1M Tris- HCl pH 8,8	0,5ml 1M Tris- HCl pH 8,8
	50µl Luminol (250mM Luminol, in DMSO gelöst, in -20°C lagern)	3µl H ₂ O ₂ (30%, bei 4°C lagern)
	22µl Cumarsäure (90mM p-Cumarsäure in DMSO, bei -20°C lagern)	

2.6.8) Eukaryotische Expression rekombinanter Prion- Reporter- Fusionsproteine

Zur Expression wurden die in pcDNA3 vorliegenden Fusionskonstrukte in N2a- oder 293- Zellen transfiziert und 72 Std. bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die anschließende Aufarbeitung der rekombinanten Proteine wurden die Zellen mit Waschpuffer (Monnet et al., 2003) abgespült und 5 Min. bei maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 37,5 µl TNE- Puffer (Lorenz et al., 2001) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 2x 30 Sek. lang beschallt und 30 Min. lang abzentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde 4x PP aufgenommen, 10 Min. bei 95 °C inkubiert und in eine SDS- PAGE mit anschließender Western blot Analyse eingesetzt.

Waschpuffer:

20 mM Tris- HCl, pH 7,5
150 mM NaCl.

TNE- Puffer:

150 mM NaCl
5 mM EDTA
50 mM Tris- HCl, pH 7,5
0,2% (w/v) Sarkosyl.

2.6.9) Bakterielle Expression rekombinanter Prion- EGFP- Fusionsproteine

Zur Expression wurden die rekombinanten pQE-51- Vektoren in *E.coli* M15 transformiert. Die High- level Expression in *E. coli* mit pQE- Vektoren basiert auf dem T5- Promotor Transkriptions- Translationssystem.

Das Promotor- Operator- Element besteht aus dem Promotor des Phagen T5, der von der *E. coli* RNA Polymerase erkannt wird und zwei *lac* Operon Sequenzen, die die Bindung des *lac* Repressors verstärken und die effiziente Repression des T5 Promotors garantieren. Alle pQE- Plasmide enthalten das β - lactamase Gen (*bla*), das Ampicillin- Resistenz verleiht. Zusätzlich wird in diesem System das pREP4 Plasmid benötigt. pREP4 verleiht Kanamycin Resistenz und exprimiert konstitutiv das *lac* Repres-

sorprotein, welches von dem *lac I* Gen kodiert wird. In den verwendeten Wirtszellen liegt pREP4 in genügend Kopien vor, um eine ausreichende Menge an *lac* Repressorprotein zur vollständigen Blockade des Operons zur Verfügung zu haben.

Die Expression des rekombinanten Proteins lässt sich in diesem System durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG) induzieren, da IPTG an das *lac* Repressorprotein bindet und es inaktiviert. Ist der Repressor inaktiv, kann die *E. coli* RNA Polymerase die Sequenz strangabwärts des Promotors ablesen (Stüber et al., 1990).

Der für die Transformation dieser Plasmide verwendete *E. coli*- Stamm M15[pREP4] enthält das pREP4 Plasmid bereits.

Transformierte *E.coli* (M15) Bakterien wurden unter Ampicillin- (100 μ g/ml) und Kanamycinselektion (25 μ g/ml) über Nacht bei 37 °C in 100 ml geschüttelt. Am nächsten Tag erfolgte die 1:4 Verdünnung der Übernachtskultur mit antibiotikahaltigem, 37 °C- warmem LB- Medium und die Fortsetzung der Inkubation für 45 Min. bei 37 °C. Zur Induktion der Synthese des gewünschten Proteins wurde IPTG bis zu einer Endkonzentration von 0,8mM zugegeben und weitere 3- 4 Std. bei 37 °C inkubiert.

Nach dieser Zeit wurden je 1,5 ml beider Kulturen pelletiert, in 100 μ l 4x PP aufgenommen, 3x 30 Sek. beschallt, 10 Min. bei 95 °C inkubiert und gelelektrophoretisch in einem 12,5% -igen PAA- Gel aufgetrennt. Von überprüften Bakterienkulturen wurden Dauerkulturen mit 30% Glycerolanteil hergestellt, die bei -70 °C gelagert wurden.

Zur Aufreinigung von bakteriell exprimiertem Protein wurde das Kulturvolumen um den Faktor 100 vergrößert und wie oben beschrieben kultiviert.

2.6.10) Virale Expression rekombinanter Prion- EGFP- Fusionsproteine

Mit Hoch- Titer Virusstock infizierte Sf9- Zellen wurden 168 Std. nach Infektion in 5 ml/ Vertiefung Lysepuffer aufgenommen und 10 Min. bei 14 000 rpm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Nach 30 Min. Inkubation auf Eis wurde der Ansatz 6x 30 Sek. auf Eis beschallt und anschließend 30 Min. bei 15000 rpm (JA-17 Rotor) zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde direkt für die Affinitätschromatographie eingesetzt, das Pellet wurde in 2% n-Octyl- β -D-Glucopyranoside resuspendiert,

nochmals 10 Min. bei 15000 rpm (JA-17 Rotor) zentrifugiert und ebenfalls für die Affinitätschromatographie eingesetzt.

Die Ni²⁺- NTA- Säule wurde nach Angaben des Hersteller (Qiagen) mit 2 ml einer 50% -igen Ni²⁺- NTA- Agarose- Suspension gepackt. Nach Äquilibrieren der Säule mit Lysepuffer wurde das oben beschriebene Zellysate auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde nachfolgend mit 10 ml Waschpuffer gewaschen. Die Durchfluss- und Waschfraktionen wurden getrennt aufgefangen und für die gelelektrophoretische Analyse bei 4 °C aufbewahrt. Die Elution der Fusionsproteine erfolgte mit Elutionspuffer. Die einzelnen Fraktionen wurden in einer SDS- PAGE auf ihre Reinheit und ihren Proteingehalt überprüft. Produkthaltige Fraktionen wurden bei 4 °C gegen PBS dialysiert.

Lysepuffer:	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
	2 mM	Imidazol
		pH = 8,3.
Waschpuffer:	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
	30 mM	Imidazol
		pH = 8,3.
Elutionspuffer:	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
	350 mM	Imidazol
		pH = 8,4.

