

3. Polyglutaminabhängige Induktion von Hefeprionen

3.1. Ergebnisse

Prionenerkrankungen gehören ebenso wie Chorea Huntington zur Familie der neurodegenerativen Krankheiten. Sie werden durch ein einziges falsch gefaltetes Protein, dem sogenannten Prion Protein (PrP), hervorgerufen. Der Mechanismus, der zur Falschfaltung von PrP in die Prionenform führt, ist bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Viele Eigenschaften von Prionen sind anhand von Untersuchungen mit Hefeprionen entdeckt worden. Proteine, die in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* Prionen bilden können, wie z.B. Sup35, Ure2 oder Rnq1, existieren in mindestens zwei stabilen, ineinander überführbaren Konformationen. Entweder sind sie in ihrem normal gefalteten Zustand und damit löslich oder in der aggregierten Prionenform und damit unlöslich. Für die spontane Entstehung von Hefeprionen ist die Überexpression ihrer löslichen zellulären Äquivalente und ein normale Konzentration des Chaperons Hsp104 erforderlich (Wickner et al., 2004). Ferner können einige Hefeprionen nur dann entstehen, wenn bereits andere Prionen in der Zellen vorhanden sind. So wird z.B. der Prionenphänotyp [*PSI*⁺], der durch Aggregation des Proteins Sup35 entsteht, nur in Zellen induziert, die den Prionenphänotyp [*PIN*⁺], der durch aggregiertes Rnq1-Protein entstehen kann, aufweisen (Derkatch et al., 2001; Derkatch et al., 1997). Bis heute ist nicht bekannt, warum manche Prionen nur in Gegenwart von bereits existierenden Prionen *de novo* entstehen während andere anscheinend auch in einer Prionen-freien Umgebung spontan auftreten können. Ein Grund für dieses Verhalten ist möglicherweise die unterschiedliche Fähigkeit der löslichen zellulären Prionenäquivalente, Aggregate zu bilden. In dieser Arbeit sollte der Mechanismus der zur *de novo* Entstehung von Prionen führt, untersucht werden. Die folgenden Ergebnisse zeigen, dass Prionen aufgrund der Stimulierung der Aggregation ihrer löslichen Proteinäquivalente durch Polyglutaminsequenzen unabhängig von anderen Prionen erzeugt werden können.

3.1.1. Charakterisierung der Hefestämme GT17 und OT56

In der Literatur sind verschiedene Hefestämme beschrieben, die in der Lage sind, unterschiedlich starke $[PSI^+]$ -Phänotypen für Hefeprionen auszubilden (Derkatch et al., 1997). In dieser Arbeit wurde mit Derivaten des Hefestammes 74-D694 gearbeitet (Chernoff et al., 1995). Diese Stämme tragen das Stopcodon UGA im *ADE1*-Gen (*ade1-14*), wodurch ein Sup35-abhängiger Wachstumsphänotyp erzeugt wird. So wachsen $[psi^-]$ -Zellen nur auf adeninhaltigem Medium, da es zu einer korrekten Termination am Stopcodon in *ade1-14* aufgrund von löslichem Sup35 kommt. In $[PSI^+]$ -Zellen hingegen ist Sup35 unlöslich und nicht funktionell. Infolgedessen wird das Stopcodon in *ade1-14* überlesen und somit Adenin synthetisiert. Entsprechend können $[PSI^+]$ -Zellen auf adeninfreiem Medium wachsen. Auch auf Vollmedium können $[psi^-]$ -Zellen leicht von $[PSI^+]$ -Zellen unterschieden werden, denn erstere sind aufgrund der Anhäufung eines Intermediärproduktes des Adenin-Stoffwechsels rot gefärbt, während die Kolonien von $[PSI^+]$ -Zellen eine weiße Farbe besitzen.

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich der $[psi^-][pin^-]$ -Stamm GT17 sowie der $[PSI^+][PIN^+]$ -Stamm OT56 verwendet. Auf Selektivmedium ohne Adenin (SD-Ade) und auf YPD zeigten beide Stämme die erwarteten Phänotypen (Abbildung 33). Mit Filtrationsexperimenten wurden GT17- und OT56-Zellen zusätzlich darauf hin untersucht, ob sie aggregiertes Sup35-Protein enthalten. Erwartungsgemäß konnten dabei nur im $[PSI^+][PIN^+]$ -Stamm SDS-stabile Sup35-Aggregate detektiert werden (Abbildung 33).

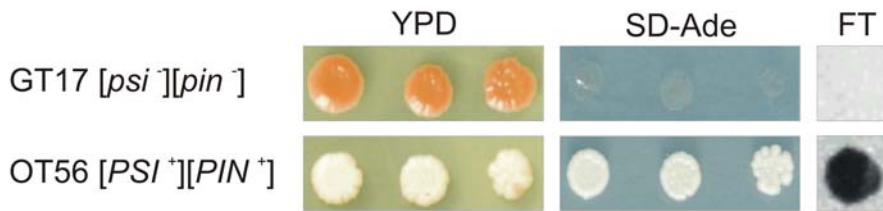


Abbildung 33: Phänotypische Überprüfung der Hefestämme GT17 und OT56. Vorkulturen von je 3 Einzelkolonien der beiden Stämme wurden auf YPD- und SD-Ade Medium gestempelt und für 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Die YPD-Platten wurden anschließend für 4 Tage bei 4 °C aufbewahrt, um die adeninabhängige Färbung der Kolonien zu induzieren. Zur Detektion von SDS-stabilen Sup35-Aggregaten wurden Filtertests (FT) mit Lysaten von GT17- und OT56-Zellen durchgeführt. Dafür wurden in SDS abgekochte Lysate durch eine Zellulose-Acetat Membran gesaugt und das aggregierte Sup35 wurde mit einem anti-Sup Antikörper detektiert.

Durch Zentrifugation können lösliche und unlösliche Proteine effektiv voneinander getrennt werden. Nach Zentrifugation von GT17- und OT56-Zellysaten wurden die Pellet- und Überstandsfractionen mittels SDS-PAGE und Westernblotting analysiert (Abbildung 34). Wie erwartet wurden sowohl Sup35 also auch Rnq1 in der löslichen Überstandsfraction von GT17-Zellen detektiert, während sich bei OT56 beide Proteine in der Pelletfraction ansammelten. Diese Vorversuche bestätigen den vorausgesagten Phänotyp der verwendeten Stämme.

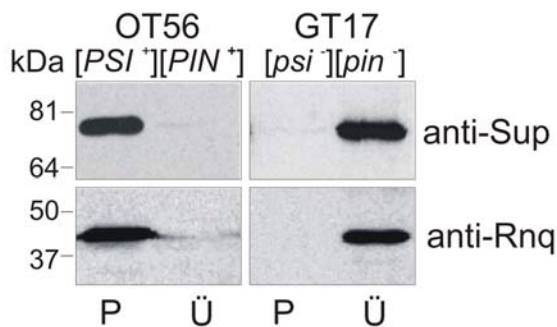








Abbildung 34: Bestimmung der Löslichkeit von Sup35 und Rnq1 in GT17- oder OT56-Zellen. Lysate von GT17- und OT56-Zellen wurden bei 50 000 g zentrifugiert und die Fraktionen von Pellet (P) und Überstand (Ü) mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde Sup35 mit dem anti-Sup und Rnq1 mit dem anti-Rnq Antikörper immunmarkiert. In Übereinstimmung mit den in der Literatur angegebenen Molekularmassen wurden Sup35 bei ca. 75 kDa und Rnq1 bei ca. 45 kDa detektiert.

3.1.2. Induktion von $[PSI^+]$ durch Sup-Htt Fusionsproteine

Um Einblicke in den Mechanismus der Entstehung von $[PSI^+]$ zu erhalten, wurde zunächst untersucht, ob $[PSI^+]$ auch unabhängig von $[PIN^+]$ induziert werden kann. Da das Prion $[PSI^+]$ auf Unlöslichkeit von Sup35 zurückzuführen ist, sollte die Aggregation des Proteins in $[psi^-][pin^-]$ -Zellen gezielt stimuliert werden. Es wurde gezeigt, dass in Hefezellen Huntingtin (Htt)-Exon1 Fragmente mit 47 Glutaminen teilweise und solche mit 72 Glutaminen vollständig aggregieren (Krobitsch and Lindquist, 2000). Um die Aggregationsfähigkeit von Sup35 zu erhöhen, wurde es deshalb mit Htt-Exon1 Fragmenten mit unterschiedlich langen Polyglutaminketten fusioniert. Aufgrund der Polyglutaminanhänge sollten die Sup-Htt Fusionsproteine somit in der Lage sein, von sich aus zu aggregieren. Da in $[psi^-][pin^-]$ -Zellen lösliches endogenes Sup35 vorhanden ist, müssen die Sup-Htt Aggregate letztlich auch dessen Aggregation initiieren, um den $[PSI^+]$ -Phänotyp zu induzieren. Im Einzelnen wurden Htt-Exon1 Fragmente mit 19, 54 und 92 Glutaminen mit dem C-Terminus von Sup35 fusioniert. Als Kontrollen dienten die Proteine Sup35 und Htt-Exon1 mit 52 oder 83 Glutaminen (Tabelle 7). Alle Proteine wurden unter der Kontrolle eines mit Kupfer induzierbaren Promoters im Hefevektor pYex2T exprimiert. pYex2T ist ein „Multicopy“-Plasmid (2μ) mit *URA3* als selektierbarem Marker.

Tabelle 7: Struktur der Sup-Htt Proteine

Plasmid	Protein	Schematische Darstellung
pYex2T		
pYex2T-SUP35	Sup35	
pYex2T-SUP-CAG19	Sup-Q19	
pYex2T-SUP-CAG54	Sup-Q54	
pYex2T-SUP-CAG92	Sup-Q92	
pYex2T-CAG52	Q52	
pYex2T-CAG83	Q83	

PrD: Prion Domäne von Sup35 (As 1-123); M: Mittlere Domäne von Sup35(As 124-253); C: C-terminale Domäne von Sup35 (As 254-685); Rotes Segment: Htt Exon1-Fragment (As 1-44) mit 19 (I), 52 (II) oder 83 Glutaminen (III).

Nach Transformation der GT17-Zellen ($[psi^-][pin^-]$) mit den in Tabelle 7 aufgelisteten Plasmiden wurden die entsprechenden Klone in flüssigem Medium angezogen. Um die Suppression des Stopcodons in *ade1-14* zu überprüfen, wurden die Kulturen in verschiedenen Verdünnungen auf SD+Ade, SD-Ade und YPD-Medium gestempelt. Nach 9-tägiger Inkubation bei 30 °C wuchsen Zellen, die Sup-Q54 oder Sup-Q92 exprimierten, auf SD-Ade Medium und bildeten weiß gefärbte Kolonien auf YPD-Platten. Im Gegensatz dazu zeigten Zellen, die Sup35, Sup-Q19 oder die Htt-Exon1 Fragmente Q52 und Q89 exprimierten, keinerlei Wachstum auf SD-Ade Medium und bildeten rote Kolonien auf YPD-Platten (Abbildung 35). Um zu prüfen, ob die Induktion des $[PSI^+]$ -Phänotyps mit der Bildung von Sup-Htt Aggregaten einhergeht, wurden die Zelllysate mittels Filtertest analysiert. Dabei wurden in Zellen mit Sup-Q54 oder Sup-Q92 SDS-stabile Sup-Htt Aggregate detektiert (Abbildung 35). In Zellen, die Q52 exprimierten, traten keine SDS-stabilen Aggregate auf, während in Q83 exprimierenden Zellen Htt-Aggregate, nicht aber Sup35-Aggregate, nachweisbar waren. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Bildung von Sup-Htt Aggregaten entscheidend für die spontane Entstehung von $[PSI^+]$ in $[psi^-][pin^-]$ -Zellen ist. Die Sup-Htt Aggregate induzieren vermutlich die Umlagerung von endogenem Sup35 vom normalerweise löslichen in den unlöslichen Zustand und damit die Entstehung von $[PSI^+]$. Um die spontane Entstehung von $[PSI^+]$ zu quantifizieren, wurde eine definierte Anzahl von Zellen auf SD-Ade Medium plattiert und nach Inkubation wurden die Anzahl von Ade⁺-Kolonien gezählt. Um echte Konvertanten von Ade⁺ Revertanten zu unterscheiden, wurde zunächst die Rate ermittelt, mit der GT17-Zellen, die den leeren Vektor pYex2T enthielten, Ade⁺-Kolonien bildeten. Nur eine von 100 000 plattierten Zellen wuchs auf SD-Ade Medium, was einer Reversionsrate von 1×10^{-5} entspricht. GT17-Zellen, die Sup-Q54 oder Sup-Q92 exprimierten, bildeten 160 bzw. 590 mal mehr Kolonien auf SD-Ade Medium als GT17-Zellen mit pYex2T, also konvertierten insgesamt 160 bzw. 590 von 100 000 plattierten Zellen zu $[PSI^+]$ (Abbildung 35).

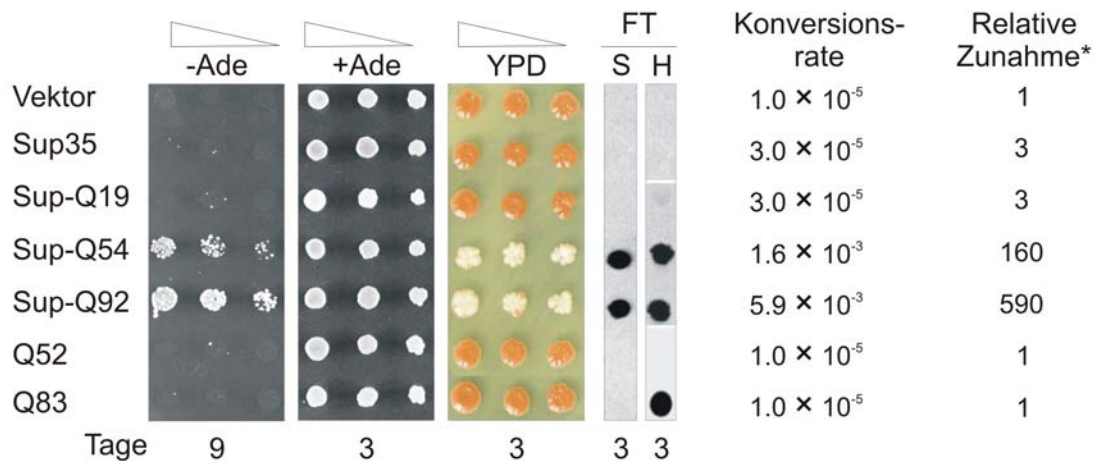






Abbildung 35: Induktion von $[PSI^+]$ in $[psi^-][pin^-]$ GT17-Zellen durch Expression von Sup-Htt Fusionsproteinen. Zellen, die die aufgelisteten Proteine exprimierten, wurden in Verdünnungsreihen auf SD-Ade, SD+Ade und YPD-Platten gestempelt und für die angegebene Zeit bei 30°C inkubiert. Für den Filtertest (FT) wurden die Zellen für 3 Tage in flüssigem SD+Ade Medium angezogen. Nach der Filtration wurden Sup35 mit dem anti-Sup (S) und Htt mit dem anti-Htt (H) Antikörper detektiert. Die Raten, mit denen sich Kolonien auf SD-Ade Medium bildeten, wurden wie auf Seite 158 beschrieben in 5 unabhängigen Experimenten ermittelt. Die Reversionsrate für GT17-Zellen mit dem leeren Vektor pYex2T lag bei 1×10^{-5} . *Relative Zunahme der gebildeten Ade⁺-Kolonien bezogen auf GT17-Zellen mit dem Kontrollvektor pYex2T.

3.1.3. Induktion von $[PSI^+]$ durch PrD-Htt Fusionsproteine

Für die Entstehung von $[PSI^+]$ ist die N-terminale Domäne von Sup35, die sogenannte Prionendomäne (PrD), erforderlich. Um zu untersuchen, ob Fusionsproteine bestehend aus der PrD und Htt-Exon1 Fragmenten mit aggregationsfähigen Polyglutaminsequenzen ebenso wie die Sup-Htt Fusionsproteine den Prionenphänotyp $[PSI^+]$ induzieren können, wurden die in Tabelle 8 aufgeführten Plasmide hergestellt.

Tabelle 8: Struktur der PrD-Htt Proteine

Plasmid	Protein	Schematische Darstellung
pYex2T-PrD	PrD	
pYex2T-PrD-CAG19	PrD-Q19	
pYex2T-PrD-CAG54	PrD-Q54	
pYex2T-PrD-CAG92	PrD-Q92	

PrD: Prion Domäne von Sup35 (As 1-123); Rotes Segment: Htt-Exon1 Fragment (As 1-44) mit 19 (I), 54 (II) und 92 (III) Glutaminen.

Nach Transformation der Expressionsplasmide in GT17-Zellen wurden die resultierenden Klone in flüssigem Medium angezogen und die Kulturen in Verdünnungsreihen auf SD-Ade, SD+Ade und YPD-Platten gestempelt. Zellen, die nur die PrD exprimierten, wuchsen nicht auf SD-Ade Medium und bildeten rote Kolonien auf YPD-Medium, wohingegen Zellen, die PrD-Q54 oder PrD-Q92 synthetisierten, auf SD-Ade Platten wuchsen und auf YPD-Platten eine weiße Koloniefarbe zeigten. Bereits nach 5-tägiger Inkubation wurden Ade⁺-Kolonien von Zellen mit PrD-Q54 oder PrD-Q92 gebildet. Somit wurde der $[PSI^+]$ -Phänotyp deutlich früher in Zellen mit PrD-Htt Fusionsproteinen als in Zellen mit Sup-Htt Fusionsproteinen hervorgerufen (Abbildung 35 und 36). Mit dem Filtertest wurden nach 2-tägigem Wachstum SDS-stabile Aggregate in den Lysaten von Zellen mit PrD-Q54 oder PrD-Q92 detektiert, während diese in entsprechenden Sup-Q54 oder Sup-Q92 produzierenden Zellen erst nach 3 Tagen nachgewiesen werden konnten. Die frühere Bildung von $[PSI^+]$ -Kolonien korreliert also mit der schnelleren Aggregation der PrD-Htt Fusionsproteine. Die Konversionsrate für die PrD-Htt Fusionsproteine mit 54 oder 92 Glutaminen ist deutlich höher als die für die vergleichbaren Sup-Htt Fusionsproteine. Zellen mit PrD-Q54 oder PrD-Q92 bildeten 3 000 bzw. 5 300 mal mehr Ade⁺-Kolonien als Zellen mit dem pYex2T Vektor. Offensichtlich wird die Aggregation von endogenem Sup35 effizienter von aggregierenden PrD-Htt als von Sup-Htt Fusionsproteinen initiiert. Im Gegensatz zu GT17-Zellen mit Sup-Q19 bildeten Zellen mit PrD-Q19 auch einige Ade⁺-Kolonien und wiesen eine deutlich höhere Konversionsrate als die Kontrollzellen mit pYex2T auf. Mit dem Filtertest konnten in Lysaten von Zellen mit PrD-Q19

keine SDS-stabilen Sup35-Aggregate nachgewiesen werden. Daraufhin wurden die Zellen mit PrD-Q19 auf weniger stabile Aggregate untersucht. Die Zellen wurden ohne SDS und Hitzedenaturierung aufgeschlossen und die Lysate mit dem Filtertest analysiert. Dabei zeigte sich, dass Aggregate in Zellen mit PrD-Q19 gebildet werden (Daten nicht gezeigt). Es ist somit anzunehmen, dass der $[PSI^+]$ -Phänotyp auch durch weniger stabile Aggregate induziert werden kann. Jedoch konvertierten Zellen mit PrD-Q54 oder PrD-Q92, die SDS-stabile Aggregate enthalten, mit einer über 30-fach höheren Frequenz zu $[PSI^+]$ als Zellen mit PrD-Q19.

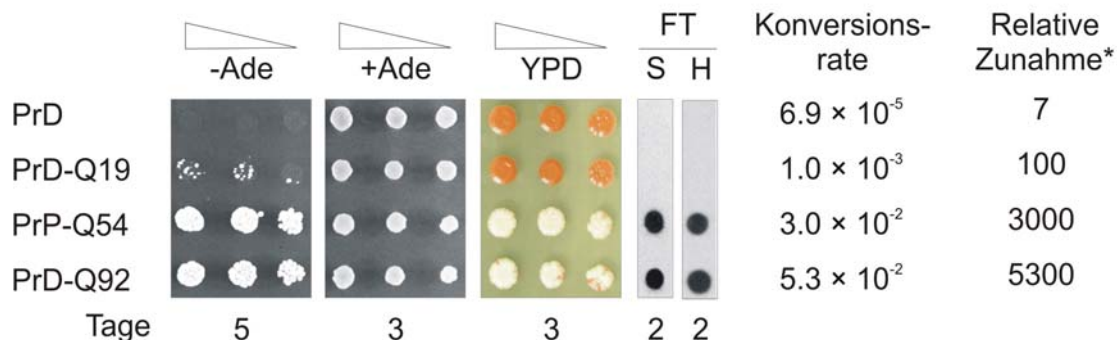


Abbildung 36: Induktion von $[PSI^+]$ in $[psi^-][pin^-]$ GT17-Zellen durch Expression von PrD-Htt Fusionsproteinen. GT17-Zellen, die die aufgelisteten Proteine exprimierten, wurden in Verdünnungsreihen auf SD-Ade, SD+Ade und YPD-Platten gestempelt und für die angegebene Zeit bei 30° C inkubiert. Für den Filtertest (FT) wurden die jeweiligen Zellen für 2 Tage in flüssigem Medium angezogen. Nach der Filtration wurde Sup35 mit anti-Sup (S) und anti-Htt (H) Antikörpern detektiert. Die Konversionsraten wurden wie auf Seite 158 beschrieben in 5 unabhängigen Experimenten ermittelt. *Relative Zunahme der gebildeten Ade⁺-Kolonien bezogen auf GT17-Zellen mit dem Kontrollvektor pYex2T.