2.6.11) Denaturierende Aufreinigung rekombinanter Fusionsproteine über Ni²⁺- NTA- Agarose

Die mittels pQE-51- System bakteriell exprimierten Fusionsproteine wurden nachfolgend denaturierend über Ni²⁺- NTA- Agarose affinitätschromatographisch gereinigt. Transformierte *E. coli* M15 wurden 3 Std. nach Induktion pelletiert (5000 rpm, 10 Min., 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet in 20 ml Puffer A resuspendiert. Nach Inkubation im Taumler für 1 Std. bei Raumtemperatur (Crowe & Henco, 1992) wurde das Bakterienlysate 3x 3 Min. beschallt, anschließend für 20 Min. gekocht und danach für 15 Min. bei 14 000 rpm und 4 °C (JA-17 Rotor) zentrifugiert. Der lösliche

Überstand wurde nachfolgend für die Affinitätschromatographie eingesetzt. Die Ni²⁺- NTA- Säule wurde nach Angaben des Hersteller (Qiagen) mit 2 ml einer 50% - igen Ni²⁺- NTA- Agarose- Suspension gepackt. Nach Äquilibrieren der Säule mit Puffer A wurde der zuvor mit Puffer A 1:1 verdünnte Überstand auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde nachfolgend mit 10 ml Waschpuffer gewaschen. Die Durchfluß- und Waschfraktionen wurden getrennt aufgefangen und für die gelelektrophoretische Analyse bei 4 °C aufbewahrt. Die Elution der Fusionsproteine erfolgte in 3 Schritten mit je 700 µl Elutionspuffer B, C, D. Die erhaltenen Fraktionen wurden bei 4 °C gegen PBS dialysiert und in einer SDS- PAGE auf ihre Reinheit und ihren Proteingehalt überprüft.

PBS: 8 g NaCl
 0,2 g KCl
 1,12 g Na₂PO₄
 0,2 g KH₂PO₄
 0,1 g CaCl₂
 0,1 g MgCl₂ x 6 H₂O
 ad 1l Aq_{DEST.}

Puffer A: 8 M Harnstoff
 0,1 M NaH₂PO₄
 0,01 M Tris pH 8.

Waschpuffer : 8 M Harnstoff
 0,1 M NaH₂PO₄
 0,01 M Tris pH 6,3.

Elutionspuffer B: 8 M Harnstoff
 0,1 M NaH₂PO₄
 0,01 M Tris pH 5,9.

Elutionspuffer C: 8 M Harnstoff
 0,1 M NaH₂PO₄
 0,01 M Tris pH 4,5.

Elutionspuffer D: 6 M GuHCl
 0,2 M HAc.

Auftrag SDS- PAGE: Bakterienlysate: 8 µl
 Überstand: 12 µl
 Durchfluß- / Wasch- / Elutionsfraktionen: je 20 µl

2.6.12) Luciferaseaktivitätstest

Eine 10 cm² Zellkulturschale der zu untersuchenden Zellen wurde vorsichtig mit 2 ml PBS gewaschen und mit 400 µl Lysepuffer (Cell Culture Lysis Reagent, 5x) abgelöst. Das Lysat wurde daraufhin 2 Min. bei 13000 rpm (Tischzentrifuge) zentrifugiert und der Überstand entweder sofort für den Test verwendet oder bei -20 °C zum späteren Gebrauch gelagert.

Für den Test wurden 20 µl Lysat in ein Luminometer Probenröhrchen gefüllt, die Injektion von 100 µl Luciferinsubstrat (Luciferase Assay Reagent verdünnt mit Aq_{DEST} 1:7) und die damit verbundene Messung von 10 Sek. erfolgte nach einer Negativreferenzmessung von 2 Sek. im Luminometer automatisch.

Die dargestellten Werte sind in relativen Lichteinheiten (RLU) angegeben. Vor jeder Messung erfolgte eine zusätzliche Negativreferenzmessung mit Aq_{DEST}.

2.6.13) Nachweis freier Sulfhydryl (SH)- Gruppen in Proteinen

Der Nachweis freier SH- Gruppen in Proteinen wurde mit Hilfe von 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) erbracht. Das Reagenz wird als DTNB abgekürzt und häufig auch Ellman- Reagenz (G.L. Ellman, 1959) genannt und ermöglicht den quantitativen Nachweis freier Sulfhydryl- Gruppen.

Das nachzuweisende Thiol reagiert mit dem Reagenz zu einem gemischten Disulfid. Dabei wird eine dem Thiol äquivalente Menge an 5-Thio-2-nitrobenzoat freigesetzt. Diese Verbindung ist intensiv gelb gefärbt und hat ein Absorptionsmaximum bei 412 nm. DTNB spaltet keine Disulfidbrücken und ist nicht in der Lage, Proteine zu denaturieren.

Benötigte Lösungen:

Phosphatpuffer (0,1 M, pH 8)	1,42 g Na ₂ HPO ₄ Anhydrat ad 100 ml Aq _{DEST} , pH 8 (mit Phosphorsäure einstellen).
DTNB- Lösung (10 mM)	39,6 mg DTNB 10 ml Phosphatpuffer pH 8.
Eichlösung	0,5 mM 1,4- Dithio-DL-threitol (DTT).
Meßansatz	Verdünnungsreihe Probe oder Eichlösung + 5 µl DTNB- Lösung ad 150 µl Phosphatpuffer, pH 8.

2.7) Virologische Methoden

Das Gateway- System basiert auf der spezifischen Rekombination des Phagen Lambda und ermöglicht so den Transfer von DNA zwischen verschiedenen Vektoren, ohne dass dabei die Orientierung des Gensegments oder der Leserahmen verändert werden. Der Integrationsbereich des Phagen Lambda wird *attP* genannt, in *E. coli* heißt die Integrationsstelle *attB*. Die beiden *att* Bereiche enthalten die Erkennungssequenz für die Proteine, die die Rekombination steuern (Integrase und Wirtsintegrationsfaktor). Findet eine solche Integration statt, entstehen dabei zwei neue *att* Bereiche, *attL* und *attR*. Diese Bereiche flankieren den Prophagen, wobei die DNA vollständig erhalten bleibt. Das Gateway- System nutzt diese *att*- Bereiche, indem das gewünschte Gen in einen „Entry- Clone“ (pENTR⁴), der 5` und 3` der Klonierungsstelle die *att* Bereiche *attL1* und *attL2* enthält. Linearisierte Baculo- DNA (BaculoDirect™ C- term Linear DNA) enthält alle Sequenzinformationen, die für die Expression in *Sf9*- Insektenzellen benötigt werden, nämlich den starken Polyhedrin Promotor, die *attR* Stellen, das *TK*- Gen für negative Selektion mit Ganciclovir und ein C- terminales 6x- Histidin (6x HIS) Epitop.

2.7.1) LR- Reaktion

Die rekombinanten Viren wurden über spezifische Rekombination des pENTR⁴- Vektors des Gateway- Systems und linearisierter Baculo- DNA generiert. Die Rekombinationsreaktion wird über einen Mix aus λ - Phagen und *E.coli*- Enzymen (Clonase™- Mix) vermittelt und erfolgt zwischen spezifischen Sequenzen (*att*- Sequenzen) in der Vektor- und Baculo- DNA (Ptashne, 1992).

Die Rekombination erfolgt in einem 15bp umfassenden homologen Kernbereich der *att*- Sequenz. Zusätzlich sind die umliegenden Sequenzen notwendig, da sie die Bindungsstellen für die Rekombinationsproteine beinhalten (Landy et al., 1989).

Zur Integration der Expressionskassette in die linearisierte Baculo- DNA mittels Clonase- Reaktion wurde eine LR- Reaktion wie folgt nach den Angaben des Herstellers durchgeführt:

Zu 100 – 300 ng pENTR® mit der gewünschten Expressionskassette und 300 ng BaculoDirect™ Linear DNA wurden 4 μ l Clonase™ zugesetzt und vorsichtig gemischt.