3.1.4. Untersuchung der Aggregation von Sup-Htt und PrD-Htt Fusionsproteinen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Ergebnisse der Filtertests demonstrierten, dass Sup- oder PrD-Htt Fusionsproteine SDS-stabile Aggregate bilden. Dies wurde auch mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Dafür wurden von Zellen, die Sup-Q19, Sup-Q54, Sup-Q92, PrD-Q19, PrD-Q54 oder PrD-Q92 synthetisieren, Präparate hergestellt, bei denen die Fusionsproteine rot und die Zellkerne blau markiert wurden. Die Analyse dieser Präparate zeigte, dass Sup-Q19 diffus in der Zelle verteilt vorliegt, während in

Gegenwart von Sup-Q54 oder Sup-Q92 klar abgegrenzte 0,5-1 μm große cytoplasmatische Einschlusskörper gebildet werden (Abbildung 37). Ähnliche Ergebnisse wurden mit den PrD-Htt Fusionsproteinen erzielt. Neben einer diffusen cytoplasmatischen Verteilung trat eine leichte Fokussierung von PrD-Q19 auf. Die Expression von PrD-Q54 oder PrD-Q92 führte zur Bildung von mehreren cytoplasmatischen Einschlusskörpern. Die Immunfluoreszenz-Untersuchungen bestätigen die Ergebnisse des Filtertests und zeigen, dass Sup-Htt bzw. PrD-Htt Proteine mit langen Polyglutaminsequenzen in GT17-Zellen aggregieren.

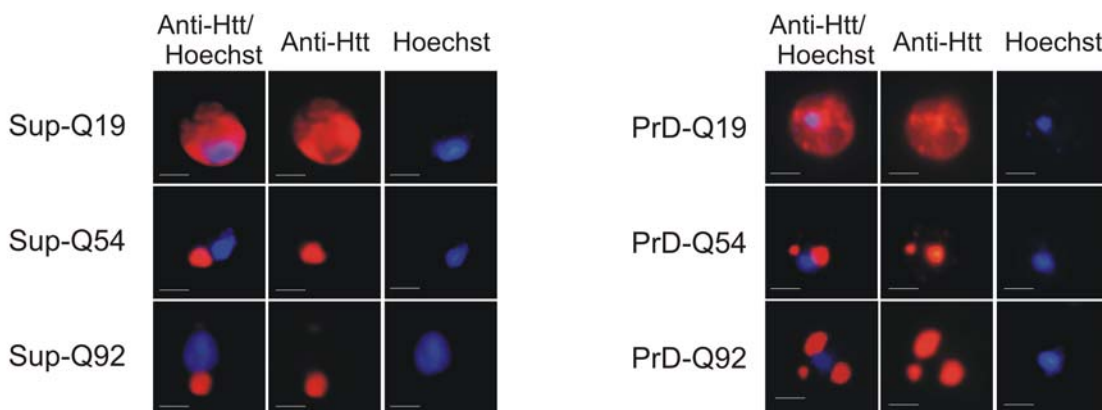


Abbildung 37: Untersuchung der Aggregation von Sup-Htt und PrD-Htt Fusionsproteinen mit Hilfe von Immunfluoreszenzmikroskopie. Die angegebenen Proteine wurden in GT17-Zellen exprimiert. Zellen der mittleren Wachstumsphase wurden permeabilisiert und mit Paraformaldehyd fixiert. Die Fusionsproteine wurden mit dem Htt-Antikörper CAG53b immunmarkiert, der mit einem sekundären Cy3-konjugierten Antikörper (rot) detektiert wurde. Die Zellkerne wurden mit Hoechst (blau) angefärbt. Balken: 1 μm .

3.1.5. Elektronenmikroskopische Untersuchung von Sup-Q54 Aggregaten

Die Einschlusskörper, die bei Expression von Sup-Q54 in GT17-Zellen entstehen, wurden anhand von elektronenmikroskopischen Untersuchungen näher charakterisiert. Das Fusionsprotein wurde mit dem Antikörper CAG53b, der mit 10 nm großen Goldpartikeln markiert wurde, detektiert. Der von Sup-Q54 gebildete Einschlusskörper erscheint im Elektronenmikroskop als nicht klar abgegrenzte amorphe Aggregate (Abbildung 38). Die Goldpartikel ordnen sich wie auf einer Perlenschnur aufgereiht an. Diese deutet auf eine fibrilläre Struktur des aggregierten Proteins hin.

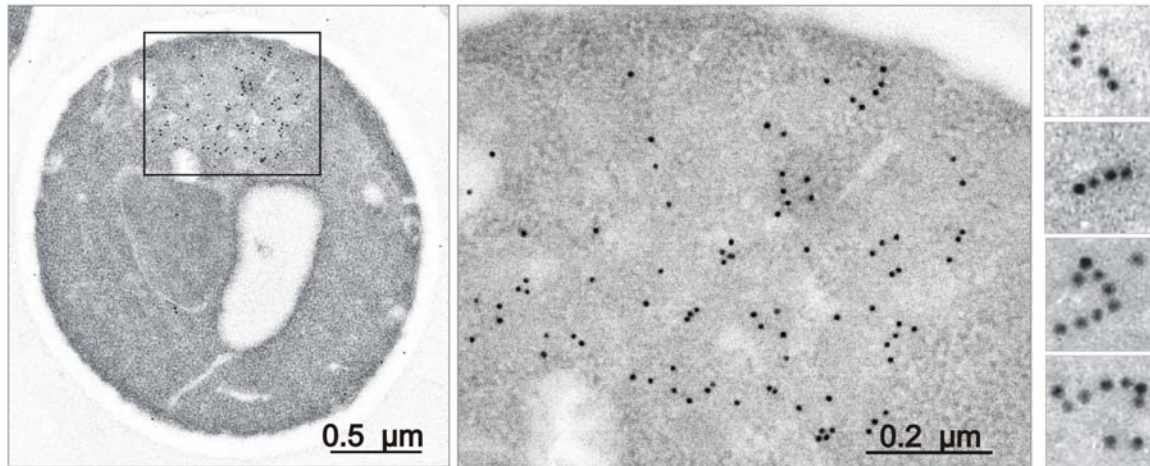


Abbildung 38: Untersuchung von Sup-Q54 Aggregaten mittels Elektronenmikroskopie. GT17-Zellen, die Sup-Q54 exprimierten, wurden bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,5 angezogen und dann geerntet. Die Zellen wurden mit einer Mischung aus Glutaraldehyd und Formaldehyd fixiert und dann in LR White eingebettet. Sup-Q54 wurde mit dem Htt-Antikörper CAG53b immunmarkiert, der von einem mit 10 nm großen Goldpartikeln konjugierten sekundären Antikörper detektiert wurde. Das linke Bild gibt eine Übersicht über die Lage des Einschlusskörpers in der Zelle und das mittlere zeigt eine vergrößerte Aufnahme der Aggregate in dieser Struktur. Die rechts angeordneten Bilder sind Vergrößerungen von Aufnahmen verschiedener Sup-Q54 Aggregate aus mehreren GT17-Zellen. In diesen Bildern liegen die Goldpartikel perlschnurartig aneinandergereiht vor, was auf eine fibrilläre Struktur der Sup-Q54 Aggregate hinweist.

3.1.6. Löslichkeit von endogenem Sup35 in Gegenwart von aggregiertem Sup-Q54

Der [PSI^+]-Phänotyp entsteht, wenn kein oder nur sehr wenig lösliches Sup35 in der Zelle vorhanden ist. Demnach muss das endogene Sup35-Protein in Ade^+ -Zellen, die durch Expression von aggregationsfähigen Sup-Htt Fusionsproteinen aus GT17-Zellen hervorgehen, vom löslichen in den unlöslichen Zustand überführt worden sein. Um dies zu kontrollieren, wurde die Löslichkeit von endogenem Sup35 durch Zentrifugationsexperimente bestimmt. Zu diesem Zweck wurden Lysate von konvertierten GT17-Zellen mit Sup-Q54 verwendet. Nach Auftrennung in die lösliche und unlösliche Fraktion durch Zentrifugation wurden die Proteine des Pellets und Überstands mittels SDS-PAGE und Westernblotting analysiert. Sowohl Sup-Q54 als auch endogenes Sup35-Protein wurden in der Pellet-Fraktion als 95 bzw. 75 kDa Bande detektiert (Abbildung 39). Zusätzlich wurden auch SDS-resistente, hochmolekulare

Aggregate, die nicht ins Trenngel einliefen, mit dem anti-Htt und dem anti-Sup Antikörper nachgewiesen. Endogenes Sup35 wird also bei Überexpression von Sup-Q54 in GT17-Zellen vom löslichen in den unlöslichen Zustand überführt, womit diese Zellen zu $[PSI^+]$ konvertieren. Um zu prüfen, ob auch der $[PIN^+]$ -Phänotyp in diesen Zellen induziert wird, wurde die Löslichkeit von Rnq1 bestimmt. Dabei wurde Rnq1 ausschließlich in der löslichen Fraktion von Sup-Q54 exprimierenden GT17-Zellen detektiert (Abbildung 39). Somit wird nur endogenes Sup35, nicht aber endogenes Rnq1 bei Überexpression von Sup-Htt Fusionsproteinen konvertiert. Der Phänotyp dieser Konvertanten ist demnach $[PSI^+][pin^-]$.

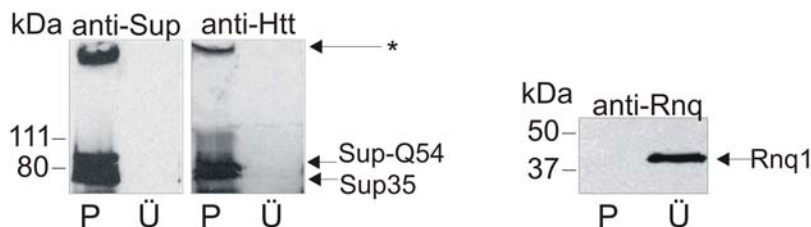


Abbildung 39: Bestimmung der Löslichkeit von endogenem Sup35 und Rnq1 in GT17-Zellen, die durch Expression von Sup-Q54 zu $[PSI^+]$ konvertiert wurden. Nach Zentrifugation der Zellysate bei 50 000 g für 30 min, wurden je 25 µg Gesamtprotein vom Pellet (P) und vom Überstand (Ü) mittels SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Endogenes Sup35 und Sup-Q54 wurden mit anti-Sup Antikörper, Sup-Q54 mit dem Htt-Antikörper CAG53b und Rnq1 mit anti-Rnq Antikörper detektiert. *Hochmolekulare Aggregate

3.1.7. Interaktion von Sup-Q54 mit endogenem Sup35

Bei Überexpression von Sup-Q54 in GT17-Zellen wird endogenes Sup35 möglicherweise aufgrund einer direkten Interaktion mit aggregierendem Sup-Q54 in den unlöslichen Zustand überführt. Diese Hypothese wurde mit Hilfe von Immunpräzipitationsexperimenten überprüft. Dazu wurde zunächst der $[psi^-][pin^-]$ Stamm GT17-SM, in dem chromosomales *SUP35* C-terminal mit einem Myc-Epitop fusioniert ist, hergestellt, um eindeutig zwischen endogenem Sup35 und Sup-Q54 unterscheiden zu können. Der GT17-SM Stamm wurde dann mit pYex2T-SUP-CAG54 und als Kontrolle mit pYex2T transformiert. Die Transformanten, die Sup-Q54 exprimieren, wurden dann auf SD-Ade Medium kultiviert, um $[PSI^+]$ Zellen zu selektieren. Lysate von nicht

konvertierten Kontrollzellen und konvertierten Zellen mit Sup-Q54 wurden anschließend mit Hilfe von Filtertests analysiert. In den Kontrollzellen wurden keine Aggregate nachgewiesen, während in GT17-SM Zellen mit Sup-Q54 sowohl mit dem anti-Myc als auch mit dem anti-Htt-Antikörper Aggregate detektiert wurden (Abbildung 40 A). Dies deutet darauf hin, dass in diesen konvertierten Zellen sowohl endogenes Sup35-Myc als auch Sup-Q54 SDS-stabile Aggregate bildet. Die Fusionsproteine Sup35-Myc und Sup-Q54 von konvertierten GT17-SM Zellen konnten auch mittels Zentrifugation in der Pellet-Fraktion nachgewiesen werden, was die Ergebnisse der Filtertests unterstützt (Abbildung 40 B).

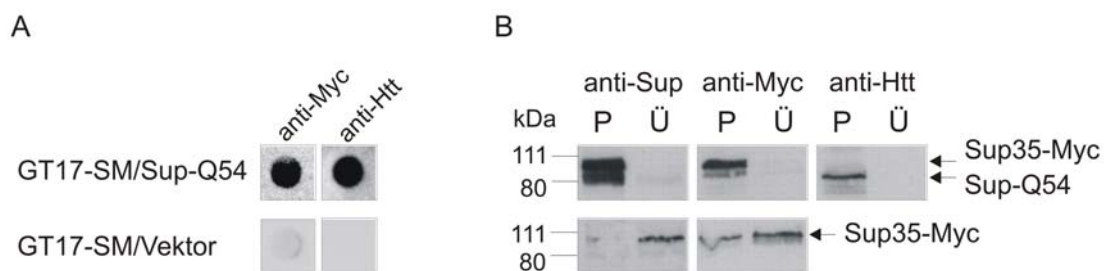


Abbildung 40: Charakterisierung des Hefestammes GT17-SM. Lysate von GT17-SM Zellen mit pYex2T (Vektor) und von konvertierten GT17-SM Zellen mit Sup-Q54 wurden mit dem Filtertest auf SDS-stabile Aggregate (A) und durch Zentrifugation auf die Löslichkeit der Fusionsproteine (B) untersucht. SDS-resistente Aggregate wurden mit dem anti-Myc oder dem anti-Htt Antikörper detektiert. Mit den Zentrifugationsexperimenten wurden nicht konvertierte GT17-SM Zellen (Vektor) und konvertierte GT17-SM Zellen mit Sup-Q54 untersucht. Die Proteine Sup35-Myc und Sup-Q54 wurden mit den angegebenen Antikörpern detektiert.

Für die Immunpräzipitation wurden GT17-SM Zellen mit Vektor und konvertierte GT17-SM Zellen mit Sup-Q54 bis zu einer mittleren Wachstumsphase angezogen, geerntet und lysiert. Beide Zellextrakte wurden mit anti-Myc Antikörper versetzt und inkubiert. Als Kontrolle wurde auch Zelllysat mit Sup-Q54 ohne Zugabe eines Antikörpers mitgeführt. Die Proteinkomplexe wurden über den anti-Myc Antikörper, der an magnetische Beads über einen sekundären Antikörper gebunden wurde, präzipitiert. Nach mehreren Waschzyklen wurden die Präzipitate bei 95 °C von den Beads eluiert und anschließend durch SDS-PAGE und Westernblotting analysiert. Mit dem anti-Sup Antikörper wurde in den beiden mit anti-Myc Antikörper behandelten Extrakten die 90 kDa große Sup-Myc Bande nachgewiesen. Aus dem Zelllysat von

konvertierten GT17-SM Zellen wurde zudem Sup-Q54 mit dem anti-Myc Antikörper immunpräzipitiert (Abbildung 41). Dieses Ergebnis zeigt, dass in Hefezellen Sup-Q54 und endogenes Sup35-Myc miteinander interagieren.

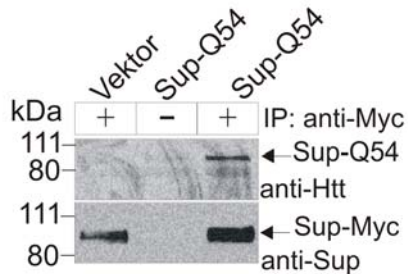








Abbildung 41: Immunpräzipitation von Sup-Q54 über endogenes Sup35-Myc. GT17-SM Zellen mit pYex2T (Vektor) und konvertierte GT17-SM Zellen mit Sup-Q54 wurden bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,5 angezogen, geerntet und lysiert. Beide Zelllysate wurden dann mit dem anti-Myc Antikörper versetzt und für 2 h bei 4 °C inkubiert. Als Kontrolle diente Lysat mit Sup-Q54 ohne Antikörperzugabe. Anschließend wurden magnetische Beads, die mit einem sekundären Antikörper konjugiert waren, zu den Ansätzen gegeben. Nach intensivem Waschen wurden die Beads in SDS-Ladepuffer aufgenommen und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Die durch Abkochen eluierten Proteine wurden im SDS-Gel aufgetrennt und mittels Westernblotting mit anti-Sup bzw. anti-Htt Antikörpern detektiert.

3.1.8. *In vitro* Aggregation von PrD-Htt Fusionsproteinen und Sup35

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Fähigkeit von Sup35 zu aggregieren durch die Fusion mit den Htt-Exon1 Fragmenten erhöht wird und dadurch auch die Aggregation von endogenem Sup35 stimuliert wird. Um diese Ergebnisse zu bestätigen und den molekularen Mechanismus für die polyglutaminabhängige Induktion von Hefepriionen aufzuklären, wurde ein *in vitro* System für die Aggregation von Sup-Htt Fusionsproteinen etabliert. Da PrD effizienter als Sup35 aggregiert, wurden PrD-Htt Fusionsproteine für diese Versuche eingesetzt. Um diese Proteine in löslicher Form zu exprimieren und ihre vorzeitige Aggregation zu verhindern, wurden sie an das Maltose-bindende Protein (MBP) fusioniert. Des Weiteren wurden mit einem N-terminalen His-Tag versehene Sup35 und C-terminales Sup35-Protein (SupC) mit MBP fusioniert. Die verschiedenen Fusionsproteine sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Struktur der MBP-PrD-Htt und MBP-Sup Proteine

Plasmid	Protein*	Schematische Darstellung
pMAL-c2X-PrD	M-PrD	
pMAL-c2X-PrD-CAG19	M-PrD-Q19	
pMAL-c2X-PrD-CAG55	M-PrD-Q55	
pMAL-c2X-PrD-CAG89	M-PrD-Q89	
pMAL-c2X-HIS-Sup35	M-HIS-Sup35	
pMAL-c2X-HIS-SupC	M-HIS-SupC	

MBP: Maltose-bindendes Protein; PrD: Prion Domäne von Sup35 (As 1-123); M: Mittlere Domäne von Sup35 (As 124-253); C: C-terminale Domäne von Sup35 (As 254-685); Rotes Segment: Htt-Exon1 Fragment (As 1-44) mit 19 (I), 55 (II) und 89 (III) Glutaminen; ▼ Faktor Xa Erkennungssequenz; H₆: HIS-Tag. *Im Text nach Abspaltung von MBP ohne "M-"bezeichnet.

Die in Tabelle 9 aufgelisteten Proteine wurden in *E. coli* exprimiert und unter nativen Bedingungen mittels Affinitätschromatographie über Maltose-gekoppelte Agarose-Beads aufgereinigt. Die gereinigten Proteine wurden zur Kontrolle ihrer Qualität mit SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt. Alle Proteine zeigten die erwartete Größe im SDS-Gel und konnten auch mit entsprechenden Antikörpern detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Um das Aggregationsverhalten von PrD, PrD-Q19, PrD-Q55 und PrD-Q89 *in vitro* zu untersuchen, wurden die MBP-Fusionsproteine mit Faktor Xa verdaut. Durch die proteolytische Abspaltung des N-terminalen MBP-Anteils wurde die Aggregation der PrD-Htt Proteine initiiert. Für jedes Protein wurden mehrere identische Ansätze pipettiert, bei denen die Aggregationsreaktion zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch Schockfrost gestoppt wurde. Mit dem Filtertest wurden die Proben auf Aggregate untersucht. Die Kinetik der polyglutaminabhängigen Aggregation der PrD-Htt Fusionsproteine ist in Abbildung 42 A dargestellt. Innerhalb von 30 h konnten nur für PrD-Q55 und für PrD-Q89 SDS-stabile Aggregate nachgewiesen werden, nicht aber für PrD oder PrD-Q19. PrD-Q89 bildete bereits nach 2 h, PrD-Q55 dagegen erst nach 6 h Aggregate. Dieser Versuch wurde zusammen mit 2 Wiederholungsexperimenten

quantitativ ausgewertet (Abbildung 42 B). Dabei zeigte sich, dass der Aggregationsprozess bei PrD-Q89 nach 8 h und bei PrD-Q55 nach 20 h abgeschlossen ist. Diese Ergebnisse spiegeln das Aggregationsverhalten von PrD-Q54 und PrD-Q92 in GT17-Zellen wieder und sind auch im Einklang mit den entsprechenden Konversionsraten. Je schneller ein PrD-Htt Fusionsprotein aggregiert, desto mehr GT17-Zellen werden zu $[PSI^+]$ konvertiert und desto eher tritt die Konversion auf.