Die LR- Ansätze wurden über Nacht bei 25 °C inkubiert. Um die LR- Reaktion zu stoppen, wurden anschließend der Reaktion 2 µl Proteinase K / Ansatz zugesetzt und 10 Min. bei 37 °C inkubiert. Die Ansätze wurden daraufhin entweder direkt für die Transfektion eingesetzt oder bei 4 °C gelagert.

2.7.2) Transfektion in Sf9- Zellen

Für die Transfektion von Plasmid- DNA wurde die Liposomen- vermittelte Transfektion mit Cellfectin® angewandt.

Zu 10 µl des LR- Ansatzes wurden 100 µl un-supplementiertes Medium (UM; Medium ohne Zusatz von Hefelysat, Lactalbumin- Hydrolysat, FBS, Antibiotika) gegeben. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden 100 µl UM und 6 µl Cellfectin® gemischt. Beide Reaktionsansätze wurden gemischt, 45 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 800 µl UM zugegeben.

$1,5 \times 10^6$ Sf9- Zellen wurden pro Well eingesetzt und 1- 3 Std. zum Absetzen der Zellen inkubiert. Die Zellen wurden 2x mit je 2 ml UM vorsichtig gewaschen und anschließend mit dem Transfektions- Mix tropfenweise überschichtet.

Nach 5 Std. Inkubation bei 27 °C und feuchter Atmosphäre wurde der Transfektions- Mix von den Zellen abgezogen, die Zellen wurden anschließend mit frischem Medium (2 ml /Well) überschichtet, wobei zur Selektion noch 100 µM Ganciclovir eingesetzt wurde.

2.7.3) Herstellung eines Hoch- Titer Virus- Stockes

Die erhaltenen rekombinanten Viren wurden über mehrere Passagen auf Sf9- Zellen unter Selektionsdruck mit Ganciclovir zu einem hochtitrigen Virusstock vermehrt.

2.8) Konversionstest

2.8.1) Herstellung von Gehirnhomogenaten

Infektiöses Gehirnhomogenat wurde für alle Konversionstests als Quelle für PrP^{Sc} verwendet. In den PMCA- Versuchen (siehe 2.8.5) wurde sowohl infektiöses Gehirnhomogenat als Quelle für PrP^{Sc} benötigt, als auch normales Gehirnhomogenat (von nicht- infizierten Tieren). Das normale Gehirnhomogenat dient in der PMCA als Sub-

strat für die zyklische Amplifikation von PrP^{Sc} aus PrP^C. Für die modifizierte PMCA, mit der rekombinantes PrP- Fusionsprotein konvertiert werden sollte, wurde Gehirnhomogenat von gesunden PrP^{0/0}- Mäusen verwendet.

Frisch entnommenes Gehirn wurde einmal mit 4°C kaltem PBS gewaschen und gewogen.

Für Konversionsversuche wurde Gehirn in PBS zu 10% (w/v) in einem Fast Prep tube (BIO 101) homogenisiert (bei Speed 4,5 1x 40 Sek.).

Für PMCA- Versuche wurde Gehirn in Lösung 4 (s. 2.8.5) homogenisiert.

2.8.2) Aufreinigung von abnormen Fibrillen (SAF)

Eine modifizierte Version des Protokolls von Hilmert und Diringer (1984) wird für ovines, bovines, murines und Hamster- Gehirnmaterial verwendet.

Alle Zentrifugationsschritte wurden in einer Beckman TL100 benchtop Ultrazentrifuge mit einem 100.3 fixed angle Rotor und dickwandigen Polycarbonat- Zentrifugenröhrchen (Beckman quick seal 1/2 x 1- 1/4 in.) durchgeführt.

Benötigte Lösungen:

Lösung A (Homogenisierung)	10 g N-Lauroylsarcosin, Natriumsalz in 100 ml Aq _{DEST} pH auf 7,4 mit 1 M NaH ₂ PO ₄ einstellen. Lagerung bei 4°C.
Lösung B (Hochsalz- Lösung)	10 g NaCl 1 g N-Lauroylsarcosin, Natriumsalz in 100 ml Aq _{DEST} pH auf 7,2 mit 1 M NaH ₂ PO ₄ oder mit 0,1 M NaOH einstellen. Lagerung bei 4°C.
Lösung C (Proteinase K)	1 mg Proteinase K in 100 ml 0,01 M TrisHCl Lagerung in 1,5 ml Portionen bei -70°C.

1 g Gehirn wurde entweder mit einem Mörser in einem Glasgefäß in 2,5 ml Lösung A homogenisiert, oder es wurde bereits homogenisiertes Gehirn (in PBS) verwendet. Das Homogenat wurde 30 Min. bei RT inkubiert, dann bei 22 000g (20 000 rpm) und 4°C für 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhr-

chen gegeben, mit Lösung A aufgefüllt und vorsichtig gemischt. Es wurde für 20 Min. bei 540 000g (100 000 rpm) und 4 °C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 2,5 ml Lösung B resuspendiert und für 25 Min. bei 540 000g (100 000 rpm) und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde jetzt in 1,5 ml Lösung C resuspendiert und 1 Std. bei 37 °C mit einem Teflon beschichteten Magnetrührer inkubiert. Anschließend wurde die Lösung 10 Min. bei 22 000g (20 000 rpm) und 4 °C in einem Eppendorf- Reaktionsgefäß abzentrifugiert. Es gibt Adaptoren für diese Gefäße für den Beckman 100.3 Rotor. Das erhaltene Pellet wurde in 50 µl Aq_{DEST} resuspendiert.

2.8.3) *In vitro*- Konversion

Um die Konvertierbarkeit des bakteriell exprimierten, rekombinanten Prionproteins unter zellfreien Bedingungen zu testen, wurden zuerst die Disulfidbrücken (Jackson et al., 1999) des unter denaturierenden Bedingungen über Ni²⁺- NTA- Agarose aufgereinigten, rekombinanten Prionproteins mit 1 µM CuSO₄ in Gegenwart von gelöstem, atmosphärischem Sauerstoff reoxidiert, indem der Ansatz 16 Std. bei RT stark geschüttelt wurde. Anschließend wurde eine Vakuum- Dialyse gegen Natriumacetat, pH 5,5, über Nacht durchgeführt. Das so behandelte Protein wurde in Konversionspuffer resuspendiert.

Die eigentliche Konversionsreaktion erfolgte nach Protokoll der modifizierten PMCA (siehe 2.8.5).

2.8.4) Proteinase K- Verdau

Der zu testende Teil des Ansatzes wurde mit der gleichen Menge an 2x PK- Puffer versetzt. Die eine Hälfte des Ansatzes wurde mit Proteinase K mit einer Endkonzentration 80 µg/ml (Verdau von Hamsterprionprotein) bzw. 14,6 µg/ml (Verdau von Mausprionprotein) versetzt und verdaut. Der anderen Hälfte wurde als Kontrolle anstelle von Proteinase K die gleiche Menge von 10 mM Tris/HCl pH 7,4 beigefügt. Die Ansätze wurden entsprechend der Probe für 30 (Verdau von Mausprionprotein) bzw. 60 Min. (Verdau von Hamsterprionprotein) bei 37 °C inkubiert und anschließend für die Western blot Analyse weiterverarbeitet.