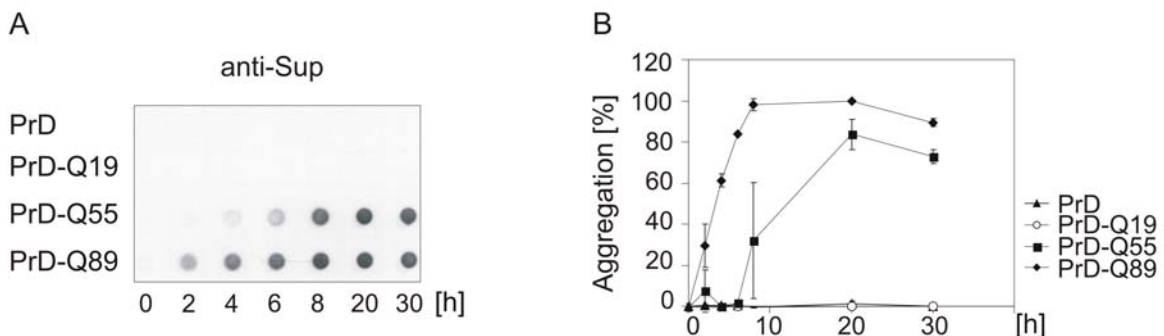


Abbildung 42: *In vitro* Aggregation von PrD und PrD-Htt Fusionsproteinen. (A) 200 ng lösliches rekombinantes Protein wurden mit 0,1 U Faktor Xa bei 37 °C ohne Schütteln verdaut. Dadurch wurde der MBP-Anteil abgespalten und die Aggregation des PrD-Htt Fusionsproteins initiiert. Für jedes Protein wurden 7 parallele Proben ange-setzt und deren Aggregation zu den angegebenen Zeitpunkten durch Schockfrostern mit flüssigem Stickstoff abgestoppt. Die Proben wurden dann im Filtertest analysiert, wobei die Aggregate mit dem anti-Sup Antikörper detektiert wurden. (B) Filtertests von insgesamt 3 unabhängigen Experimenten wurden quantitativ mit der AIDA Software ausgewertet. Dabei wurde das stärkste Signal gleich 100 % Aggregation ge-setzt.

Um die Ultrastruktur der *in vitro* gebildeten Aggregate von PrD-Htt Fusionsproteinen zu untersuchen, wurden M-PrD, M-PrD-Q19, M-PrD-Q55 und M-PrD-Q89 mit Faktor Xa für 24 h bei 37 °C verdaut. Anschließend wurden die Proben mit 1 % Uranylacetat angefärbt und mit dem Elektronenmikroskop untersucht (Abbildung 43). PrD-Q55 sowie PrD-Q89 bildeten amyloidähnliche Fibrillen, die einen Durchmesser von etwa 10 nm und eine Länge von 200 nm bis zu mehreren Mikrometern aufwiesen. Vergleichbare Strukturen wurden nicht bei Ansätzen mit PrD oder PrD-Q19 beobachtet.

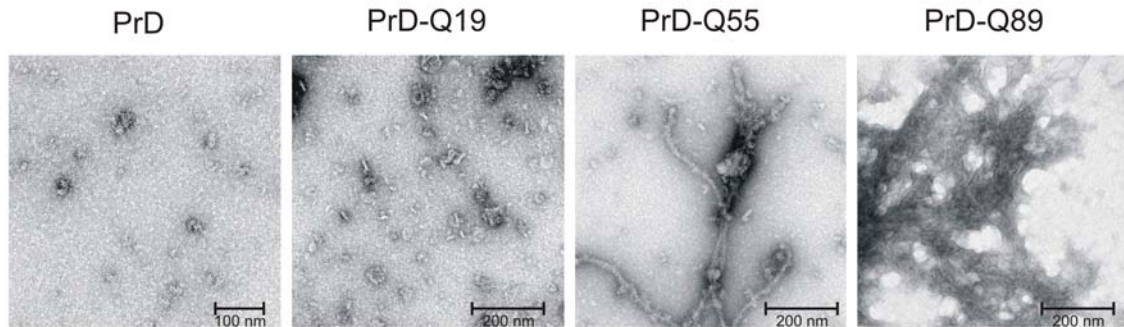


Abbildung 43: Elektronenmikroskopische Untersuchung der Aggregation von PrD-Htt Proteinen. Von jedem Protein wurden ca. 200 ng für den Verdau mit 0,1 U Faktor Xa eingesetzt. Nach 24 h Inkubation ohne Schütteln bei 37 °C wurden die Proben mit 1% Uranlyacetat negativ gefärbt.

Als nächstes wurde untersucht, ob Sup35 in Gegenwart von PrD-Htt Aggregaten *in vitro* in den unlöslichen Zustand überführt werden kann. Dafür wurden aufgereinigtes M-PrD, M-PrD-Q19, M-PrD-Q55 und M-PrD-Q89 jeweils mit His-Sup35 oder His-SupC versetzt. Der Aggregationsprozess wurde durch Zugabe von Faktor Xa initiiert. Die Ansätze mit His-SupC dienten dabei als Kontrolle, da dieses Protein aufgrund der fehlenden PrD-Domäne nicht aggregieren kann. Jede Proteinkombination wurde dreifach angesetzt, wobei jeweils eine Probe nach 0, 24 und 48 h Inkubation bei 37 °C mit dem Filtertest analysiert wurde. Bei den Ansätzen mit PrD oder PrD-Q19 konnten keine SDS-stabilen Aggregate detektiert werden. Wie erwartet bildeten jedoch die Proteine PrD-Q55 und PrD-Q89 innerhalb von 48 h SDS-stabile Aggregate, die auch mit dem anti-Sup Antikörper nachgewiesen werden konnten. In diesen Proben wurden auch SDS-stabile His-Sup35 Aggregate mit dem anti-His Antikörper detektiert (Abbildung 44). Bei den Ansätzen mit PrD-Q55/His-Sup35 und PrD-Q89/His-Sup35 konnten His-Sup35 Aggregate innerhalb von 48 h nachgewiesen werden, während in den Kontrollansätzen mit His-SupC in demselben Zeitraum keine Aggregate detektiert wurden. In Gegenwart von PrD-Q55 oder PrD-Q89 Aggregaten wird also His-Sup35 vom löslichen in den unlöslichen Zustand überführt. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass PrD-Q55 bzw. PrD-Q89 Aggregate als Aggregationskeime die Konformationsänderung und die Aggregation von His-Sup35 hervorrufen. Außerdem werden durch eine schnellere und im Ausmaß effizientere Aggregation, wie sie bei PrD-Q89 im Vergleich zu PrD-Q55 auftritt, früher unlösliche

His-Sup35 Aggregate gebildet. Die Konversion von His-Sup35 korreliert also mit der Aggregationseffizienz der Proteine PrD-Q55 und PrD-Q89.

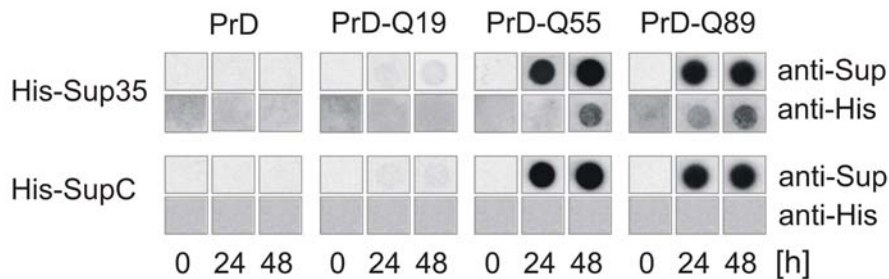


Abbildung 44: His-Sup35 Aggregation *in vitro* in Gegenwart von PrD-Htt Fusionsproteinen. 200 ng von M-PrD und M-PrD-Htt Fusionsproteinen wurden mit jeweils 100 ng His-Sup35 oder His-SupC gemischt. Jede Proteinkombination wurde dreimal angesetzt, so dass nach Zugabe von 0,1 U Faktor Xa nach 0, 24 und 48 h Inkubation bei 37 °C jeweils eine Probe für den Filtertest zur Verfügung stand. SDS-stabile Aggregate wurden mit dem anti-Sup oder anti-His Antikörper detektiert.

3.1.9. Induktion von $[PSI^+]$ durch Coexpression von Sup35 und Htt-Exon1 Fragmenten

Vor kurzem wurde von Derkatch *et al.* gezeigt, dass die Coexpression von PrD und Htt-Exon1 Fragmenten mit mehr als 72 Glutaminen in $[psi^-][pin^-]$ -Zellen die *de novo* Entstehung von $[PSI^+]$ hervorruft (Derkatch et al., 2004). Um diese Daten mit den Ergebnissen der Sup-Htt Fusionsproteine dieser Arbeit (Abbildung 35) vergleichen zu können, wurden Sup35 oder PrD mit Htt-Exon1 Fragmenten in GT17-Zellen coexprimiert. Dabei wurden die Kombinationen Sup35/Sup35, Sup35/Q52, Sup35/Q90, PrD/Sup35, PrD/Q52 und PrD/Q90 überprüft. Um die Entstehung des $[PSI^+]$ -Phänotyps zu kontrollieren, wurden die Zellen, die diese Proteinpärchen exprimierten, auf SD-Ade und SD+Ade Medium gestempelt. Ferner wurden die Lysate dieser Zellen mit dem Filtertest auf Aggregate untersucht (Abbildung 45). Nach 14-tägiger Inkubation wuchsen die Zellen, die Sup35/Q90 oder PrD/Q90 coexprimierten, auf SD-Ade Medium. In Lysaten dieser Zellen wurden sowohl Sup35 als auch Htt-Aggregate detektiert. Die Zellen mit den Proteinpärchen Sup35/Sup35, Sup35/Q52, PrD/Sup35 und PrD/Q52 bildeten weder Kolonien auf SD-Ade Medium noch SDS-stabile Aggregate. Demnach ist für die spontane Entstehung von $[PSI^+]$ sowohl die

Überproduktion von Sup35 als auch die Bildung SDS-stabiler Htt-Aggregate erforderlich. Die Konversionsraten der Zellen, die Sup35/Q90 oder PrD/Q90 synthetisieren, waren aber deutlich geringer als die der Zellen, die Sup-Htt Fusionsproteine exprimierten. So bildeten GT17-Zellen bei Expression von Sup-Q92 35 mal mehr Ade⁺-Kolonien als bei Coexpression von Sup35/Q90 (Abbildung 35 und 45). Im Falle der Expression von PrD-Q92 wurde sogar eine 150-fach höhere Anzahl an Ade⁺-Kolonien detektiert als bei der Coexpression der Proteine PrD/Q90 (Abbildung 36 und 45). Anscheinend wird die Aggregation von endogenem Sup35 effizienter bei Expression der Sup-Htt oder PrD-Htt Fusionsproteine stimuliert als bei Coexpression von Sup35 oder PrD mit Htt-Exon1 Fragmenten.

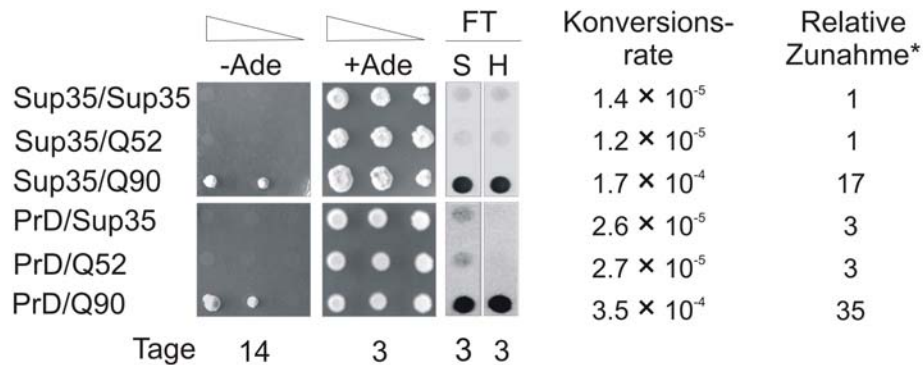


Abbildung 45: Induktion von $[PSI^+]$ in $[psi^-][pin^-]$ GT17-Zellen durch Coexpression von Sup35 oder PrD mit Htt-Exon1 Fragmenten. Zellen, die die angegebenen Proteine exprimierten, wurden in Verdünnungsreihen auf SD-Ade und SD+Ade Platten gestempelt und für die angegebene Zeit bei 30 °C inkubiert. Für den Filtertest (FT) wurden die Zellen für 3 Tage in flüssigem Medium angezogen. Aggregate wurden nach der Filtration mit anti-Sup (S) und anti-Htt (H) Antikörpern detektiert. Die Konversionsraten wurden wie auf Seite 158 beschrieben in 3 unabhängigen Experimenten ermittelt. *Relative Zunahme der gebildeten Ade⁺-Kolonien bezogen auf GT17-Zellen mit den Kontrollvektoren pYex2T und pGADYex. Die Reversionsrate für Zellen mit den Kontrollplasmiden lag bei 1×10^{-5} .

3.1.10. Einfluss des Expressionsniveaus der Sup-Htt Fusionsproteine auf die Induktion von $[PSI^+]$

Die Induktion von $[PSI^+]$ ist entscheidend von der intrazellulären Sup35-Konzentration abhängig (Chernoff et al., 1995). Alle in Tabelle 7 und 8 aufgelisteten Proteine werden in großen Mengen produziert, da sie von einem 2μ Multicopy-Plasmid kodiert und unter der Kontrolle eines mit Kupfer induzierbaren Promoters exprimiert werden. Um die Induktion von $[PSI^+]$ bei niedrigeren intrazellulären Konzentrationen von Sup-Htt oder PrD-Htt Fusionsproteinen zu untersuchen, wurden die Proteine Sup35, Sup-Q54, Sup-Q92, PrD, PrD-Q54 und PrD-Q92 mit dem sehr schwachen Sup35-Promoter von einem Expressionsplasmid mit centromerem Replikationsursprung in GT17-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden in Verdünnungsreihen auf SD-Ade und SD+Ade Platten gestempelt und für 18 Tagen inkubiert. Nur Zellen mit den Proteinen PrD-Q54 oder PrD-Q92 bildeten Ade⁺-Kolonien. Nach einer 6-tägigen Wachstumsphase konnten in diesen Zellen auch SDS-resistente Sup35 und Htt-Aggregate detektiert werden. Im Gegensatz dazu bildeten GT17-Zellen, die Sup-Q54 oder Sup-Q92 exprimieren, weder Ade⁺-Kolonien noch SDS-stabile Aggregate (Abbildung 46). Die Konversionsraten der Zellen mit den Proteinen PrD-Q54 oder PrD-Q92 waren 10-50fach höher als die der Kontrollzellen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Sup-Htt Fusionsproteine nur bei hohen Konzentrationen $[PSI^+]$ induzieren können, während PrD-Htt Fusionsproteine auch bei geringeren Expressionsraten den $[PSI^+]$ -Phänotyp hervorrufen und SDS-stabile Aggregate bilden können. Vermutlich aggregieren PrD-Htt Fusionsproteine effizienter als die entsprechenden Sup-Htt Fusionsproteine und können daher auch bei niedrigem Expressionsniveau $[PSI^+]$ induzieren.

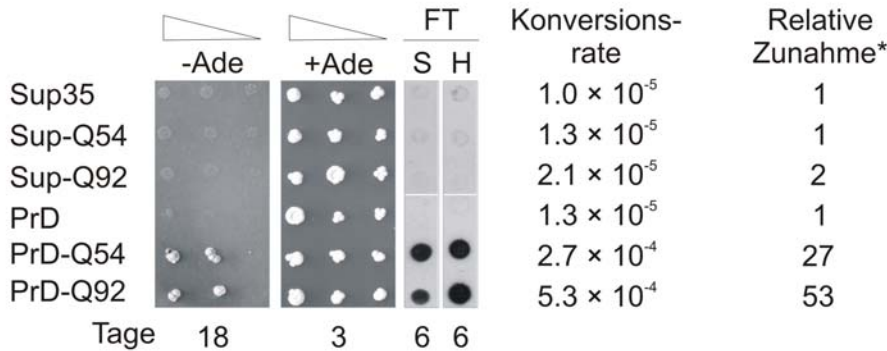


Abbildung 46: Induktion von $[PSI^+]$ in $[psi^-][pin^-]$ GT17-Zellen nach Expression von Sup-Htt oder PrD-Htt Fusionsproteinen mit Centromerplasmiden. Nach der Transformation der Centromerplasmide wurden die GT17-Zellen in Verdünnungsreihen auf SD-Ade und SD+Ade Platten gestempelt und für die angegebene Zeit inkubiert. Für den Filtertest (FT) wurden die Zellen für 6 Tage in flüssigem Medium angezogen. Nach der Filtration wurden die Aggregate mit anti-Sup (S) und anti-Htt (H) Antikörpern detektiert. Die Konversionsraten wurden wie auf Seite 158 beschrieben in 3 unabhängigen Experimenten ermittelt. *Relative Zunahme der gebildeten Ade⁺-Kolonien bezogen auf GT17-Zellen mit dem Centromerplasmid pRS316sp. Die Reversionsrate für Zellen mit pRS316sp lag bei 1×10^{-5} .

3.1.11. Induktion von $[PSI^+]$ durch Expression von Sup-Htt Fusionsproteinen in Abhängigkeit von Hsp104 und nach GdnHCl-Behandlung

In Hefezellen führt sowohl Überexpression als auch die Eliminierung des Chaperons Hsp104 zum Verlust von Prionen. Nur bei einer physiologischen Konzentration von Hsp104 treten Prionen in der Hefezelle auf (Chernoff et al., 1995; Patino et al., 1996). Daher wurde geprüft, ob sich veränderte Hsp104 Expressionsniveaus bei gleichzeitiger Überexpression von aggregationsfähigen Sup-Htt Fusionsproteinen auf die *de novo* Entstehung von $[PSI^+]$ auswirken.

Zur Kontrolle wurde zunächst das Wachstum auf SD-Ade Medium und die Bildung von SDS-stabilen Aggregaten in GT17-Zellen, die Sup35, Sup-Q19, Sup-Q54 oder Sup-Q92 exprimieren, überprüft. Wie erwartet bildeten die Zellen mit Sup-Q54 oder Sup-Q92 Ade⁺-Kolonien und SDS-resistente Aggregate (Abbildung 47).

Um zu untersuchen, ob die Sup-Htt Fusionsproteine auch in Abwesenheit von Hsp104 die *de novo* Entstehung $[PSI^+]$ fördern, wurden die Proteine Sup35, Sup-Q19, Sup-Q54 und Sup-Q92 in OT78-Zellen exprimiert. *HSP104* ist bei den Hefestamm OT78, der ansonsten isogen zu GT17 ist, deletiert. OT78-Zellen, die Sup35

oder die Sup-Htt Fusionsproteine synthetisieren, wurden auf SD-Ade und SD+Ade Medium gestempelt und für 9 Tage inkubiert. Auf den SD-Ade Platten bildeten sich keine Kolonien. Dies deutet darauf hin, dass der $[PSI^+]$ -Phänotyp in Abwesenheit von Hsp104 nicht durch die Expression von Sup-Q54 oder Sup-Q92 hervorgerufen werden kann. Dieses Ergebnis wurde auch durch die ermittelten Konversionsraten unterstützt. Die Konversionsraten der OT78-Zellen mit den Proteinen Sup-Q54 oder Sup-Q92 waren nicht höher als die Rate, die für OT78-Zellen mit dem Kontrollvektor bestimmt wurde (Abbildung 47). Dennoch wurden mittels Filtertest SDS-stabile Aggregate in den Sup-Q54 oder Sup-Q92 synthetisierenden OT78-Zellen detektiert. Somit können Sup-Htt Aggregate auch in Abwesenheit von Hsp104 gebildet werden, die jedoch nicht den $[PSI^+]$ -Phänotyp erzeugen können.

Auch bei Überexpression von Hsp104 in GT17-Zellen mit Sup-Q54 oder Sup-Q92 konnten SDS-stabile Aggregate mit dem Filtertest detektiert werden. Außerdem bildeten diese Zellen nur vereinzelt Kolonien auf SD-Ade Medium (Abbildung 47). Die quantitative Untersuchungen der GT17-Zellen, die Hsp104 zusammen mit Sup-Q54 oder Sup-Q92 überexprimieren, ergaben, dass ca. 10 mal mehr Zellen auf SD-Ade Medium wuchsen als bei GT17-Zellen, die Hsp104 überexprimierten und den Kontrollvektor pYex2T enthielten (Abbildung 47). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass nur wenige Zellen mit Sup-Htt Aggregaten bei Überexpression Hsp104 zu $[PSI^+]$ konvertieren.

In Hefe wird das Auftreten von Prionen nicht nur durch unterschiedliche Expressionsniveaus von Hsp104 beeinflusst, sondern auch durch wiederholtes Wachstum auf Guanidinium Hydrochlorid- (GdnHCl-) haltigem Medium. Werden Hefezellen dreimal auf YPD-Medium mit 5 mM GdnHCl angezogen und anschließend auf SD-Ade Medium inkubiert, geht der $[PSI^+]$ -Phänotyp verloren. Es wurde überprüft, ob dieses sogenannte „Curing“ auch bei GT17-Zellen, die Sup-Htt Fusionsproteine überexprimieren, eintritt. Nach GdnHCl-Behandlung wurden die GT17-Zellen mit Sup35 oder Sup-Htt Fusionsproteinen auf SD-Ade Medium gestempelt und für 9 Tage inkubiert. Die Zellen mit den Proteinen Sup-Q54 oder Sup-Q92 wuchsen auf SD-Ade Medium. Dieses Ergebnis wurde auch von den ermittelten Konversionsraten unterstützt. Die Anzahl der Ade⁺-Kolonien, die von unbehandelten und GdnHCl behandelten Zellen gebildet wurden, unterschied sich nur marginal. Außerdem bildeten die GT17-Zellen mit Sup-Q54 oder Sup-Q92 auch nach GdnHCl-Behandlung SDS-resistente Aggregate

(Abbildung 47). Diese Ergebnisse zeigen, dass GT17-Zellen mit Sup-Q54 oder Sup-Q92 auch nach einer GdnHC-Behandlung den $[PSI^+]$ -Phänotyp aufweisen.