Modifizierte PMCA- Ansätze wurden teils mit 29 µg/ml Proteinase K für 30/ 45 Min. bei 37 °C verdaut.

2.8.5) *In vitro* Konversion mit modifizierter PMCA

Saborio et al. publizierten 2001 eine Methode zur schnellen und effizienten Konversion von PrP^C in PrP^{Sc}, die sie PMCA (Protein Misfolding Cyclic Amplification) nannten: Man nimmt 10% -iges Gehirnhomogenat eines an Scrapie erkrankten Hamsters (HH^{Sc}) und gibt einen Überschuß 10% -iges Gehirnhomogenat eines gesunden Hamsters (HH^C) hinzu. Nach einer Stunde Inkubationszeit (37 °C, 450 rpm im Thermomixer) wird die Suspension beschallt. Durch das Beschallen sollen die neu gewachsenen PrP^{Sc}- Aggregate in kleinere Einheiten zerbrochen werden, die dann wiederum im nächsten PMCA- Zyklus weiteres PrP^{Sc}- Wachstum initiieren können. Das HH^{Sc} dient als Template für die Konversion, HH^C ist das Substrat und unbekannte Faktoren im Gehirnhomogenat katalysieren vermutlich die Reaktion.

Diese Methode wurde zur Konversion der rekombinanten Fusionsproteine wie folgt modifiziert:

da als Substrat das rekombinante Fusionsprotein dienen sollte, aber die nicht bekannten Katalyse- Faktoren aus Gehirnhomogenat mit im Ansatz sein sollten, wurde 25% -iges HH von Prp^{0/0}- Mäusen verwendet. Das 25% -ige HH^{0/0} wurde im Ansatz auf eine Endkonzentration von 10% verdünnt, muHH^{Sc} wurde in einer Endkonzentration von 1:100 als Template zugegeben, variable Mengen an rekombinantem Fusionsprotein und Konversionspuffer.

Standardansatz:

- 60 µl 25% HH^{0/0}
- 1,5 µl 10% HH^{Sc}
- 40– 88,5 µl rekombinantes Prionprotein
- ad 150 µl Konversionspuffer.

Nach 3 Std. Inkubation bei 37 °C und 550 rpm im Thermomixer wurde der Ansatz zum ersten Mal für 2x 1 Sek. mit 20W/Sek. beschallt. An Tag 1 folgten zwei weitere 3 stündige Inkubations- Schall- Zyklen, dann wurde über Nacht im Thermomixer inkubiert und am nächsten Tag stündlich bis zu 8x beschallt. Um die Amplifikation von rekombinanten Prionprotein weiter voran zutreiben, wurden 10 – 20 µl ent-

nommen und in einen frischen PMCA- Ansatz ohne infektiöses Gehirnhomogenat gegeben. Ein solcher PMCA- 2 Ansatz wurde wie oben beschrieben behandelt.

Anschließend wurde 1/3 des Ansatzes direkt mit Aceton gefällt, die restlichen 2/3 wurden mit 29 µg/ml Proteinase K für 30 Min. bei 37 °C verdaut und dann mit Aceton über Nacht gefällt.

Die so behandelten Proben wurden anschließend auf ein SDS- PAGE aufgetragen und je nach Herkunft des rekombinanten Prionproteins wurde entweder ein Western blot oder eine Radioimmunpräzipitation durchgeführt.

Lösung 1: Phosphate buffered saline (PBS)

NaCl 8 g
KCl 0,2 g
Na₂HPO₄ 1,44 g
KH₂PO₄ 0,24 g
Aq_{DEST} 900 ml
pH auf 7,4 einstellen
Mit Aq_{DEST} auf 1 l auffüllen.

Lösung 2: NaCl 5 M

NaCl 58,44 g
Mit Aq_{DEST} auf 200 ml auffüllen.

Lösung 3: Complete Protease Inhibitor Cocktail

1 Tablette Complete Protease Inhibitor Cocktail
in 1 ml Aq_{DEST} lösen.
Lagerung bei -20°C.

Lösung 4: Konversionspuffer

	1 ml:
PBS 1x (Lsg.1)	952 µl
NaCl 5 M (Lsg.2)	30 µl
Triton X-100	10 µl
EDTA 0,5 M (pH= 8,0)	8 µl
Complete Protease Inhibitor Cocktail	20 µl /Stock

V Literaturverzeichnis

Aguzzi, A. (2006) Prion diseases of humans and farm animals: epidemiology, genetics, and pathogenesis. *J. Neurochem.* **97**,1726- 1739.

Alper, T., Haig, D.A., Clarke, M.C. (1966). The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **22**, 278- 284.

Anderson, L., Rossi, D., Linehan, J., Brandner, S., Weissmann, C. (2004). Transgene-driven expression of the Doppel protein in Purkinje cells causes Purkinje cell degeneration and motor impairment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 3644- 3649.

Asante, E.A., Linehan, J.M., Desbruslais, M., Joiner, S., Gowland, I., Wood, A.L., Welch, J., Hill, A.F., Lloyd, S.E., Wadsworth, J.D.F., Collinge, J. (2002). BSE prions propagate as either variant CJD-like or sporadic CJD- like prion strains in transgenic mice expressing human prion protein. *EMBO J.* **21**, 6358- 6366.

Baron, T.G.M., Betemps, D., Groschup, M.H., Madec, J.Y. (1999). Immunological characterisation of the sheep prion protein expressed as fusion proteins in *Escherichia coli*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **25**, 379- 384.

Baron, G.S., Wehrly, K., Dorward, D.W., Chesebro, B., Caughey, B. (2002). Conversion of raft associated prion protein to the protease- resistant state requires insertion of PrP-res (PrpSc) into contiguous membranes. *EMBO J.* **21**, 1031- 1040.

Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Walchli, M., Groth, D.F., McKinley, M.P., Prusiner, S.B. and Weissmann, C. (1986). Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* **46**, 417- 428.

Bhaumik, S. and Gambhir, S.S. (2002). Optical imaging of *Renilla* luciferase reporter gene expression in living mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 377- 382.

Béranger, F., Mange, A., Salassol, J., Lekmann, S. (2001). Cell culture models of transmissible spongiform encephalopathies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289**, 311- 316.

Bian, J., Nazor, K.E., Angers, R., Jernigan, M., Seward, T., Centers, A., Green, M., Telling, G.C. (2006). GFP- tagged PrP supports compromised prion replication in transgenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340**, 894- 900.