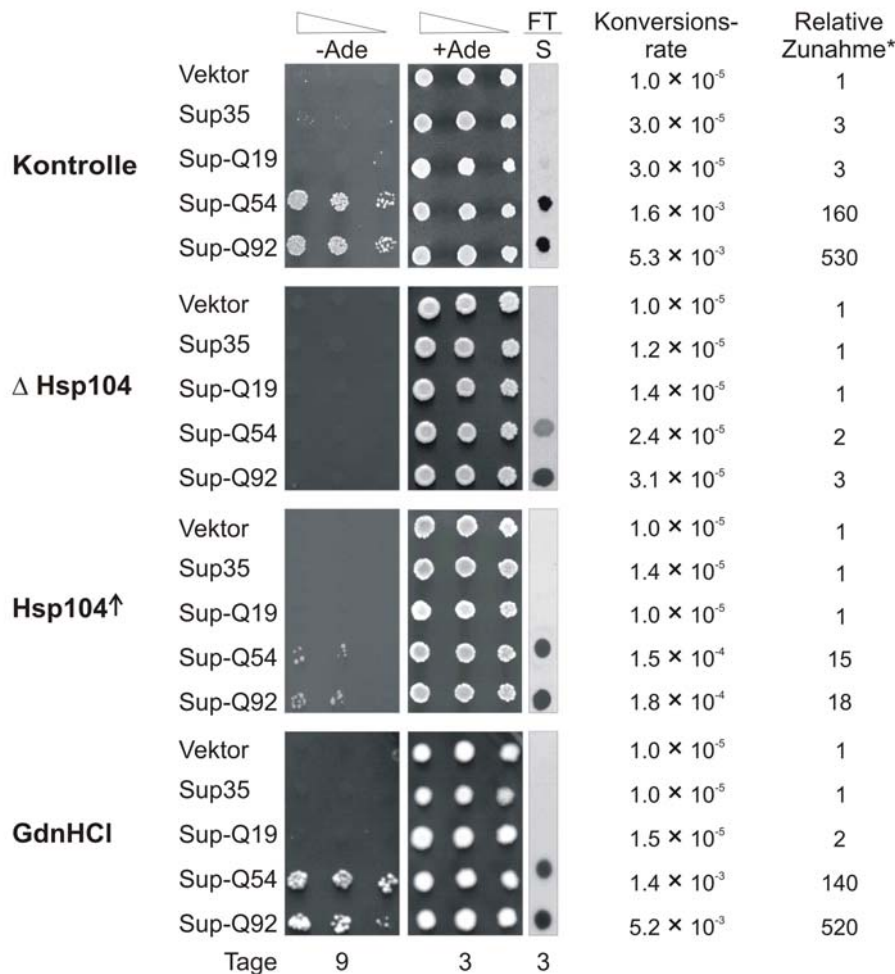


Abbildung 47: Inhibierung der durch Sup-Htt Fusionsproteine vermittelten *de novo* Entstehung von $[PSI^+]$. Die angezeigten Proteine wurden in OT78-Zellen, die kein chromosomales *HSP104* Gen (Δ) besitzen, sowie in GT17-Zellen mit erhöhter Hsp104 Konzentration (\uparrow) überexprimiert. Außerdem wurden GT17-Zellen, die die angegebenen Proteine synthetisierten, einer GdnHCl Behandlung unterzogen. Als Kontrolle wurden unbehandelte GT17-Zellen, die die verschiedenen Sup-Htt Fusionsproteine synthetisierten, mitgeführt. Die jeweiligen Zellen wurden in Verdünnungsreihen auf SD-Ade und SD+Ade Medium gestempelt und für die angegebenen Zeiten inkubiert. Für den Filtertest (FT) wurden die Zellen für 3 Tage in flüssigem Medium angezogen. Nach der Filtration wurden unlösliche Sup35-Aggregate mit dem anti-Sup (S) Antikörper detektiert. Die Konversionsraten wurden wie auf Seite 158 beschrieben in 3 unabhängigen Experimenten ermittelt. *Die relative Zunahme der gebildeten Ade⁺-Kolonien bezogen auf GT17-Zellen mit dem Kontrollplasmid pYex2T.

3.1.12. Löslichkeit von endogenem Sup35 in Zellen mit Sup-Q54 bei veränderter Hsp104-Konzentration sowie nach einer Behandlung mit GdnHCl

Sowohl bei Eliminierung als auch bei Überexpression von Hsp104 in $[psi^-][pin^-]$ -Zellen mit Sup-Htt Aggregaten entstehen keine oder nur wenige Ade^+ -Kolonien. Daher sollte theoretischerweise endogenes Sup35 löslich sein. Um dies zu prüfen, wurde Sup-Q54 in Hsp104 freien OT78-Zellen oder in GT17-Zellen, die Hsp104 überexprimieren, synthetisiert. Als Kontrolle dienten GT17-Zellen, die Sup-Q54 exprimierten. Nach Zentrifugation der jeweiligen Zellysate wurden die Fraktionen durch SDS-PAGE und Westernblotting analysiert. In den GT17-Kontrollzellen mit Sup-Q54 waren sowohl endogenes Sup35 als auch Sup-Q54 vollständig unlöslich, was den $[PSI^+]$ -Phänotyp anzeigt. In Zellen ohne Hsp104 und in Zellen mit überexprimiertem Hsp104 wurden endogenes Sup35 und Sup-Q54 sowohl im Überstand als auch im Pellet detektiert (Abbildung 48). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass einerseits endogenes Sup35 größtenteils unlöslich ist und somit konvertiert wurde, dass aber andererseits eine relativ geringe Menge an löslichem Sup35 ausreicht, um eine korrekte Termination der Translation am Nonsense-Codon im *ade1-14* Gen zu bewirken. Wurden GT17-Zellen mit Sup-Q54 nach einer Behandlung mit GdnHCl untersucht, so wurde endogenes Sup35 zusammen mit Sup-Q54 fast ausschließlich in der unlöslichen Fraktion detektiert (Abbildung 48). Dies lässt vermuten, dass eine GdnHCl-Behandlung nicht ausreichend ist, um die *de novo* Entstehung von $[PSI^+]$, die durch Sup-Htt Aggregate induziert wird, zu verhindern.

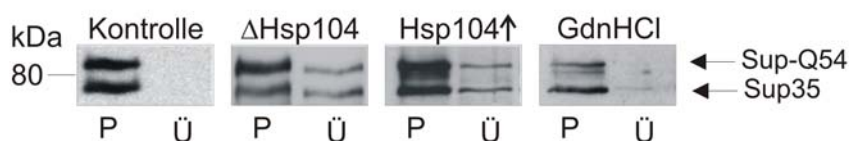


Abbildung 48: Bestimmung der Löslichkeit von endogenem Sup35 und Sup-Q54 bei Eliminierung oder Überexpression von Hsp104 bzw. nach GdnHCl-Behandlung. Nach Zentrifugation der Zellysate bei 50 000 g für 30 min wurden je 25 µg Gesamtprotein vom Pellet (P) und Überstand (Ü) über SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Endogenes Sup35 und rekombinantes Sup-Q54 wurden mit dem anti-Sup Antikörper detektiert.

3.1.13. Eliminierung von $[PSI^+]$ in Zellen, die Sup35 oder Sup-Q54 überexprimieren

Ein wichtiges Kennzeichen für ein Hefeprion ist, dass es von seinem unlöslichen in den löslichen Zustand überführt werden kann. Es wurde untersucht, ob $[PSI^+]$ -Zellen mit Sup-Q54 Aggregaten durch Überexpression von Hsp104 oder einer GdnHCl-Behandlung in $[psi^-]$ -Zellen überführt werden können.

Zunächst wurden zur Kontrolle das Wachstum auf SD-Ade Medium und die Bildung von SDS-stabilen Aggregaten von OT56-Zellen ($[PSI^+][PIN^+]$), die Sup35 exprimieren, und von konvertierten GT17-Zellen ($[PSI^+]$), die Sup-Q54 synthetisieren, überprüft. Wie erwartet wurden von diesen Zellen Ade⁺-Kolonien und SDS-resistente Aggregate gebildet (Abbildung 49).

Zur Überexpression von Hsp104 wurden die konvertierte GT17-Zellen, die Sup-Q54 synthetisierten, und die OT56-Zellen, die Sup35 exprimierten, mit pGADYex-Hsp104 transformiert. Die resultierenden Transformanten wurden dann in Verdünnungsreihen auf SD-Ade Medium gestempelt und ihre Lysate im Filtertest auf SDS-stabile Aggregate untersucht. Wie erwartet wurde bei OT56-Zellen, die Hsp104 und Sup35 synthetisierten, kein Wachstum auf SD-Ade Medium beobachtet. In diesen Zellen wurden jedoch SDS-resistente Sup35-Aggregate detektiert (Abbildung 49). Die konvertierten GT17-Zellen, die Hsp104 und Sup-Q54 überexprimieren, bildeten SDS-stabile Aggregate und vereinzelte Ade⁺-Kolonien. Die Überexpression von Hsp104 führte also in OT56-Zellen mit Sup35 zum vollständigen des $[PSI^+]$ -Phänotyps. Auch die Mehrheit der konvertierten GT17-Zellen mit Sup-Q54 wurden durch Überexpression von Hsp104 geheilt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in diesen Zellen endogenes Sup35 teilweise löslich war.

Konvertierte Zellen mit Sup-Q54 und OT56-Zellen mit Sup35 wurden auch einer GdnHCl Behandlung unterzogen, um zu kontrollieren, ob ihr $[PSI^+]$ -Phänotyp dadurch eliminiert werden kann. Wie erwartet wuchsen die OT56-Zellen mit Sup35 nicht auf SD-Ade Medium. In diesen Zellen wurden auch keine SDS-stabilen Aggregate detektiert. Folglich wurden die OT56-Zellen mit Sup35 durch eine GdnHCl Behandlung in $[psi^-]$ -Zellen überführt. Diese Ergebnis weist darauf hin, dass durch mehrmaliges Passagieren dieser Zellen auf GdnHCl-haltigem Medium die Sup35-Aggregate verloren wurden. Im Gegensatz dazu bilden Konvertanten mit Sup-Q54

auch nach einer GdnHCl Behandlung Kolonien auf SD-Ade Medium sowie SDS-stabile Aggregate (Abbildung 49), was auf einen $[PSI^+]$ -Phänotyp dieser Zellen hinweist. In diesem Fall werden entweder die Sup-Htt Aggregate nicht oder nur sehr geringfügig durch eine GdnHCl-Behandlung beseitigt, oder Sup-Htt Fusionsproteine aggregieren erneut nach einer solchen Behandlung. Zellen mit aggregierenden Sup-Htt Fusionsproteinen können also nicht durch eine GdnHCl-Behandlung geheilt werden.