- Bieschke, J., Weber, P., Sarafoff, N., Giese, A., Kretzschmar, H. (2004). Autocatalytic self- propagation of misfolded prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 12207-12211.
- Birkett, C.R., Hennion, R.M., Bembridge, D.A., Clarke, M.C., Chree, A., Bruce, M.E. Bostock, C.J. (2001). Scrapie strains maintain biological phenotypes on propagation in a cell line culture. *EMBO J.* **20**, 3351- 3358.
- Birnboim, H.C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513- 1523.
- Bocharova, O.V., Breydo, L., Parfenov, A.S., Salnikov, V.V., Baskakov, I.V. (2005). *In vitro* Conversion of Full- length Mammalian Prion Protein Produces Amyloid Form with Physical Properties of PrP^{Sc}. *J. Mol. Biol.* **346**, 645- 659.
- Bounhar, Y., Zhang, Y., Goodyer, C.G., LeBlanc, A. (2001). Prion Protein Protects Human Neurons against Bax- mediated Apoptosis. *J. Biol. Chem.* **276**, 39145- 39149.
- Büeler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H.P., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., Aguet, M., Weissmann, C. (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell- surface PrP protein. *Nature* **356**, 577- 582.
- Büeler, H.R., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R.A., Autenried, P., Aguet, M., Weissmann, C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* **73**, 1339- 1347.
- Butler, D.A., Scott, M.R.D., Bockman, J.M., Borchelt, D.R., Taraboulos, A., Hsiao, K.K., Kingsbury, D.T., Prusiner, S.B. (1988). Scrapie- Infected Murine Neuroblastoma Cells Produce Protease- Resistant Prion Proteins. *J. Virol.* **62**, 1558- 1564.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248- 254.
- Cappai, R. und Collins, S.J. (2004). Structural Biology of Prions. Aus: Prions. A Challenge for Science, Medicine and the Public Health System, H.F. Rabenau, J. Cinatl, H.W. Doerr, eds. (Basel, Switzerland: Karger), pp. 14- 32.
- Castilla, J., Saá, P. and Soto, C. (2004). Cyclic Amplification of Prion Protein Misfolding. Aus: Techniques in Prion Research, S. Lehmann and J. Grassi, eds. (Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag), pp. 198- 213.
- Castilla, J., Saá, P., Hetz, C., Soto, C. (2005). In Vitro Generation of Infectious Scrapie Prions. *Cell* **121**, 195- 206.

Caughey, B.W., Dong, A., Bhat, K.S., Ernst, D., Hayes, S.F., Caughey, W.S. (1991). Secondary Structure Analysis of the Scrapie- Associated Protein PrP 27-30 in Water by Infrared Spectroscopy. *Biochemistry* **30**, 7672- 7680.

Chalfie, M. (1995). Green fluorescent protein. *Photochem. Photobiol.* **62**, 651- 6.

Chandler, R.L. (1961). Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet* **24**, 1378- 1379.

Chesebro, B., Race, R., Wehrly, K., Nishio, J., Bloom, M., Lechner, D., Bergstrom, S., Robbins, K., Mayer, L., Keith, J.M., Garon, C., Haase, A. (1985). Identification of scrapie- prion specific mRNA in scrapie- infected and uninfected brain. *Nature* **315**, 331- 333.

Chomczynski P und Sacchi N. (1987). Single- step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol- chloroform extraction. *Anal Biochem.* **162**, 156- 159.

Cox, D.L., Pan, J., Singh, R.R.P (2006). A mechanism for copper inhibition of infectious prion conversion. *Biophys. J.* **91**, L11- 13L.

Creutzfeld, H.G. (1920). Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z. Gesam. Neurol. Psychiatr.* **57**, 1- 18.

Crowe, J., Henco, K. (1992). The QIAexpressionist-2nd ed. Qiagen GmbH, Hilden Germany

Cuille, J. and Chelle, P.L. (1939) Experimental transmission of trembling to the goat. *C. r. hebd. Seanc. Acad. Sci., Paris* **208**, 1058- 1060.

Czub, M., Braig, H.R., Diringer, H. (1988). Replication of the scrapie agent in hamsters infected intracerebrally confirms that pathogenesis of an amyloid- inducing virosis. *J. Gen. Virol.* **69**, 1753- 1756.

Deleault, N.R., Lucassen, R.W., Supattapone, S. (2003). RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature* **425**, 717- 720.

Detwiler, L.A., Jenny, A.L., Rubenstein, R., Wineland, N.E. (1996). Scrapie: a review. *Sheep & Goat Res.* **12**, 111- 131.

Devereux, J., Haerberli, P. and Smithies, O. (1984)
A comprehensive set of sequence ANALYSIS PROGRAMS FOR THE Vax.
Nuc. Acids Res. **12**, 387.

Dickinson, A.G. and Outram, G.W. (1988). Genetic aspects of unconventional virus infections: the basis of the virino hypothesis. *Ciba Found. Symp.* **135**, 63- 83.

Didier, A., Dietrich, R., Steffl, M., Gareis, M., Groschup, M.H., Müller- Hellwig, S., Märtlbauer, E., Amselgruber, W.M. (2006). Cellular prion protein in the bovine mammary gland is selectively expressed in active lactocytes. *J. Histochem. Cytochem.* **54**, 1255- 1261.

Diener, T.O., McKinley, M.P., Prusiner, S.B. (1982). Viroids and prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 5220- 5224.

Donne, D.G., Viles, J.H., Groth, D., Mehlhorn, I., James, T.L., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Wright, P.E., 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. USA* **94**, 13452- 13457.

Eigen, M. (1996). Prionics or the kinetic basis of prion diseases. *Biophys. Chem.* **63**, A1- A18.

Ellman, G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70- 77.

Fischer, M., Rüllicke, T, Raeber, A., Sailer A., Moser M., Oesch B., Brandner S., Aguzzi A., Weissmann C. (1996). Prion protein (PrP) with amino- proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J.* **15**, 1255- 1264.

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

Fuchs, C. (2004). *In vitro* und *in vivo* Konversion von markierten und durch das Baculovirus- Expressionssystem exprimierten GFP- Prionfusionsproteinen. *Diplomarbeit der Fakultät für Biologie der Eberhard- Karls- Universität Tübingen.*

Gajdusek, D.C. and 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.

Gajdusek, D.C., Gibbs, C.J., Alpers, M. (1966). Experimental transmission of a kuru- like syndrome to chimpanzees. *Science*, **155**, 212- 214.

Gajdusek, D.C. (1977). Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science* **197**, 943- 960.

- Griffith, J.S. (1967). Self- replication and scrapie. *Nature* **215**, 1043- 1044.
- Gu, Y., Luo, X., Basu, S., Fujioka, H., Singh, N. (2006). Cell- specific Metabolism and Pathogenesis of Transmembrane Prion Protein. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 2697- 2715.
- Hadlow, W.J. (1959). Scrapie and kuru. *Lancet* **ii**, 289- 290.
- Hedge, R.S., Tremblay, P., Groth, D., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., Lingappa, V.R. (1999). Transmissible and genetic prion diseases share a common pathway of neurodegeneration. *Nature* **402**, 822- 826.
- Heske, J., Heller, U., Winklhofer, K.F., Tatzelt, J. (2004). The C- terminal Globular Domain of the Prion Protein is Necessary and Sufficient for Import into the Endoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* **279**, 5435- 5443.
- Hill, A.F., Antoniou, M., Collinge, J. (1999). Protease- resistant prion protein produced *in vitro* lacks detectable infectivity. *J. Gen. Virol.* **80**, 11- 14.
- Hilmert, H. and Diringer, H. (1984). A rapid method to enrich SAF- protein from scrapie brains of hamsters. *Biosci. Rep.* **4**, 165- 170.
- Hölscher, C., Bach, U.C., Dobberstein, B. (2001). Prion Protein Contains a Second Endoplasmic Reticulum Targeting Signal Sequence Located at Its C Terminus. *J. Biol. Chem.* **276**, 13388- 13394.
- Horiuchi, M. and Caughey, B. (1999). Specific binding of normal prion protein to the scrapie form via a localized domain initiates its conversion to the protease- resistant state. *EMBO J.* **18**, 3193- 3203.
- Hsiao, K., Baker, H.F., Crow, T.J., Poulter, M., Owen, F., Terwilliger, J.D., Westaway, D., Ott, J., Prusiner, S.B. (1989). Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann- Straussler syndrome. *Nature* **388**, 342- 345.
- Huang, Z., Prusiner, S. B., Cohen, F. E. (1996). Scrapie prions: a three- dimensional model of an infectious fragment. *Fold. Des.* **1**, 13-19.
- Iniguez, V., McKenzie, D., Mirwald, J., Aiken, J. (2000). Strain- specific propagation of PrP^{Sc} properties into baculovirus- expressed hamster Prp^C. *J. Gen. Virol.* **81**, 2565- 2571.
- Ivanova, L., Barmada, S., Kummer, T., Harris, D.A. (2001). Mutant Prion Proteins Are Partially Retained in the Endoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* **276**, 42409- 42421.

Jackson, G.S., Hill, A.F., Joseph, C., Hosszu, L., Power, A., Waltho, J.P., Clarke, A.R., Collinge, J. (1999). Multiple folding pathways for heterologously expressed human prion protein. *Biochim. Biophys. Acta* **1431**, 1- 13.

Jakob, A. (1921a). Über die eigenartige Erkrankung des Zentralnervensystems mit bemerkenswerten anatomischen Befunden (spastische Pseudosklerose- Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Dtsch. Z. Nervenheilk.* **70**, 132.

Jakob, A. (1921b). Über eine der multiplen Sklerose klinisch nahestehende Erkrankung des Zentralnervensystems (spastische Pseudosklerose) mit bemerkenswerten anatomischen Befunden: Mitteilung eines vierten Falls. *Med. Klin.* **17**, 372.

James, T.L., Liu, H., Ulyanov, N.B., Farr- Jones, S., Zhang, H., Donne, D.G., Kaneko, K., Groth, D., Mehlhorn, I., Prusiner, S.B., Cohen, F.E. (1997). Solution structure of a 142- residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 10086- 10091.

Kascsak, R.J., Rubenstein, R., Merz, P.A., Tonna- DeMasi, M., Fersko, R., Carp, H.M., Diringer, H. (1987). Mouse Polyclonal and Monoclonal Antibody to Scrapie- Associated Fibril Proteins. *J. Virol.* **61**, 3688- 3693.

Kim, N.H., Choi, J.K., Jeong, B.H., Kim, J.I., Kwon, M.S., Carp, R.I., Kim, Y.S. (2005). Effect of transition metals (Mn, Cu, Fe) and deoxycholic acid (DA) on the conversion of PrpC to PrpRes. *FASEB J.* **19**, 783- 785.

Kirby, L., Birkett, C.R., Rudyk, H., Gilbert, I.H., Hope, J. (2003). *In vitro* cell- free conversion of bacterial recombinant Prp to Prp^{Res} as a model for conversion. *J. Gen. Virol.* **84**, 1013- 1020.

Klatzo, I., Gajdusek, D.C., Zigas, V. (1959). Pathology of Kuru. *Lab. Invest.* **8**, 799- 847.

Kocisko, D.A., Come, J.H., Priola, S.A., Chesebro, B., Raymond, G.J., Lansbury, P.T., Caughey, B. (1994). Cell- free formation of protease- resistant prion protein. *Nature* **370**, 471- 474.

Kocisko, D.A., Priola, S.A., Raymond, G.J., Chesebro, B., Lansbury, P.T., Caughey, B. (1995). Species specificity in the cell- free conversion of prion protein to protease- resistant forms: A model for the scrapie species barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 3923- 3927.

Kretzschmar, H.A. (2001). BSE und die neue Variante der Creutzfeld- Jakob- Krankheit. *Deutsches Ärzteblatt* **98**, 2576- 2583.

Kroczek, R.A. und Siebert, E. (1990). Optimization of northern analysis by vacuum-blotting, RNA-transfer visualization, and ultraviolet fixation. *Anal Biochem.* **184**, 90-95.

Kuwahara, C., Takeuchi, A.M., Nishimura, T., Haraguchi, K., Kubosaki, A., Matsumoto, Y., Saeki, K., Matsumoto, Y., Yokoyama, T., Itohara, S., Onodera, T. (1999). Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature* **400**, 225- 226.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680- 685.

Landy, A., (1989). Dynamic, Structural, and Regulatory Aspects of Lambda Site-specific recombination. *Ann. Rev. Biochem.* **58**, 913- 949.

Lasmezas, C.I., Fournier, J.G., Nouvel, V., Boe, H., Marcé, D., Lamoury, F., Kopp, N., Hauw, J.J., Bruce, M., Dormont, D., Deslys, J.P. (2001). Adaptation of the bovine spongiform encephalopathy agent to primates and comparison with the Creutzfeldt- Jakob disease: Implications for human health. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 4142- 4147.

Lawson, V.A., Priola, S.A., Meade- White, K., Lawson, M., Chesebro, B. (2004). Flexible N-terminal Region of Prion Protein Influences Conformation of Protease-resistant Prion Protein Isoforms Associated with Cross-species Scrapie Infection *in Vivo* and *in Vitro*. *J. Biol. Chem.* **279**, 13689- 13695.

Lee, K.S., Magalhaes, A.C., Zanata, S.M., Brentani, R.R., Martins, V.R., Prado, M.A.M. (2001). Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion mutants in living cells. *J. Neurochem.* **79**, 79- 87.

Legname, G., Baskakov, I.V., Nguyen, H.O.B., Riesner, D., Cohen, F.E., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B. (2004). Synthetic Mammalian Prions. *Nature* **305**, 673- 676.

Legname, G., Nguyen, H.O.B., Baskakov, I.V., Cohen, F.E., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B. (2005). Strain-specified characteristics of mouse synthetic prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 2168- 2173.

Le Gouill, C., Dery, C.V. (1991). A rapid procedure for screening of recombinant plasmids. *Nucleic. Acid. Res.* **19**, 6655.

Liao, Y.J., Lebo, R.V., Clawson, G.A., Smuckler, E.A. (1986). Human prion protein cDNA: Molecular cloning, chromosomal mapping and biological implications. *Science* **233**, 735- 746.

Lorenz, H., Windl, O., Kretschmar, H.A. (2002). Cellular Phenotyping of Secretory and Nuclear Prion Proteins Associated with Inherited Prion Diseases. *J. Biol. Chem.* **277**, 8508- 8516.

Lucassen, R., Nishina, K., Supattapone, S. (2003). *In Vitro* Amplification of Protease-Resistant Prion Protein Requires Free Sulfhydryl Groups. *Biochemistry* **42**, 4127- 4135.

Mabbott, N.A. and MacPherson, G. (2006). Prions and their lethal journey to the brain. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 201- 211.

Malluci, G.R., Ratté, S., Asante, E.A., Linehan, J., Gowland, I., Jefferys, J.G.R., Collinge, J. (2002). Post- natal knockout of prion alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *EMBO J.* **21**, 202- 210.

Manuelidis, L., Yu, Z.X., Banquero, N., Mullins, B. (2007). Cells infected with scrapie and Creutzfeld- Jakob disease agents produce intracellular 25- nm virus- like particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 1965- 1979.

Marsh, R.F., Miller, J.M., Hanson, R.P. (1973). Transmissible Mink Encephalopathy: Studies on the Peripheral Lymphocyte. *Infect. Immun.* **7**, 352- 355.

Martins, V.R. (1999). A receptor for infectious and cellular prion protein. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **32**, 853- 859

Mella, H. (2000). Prozessierung und Konversion von Insertionsmutanten des Prionproteins in persistent Scrapie- infizierten neuronalen Zellen. *Der andere Verlag*, ISBN: 3-934366-88-0.

Meyer, R.K., McKinley, M.P., Bowman, K.A., Braunfeld, M.B., Barry, R.A., Prusiner, S.B. (1986). Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 2310- 2314.

Monnet, C., Marthiens, V., Enslin, H., Frobert, Y., Sobel, A., Mège, R.M. (2003). Heterogeneity and regulation of cellular prion protein glycoforms in neuronal cell lines. *Eur. J. Neurosci.* **18**, 542- 548.

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., 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. 41.

Moore, R.C., Mastrangelo, P., Bouzamondo, E., Heinrich, C., Legname, G., Prusiner, S.B., Hood, L., Westaway, D., DeArmond, S.J., Tremblay, P. (2001). Doppel- induced cerebellar degeneration in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 15288-15293.

Mulcahy, E.R. and Bessen, R.A. (2004). Strain- specific Kinetics of Prion Protein Formation *in Vivo* and *in Vitro*. *J. Biol. Chem.* **279**, 1643- 1649.

Negro, A., De Filippis, V., Skaper, S.D., James, P., Surgato, M.C. (1997). The complete mature bovine prion protein highly expressed in *Escherichia coli*: biochemical and structural studies. *FEBS lett.* **412**, 359- 364.

Norstrom, E.M. and Mastrianni, J.A. (2006). The Charge Structure of Helix 1 in the Prion Protein Regulates Conversion to Pathogenic PrP^{Sc}. *J. Virol.* **80**, 8521- 8529.

Oesch, B., Westaway, D., Wälchli, M., McKinley, M.P., Kent, S.B., Aebersold, R., Barry, R.A., Tempst, P., Teplow, D.G., Hood, L.E., Prusiner, S.B., Weissmann, C. (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* **40**, 735- 746.

O'Reilly, D.R., Miller, L.K., Luckow, V.A. (1992). Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual. *New York, N.Y.: W.H. Freeman and Company.*

Pan, K.M., Baldwin, M., Ngyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehdorn, I., Huang, Z., Fletterick, R.J., Cohen, F.E., Prusiner, S.B. (1993). Conversion of α - helices into β - sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 10962- 10966.

Papassotiropoulos, A., Wollmer, M.A., Aguzzi, A., Hock, C., Nitsch, R.M., de Quervain, D.J.F. (2005). The prion gene is associated with human long term memory. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 2241- 2246.

Pattison, I.H. (1972). Scrapie- a personal view. *J. Clin. Pathol. Suppl. (R. Coll. Pathol.)* **6**, 110- 114.

Parchi, P., Zou, W., Brown, P., Capellari, S., Ghetti, B., Kopp, N., Schulz- Schaeffer, W.J., Kretschmar, H.A., Head, M.W., Ironside, J.W., Gambetti, P., Chen, S.G. (2000). Genetic influence on structural variations of the abnormal prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 10168- 10172.

Prusiner, S.B. (1991). Molecular biology of prion diseases. *Science* **252**, 1515- 1522.

Prusiner, S.B. (1993). Genetic and infectious Prion diseases. *Arch. Neurol.* **50**, 1129- 1153.

Prusiner, S.B. (1998). Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 13363- 13383.

Ptashne, M. (1992). A Genetic Switch: Phage (Lambda) and Higher Organisms. *Cambridge, MA: Cell Press*.

Qin, K., Zhao, L., Tang, Y., Bhatta, S., Simard, J.M., Zhao, R.Y. (2006). DOPPEL- Induced Apoptosis And Counteraction By Cellular Prion Protein In Neuroblastoma And Astrocytes. *Neuroscience* **141**, 1375- 1388.

Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R., Wuthrich, K. (1996). NMR structure of the mouse prion protein domain PrP (121- 131). *Nature* **382**, 180- 182.

Riesner, D. (2004): Transmissible Spongiform Encephalopathies: The Prion Theory- Background and Basic Information. Aus: Prions. A Challenge for Science, Medicine and the Public Health System, H.F. Rabenau, J. Cinatl, H.W. Doerr, eds. (Basel, Switzerland: Karger), pp. 1- 13.

Saborio, G.P., Permanne, B., Soto, C. (2001). Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* **411**, 810- 813.

Sailer, A., Büeler, H., Fischer, M., Aguzzi, A., Weissmann, C. (1994). No propagation of prions in mice devoid of PrP. *Cell* **77**, 967- 968.

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., Noda, T. (1996). Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted *PrP* gene. *Nature* **380**, 528- 531.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning. A Laboratory Manual, second edition.

Scott, M.R., Will, R., Ironside, J., Nguyen, H.O.B., Tremblay, P., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B. (1999). Compelling transgenetic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 15137- 15142.

Soto, C. und Castilla, J (2004). The controversial protein- only hypothesis of prion propagation. *Nat. Med.* **10**, Suppl.: S63- S67.

Stahl, N., Borchelt, D.R., Hsiao, K., Prusiner, S.B. (1987). Scrapie Prion Protein Contains a Phosphatidyl Glycolipid. *Cell* **51**, 229- 240.

- Stueber, D., Matile, H., Garotta, G. (1990). System for high- level production in E.coli and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure-function analysis. *Immunological Methods* **4**, 121- 152.
- Supattapone, S., Muramoto, T., Legname, G., Mehlhorn, I., Cohen, F.E., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., Scott, M.R. (2001). Identification of Two Prion Protein Region That Modify Scrapie Incubation Time. *J. Virol.* **75**, 1408- 1413.
- Tanaka, M., Chien, P., Naber, N., Cooke, R., Weissman, J.S. (2004) Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences. *Nature* **428**, 323- 328.
- Tanaka, M., Collins, S.R., Toyama, B.H., Weissmann, J.S. (2006). The physical basis of how prion conformations determine strain phenotypes. *Nature* **442**, 585- 589.
- Tremblay, P., Ball, H.L., Kaneko, K., Groth, D., Hegde, R.S., Cohen, F.E., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., Safar, J.G. (2004). Mutant PrP^{Sc} Conformers Induced by a Synthetic Peptide and Several Prion Strains. *J. Virol.* **78**, 2088- 2099.
- Uptain, S.M. and Lindquist, S. (2002). Prions as protein- based genetic elements. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 703- 741.
- Weiss, S., Famulok, M., Edenhofer, F., Wang, Y.H., Jones, I.M., Groschup, M., Win- nacker, E.L. (1995). Overexpression of Active Syrian Golden Hamster Prion Protein PrP^C as a Glutathione- S- Transferase Fusion in Herterologous Systems. *J. Vi- rol.* **69**, 4776- 4783.
- Weissmann, C. (1991). A „unified theory“ of prion propagation. *Nature* **352**, 679- 683.
- Weissmann, C. und Aguzzi, A. (1999). Perspectives: neurobiology. PrP's double causes trouble. *Science* **286**, 914- 915.
- Wells, G.A.H., Scott, A.C., Johnson, C.T., Gunning, R.F., Hancock, R.D., Jeffrey, M., Dawson, M. and Bradley, R. (1987) A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.* **121**, 419- 420.
- Wells, G.A., Wilesmith, J.W., McGill, I.S. (1991). Bovine spongiform encephalopathy: a neuropathological perspective." *Brain Pathol.* **1**, 69- 78.
- Wickner, R.B. (1994). [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccaromyces cerevisiae*. *Science* **264**, 566- 569.

Wille, H., Michelitsch, M.D., Guénebaut, V., Supattapone, S., Serban, A., Cohen, F.E., Agard, D.A., Prusiner, S.B. (2002). Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallographie. *Proc. Natl. Acad. USA* **99**, 3563- 3568.

Wyatt, J.M., Pearson, G.R., Smerdon, T.N., Gruffydd- Jones, T.J., Wells, G.A., Wilesmith, J.W. (1991). Naturally occurring scrapie- like spongiform encephalopathy in five domestic cats. *Vet. Rec.* **129**, 233- 236.

Wopfner, F., Weidehofer, G., Schneider, R., von Brunn, A., Gilch, S., Schwarz, T.F., Werner, T., Schatzl, 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.

Yao, Y., Ren, J., Jones, I.M. (2003). Amino terminal interaction in the prion protein identified using fusion to green fluorescent protein. *J. Neurochem.* **87**, 1057- 1065.

Zhang, F.P., Zhang, J., Zhou, W., Zhang, B.Y., Hung, T., Dong, X.P. (2002). Expression of Prp^C as HIS- fusion form in a baculovirus system and conversion of expressed Prp-sen to Prp-res in a cell- free system. *Virus Res.* **87**, 145- 153.

Zeng, F., Watt, N.T., Walmsley, A.R., Hooper, N.M. (2003). Tethering the N- terminus of the prion protein compromises the cellular response to oxidative stress. *J. Neurochem.* **84**, 480- 490.

Danksagung

Ich möchte allen ganz herzlich danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Vor allen möchte ich Prof. Dr. Eberhard Pfaff für die Bereitstellung des Themas, den Arbeitsplatz, die Betreuung und für seine vielen Tipps danken.

Prof. Dr. Alfred Nordheim danke ich für die externe Betreuung und sein Interesse an dieser Arbeit.

Den Doktoren Daniel Wienhold und Heiner Voigt sage ich ein herzliches Dankeschön für die Betreuung im Laboralltag. Dabei seien die Vorarbeiten und die vielen Tipps bei der Vorgehensweise, die Daniel Wienhold für mich geleistet hat, sowie die unermüdliche Diskussionsbereitschaft und die ungezählten Hilfen von Heiner Voigt jeweils besonders erwähnt.

Ursel Csacsko danke ich für die Pflege der Insektenzellen insbesondere und für die vielen kleinen Unterstützungen bei der Arbeit.

Bei den Diplomanden Cordula Fuchs und Christian Arzt bedanke ich mich für die saubere Arbeit bei der Erstellung der Baculo- Fusionsproteine und für die klasse Parties, die wir miteinander gefeiert haben.

Ich bedanke mich bei Benjamin Petsch für die vielen konstruktiven Gespräche über Prionproteine, seine vielen Hilfestellungen und für den Super- Antikörper.

Bei Dr. Birke Tews und Christine Luttermann bedanke ich mich für die Einführung in die Autoradiographie und ihre Bereitschaft, mir zuzuhören.

Explizit möchte ich dem ganzen Labor für die tolle Arbeitsatmosphäre und die lustigen Zeiten im Kaffeeraum danken.

Auch ein herzliches Dankeschön an die RaucherInnen des Hauses.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des FLI für den reibungslosen Ablauf der alltäglichen Dinge, insbesondere bei Herrn Bauer, der all meine verwaltungstechnischen Anliegen souverän gehandhabt hat, bei den Leuten der Spülküche, den Computeradministratoren Herrn Hohnsbeen und Herrn Ibal und, bei Herrn Kramer für Hilfe bei der Bilderstellung und -bearbeitung.

Zum Schluß danke ich meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung außerhalb des FLI.

Lebenslauf

Name: Anja Baumgartner

Geburtsdatum: 24.01.1977

Geburtsort: Freiburg i. Br.

Eltern: Barbara Charlotte Baumgartner, geb. Tamm
Herwig Ferdinand Baumgartner

Geschwister: Friederike Marie Sophie Baumgartner

Familienstand: ledig

1983 – 1987: Grundschule Hegnach

1987 – 1996: Staufer- Gymnasium Waiblingen

Juni 1996: Abitur

Oktober 1996: Beginn des Biologie- Studiums an der Eberhard Karls
Universität in Tübingen

05.08.1999: Vordiplom

2001: Diplomprüfungen in den Fächern Genetik, Mikrobiologie und
Biochemie

2002: Diplomarbeit „Cis- regulatorische Bereiche des Syntaxin- Gens
KNOLLE von *Arabidopsis thaliana*“ unter Anleitung von Prof. Dr.
Gerd Jürgens am Lehrstuhl für Entwicklungsgenetik in Tübingen

12.09.02: Diplom

Dezember 2002: Beginn der Promotion am Friedrich – Loeffler – Institut
Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit in Tübingen unter
der Leitung von Prof. Dr. Eberhard Pfaff.
Thema: „Herstellung und Untersuchung von Prion- Reporter-
Fusionsproteinen“.