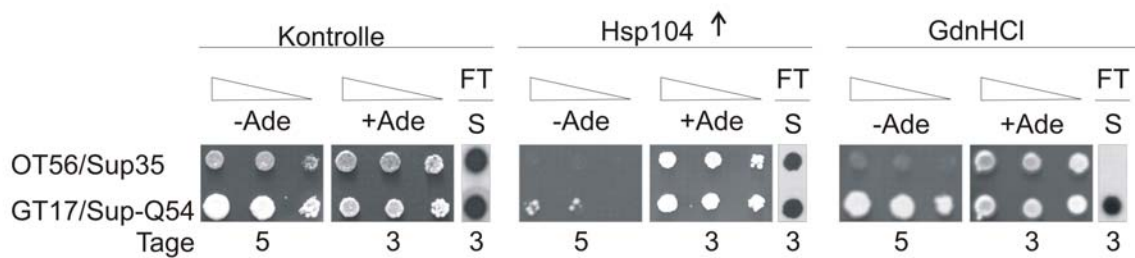


Abbildung 49: „Curing“ von $[PSI^+]$. OT56-Zellen ($[PSI^+][PIN^+]$), die Sup35 exprimieren, und $[PSI^+]$ -Zellen, die Sup-Q54 exprimieren, wurden für die Experimente verwendet. Für das „Curing“ wurden beide Zelltypen mit einem Plasmid, das für Hsp104 kodiert, transformiert oder alternativ einer GdnHCl Behandlung unterzogen. Die Zellen wurden dann in Verdünnungsreihen auf SD-Ade und SD+Ade Medium gestempelt und für die angegebenen Zeiten inkubiert. Für den Filtertest (FT) wurden die Zellen für 3 Tage in flüssigem Medium angezogen. Nach der Filtration wurden die Aggregate mit dem anti-Sup (S) Antikörper detektiert.

3.1.14. Die Rolle der Sup-Htt Fusionsproteine bei der Vererbung von $[PSI^+]$

Für die Induktion von $[PSI^+]$ in $[psi^-][pin^-]$ -Zellen ist die Expression von aggregierenden Sup-Htt Fusionsproteinen erforderlich. Daher stellte sich die Frage, ob diese Fusionsproteine auch für die stabile Vererbung des $[PSI^+]$ -Phänotyps von der Mutter auf die Tochterzelle relevant sind. Um dies zu untersuchen, wurden die verschiedenen Sup-Htt Fusionsproteine aus konvertierten Zellen eliminiert und die resultierenden Zellen nach mehreren Generationen auf Merkmale von $[PSI^+]$ untersucht. In Abbildung 50 ist die Abfolge der einzelnen Selektionsschritte dargestellt.

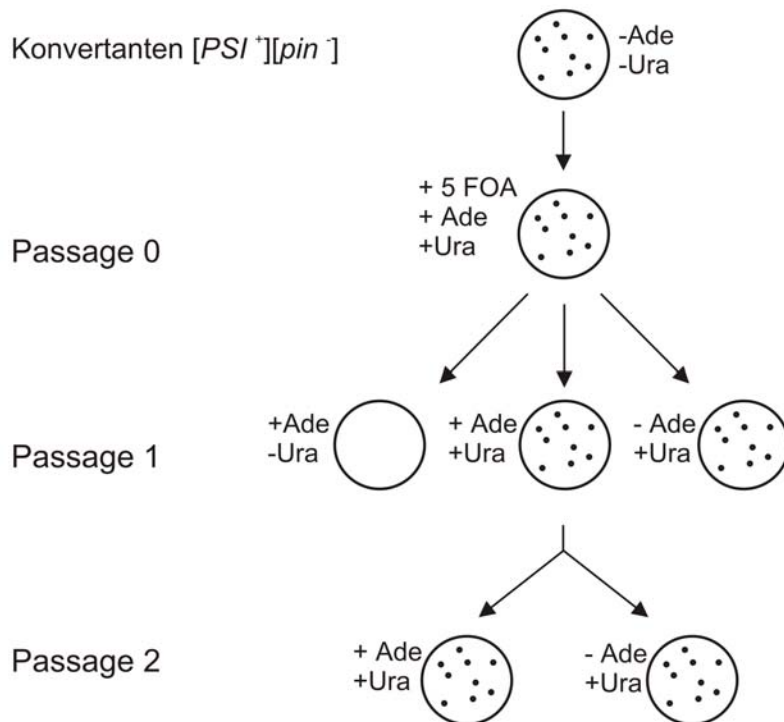


Abbildung 50: Schematische Darstellung der einzelnen Selektionsschritte zur Charakterisierung der Rolle von Sup-Htt Fusionsproteinen bei der Vererbung von $[PSI^+]$. Die Plasmide mit dem *URA3*-Markergen wurden aus konvertierten Zellen durch Inkubation auf 5-FOA haltigem SD-Medium eliminiert. Die resultierenden Zellen (P0) wurden auf den angezeigten Medien plattiert, wobei Zellen der Passage 1 (P1) entstanden. P1-Zellen von SD+Ade+Ura Medium wurden nochmals auf SD-Ade und SD+Ade Medium überführt, auf denen dann die Zellen der Passage 2 (P2) wuchsen.

Die Plasmide mit dem *URA3*-Markergen, die für Sup-Q54, Sup-Q92, PrD-Q54 oder PrD-Q92 kodieren, wurden aus konvertierten Zellen durch Inkubation auf 5-FOA-haltigem SD-Medium eliminiert. Da 5-FOA toxisch für Uracil-prototrophe Hefezellen ist, können im Falle der Konvertanten nur solche Zellen wachsen, die das Plasmid mit dem *URA3*-Marker verloren haben. Zellen, die auf 5-FOA Medium Wachstum zeigten, wurden als Passage 0 (P0) bezeichnet. Diese Zellen wurden dann wiederholt auf SD-Ade und SD-Ade Medium gestempelt, wodurch P1- und P2-Zellen entstanden. P0- sowie P1-Zellen wuchsen nicht auf SD-Ura+Ade-Medium, was auf eine erfolgreiche Eliminierung der *URA3*-Marker Plasmide hinweist (Abbildung 51). Da P1- und P2-Zellen weiterhin Ade⁺-Kolonien bildeten, ist anzunehmen, dass aggregierte Sup-Htt Fusionsproteine nicht für die Vererbung von $[PSI^+]$ erforderlich sind.

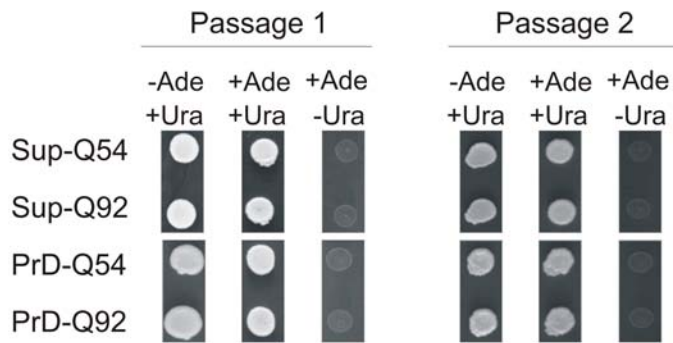


Abbildung 51: Überprüfung des Ade⁺-Phänotyp von P0- und P1-Zellen. P0- und P1-Zellen wurden auf die angezeigten SD-Medien gestempelt und für 4 Tage inkubiert.

Um die Eliminierung der Sup-Htt Fusionsproteine unabhängig vom Ade⁺-Phänotyp zu bestätigen, wurden Lysate von P0-, P1- und P2-Zellen mit dem Filtertest auf SDS-stabile Aggregate untersucht (Abbildung 52). Als Kontrolle wurden Lysate von Konvertanten mit Sup-Htt Fusionsproteinen (K) verwendet. In den Kontrollzellen konnten die Aggregate sowohl mit anti-Htt als auch mit anti-Sup Antikörpern detektiert werden, während die Aggregate von P0-, P1- und P2-Zellen nur mit dem anti-Sup Antikörper nachgewiesen werden konnten. Folglich hatten bereits P0-Zellen die Sup-Htt Aggregate verloren. Endogenes Sup35 war in P0-, P1- und P2-Zellen unlöslich, womit der [PSI⁺]-Phänotyp dieser Zellen bestätigt wurde. Auch dieses Ergebnis zeigt, dass die Vererbung von [PSI⁺] unabhängig von Sup-Htt Fusionsproteinen erfolgt.

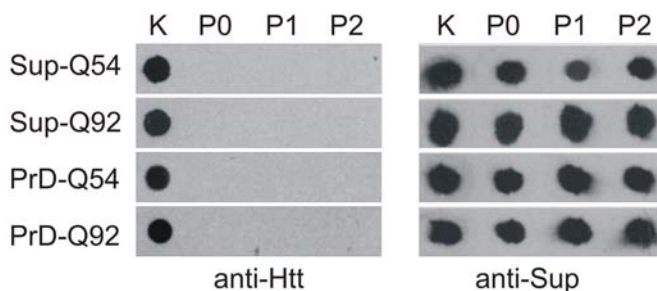


Abbildung 52: Charakterisierung der SDS-stabilen Aggregate in P0-, P1- und P2-Zellen. Mit dem Filtertest wurden die Lysate von P0-, P1- und P2-Zellen auf SDS-stabile Aggregate untersucht. Zur Kontrolle wurden auch Lysate von Konvertanten (K) mit dem Filtertest analysiert. Die Aggregate wurden mit den anti-Htt und anti-Sup Antikörpern detektiert.

Die Löslichkeit von endogenem Sup35 in P0-, P1- und P2-Zellen wurde auch mit Hilfe von Zentrifugationsexperimenten bestimmt. Dabei wurden die Pellet- und Überstandsfraktionen mittel SDS-PAGE und Westernblotting analysiert. In allen Lysaten wurde Sup35 ausschließlich in der unlöslichen Fraktion detektiert (Abbildung 53). Somit weisen diese Zellen ein weiteres $[PSI^+]$ charakteristisches Merkmal auf. Diese Ergebnisse bestätigen, dass Sup-Htt Aggregate nur für die Induktion nicht aber für die Vererbung von $[PSI^+]$ erforderlich sind.

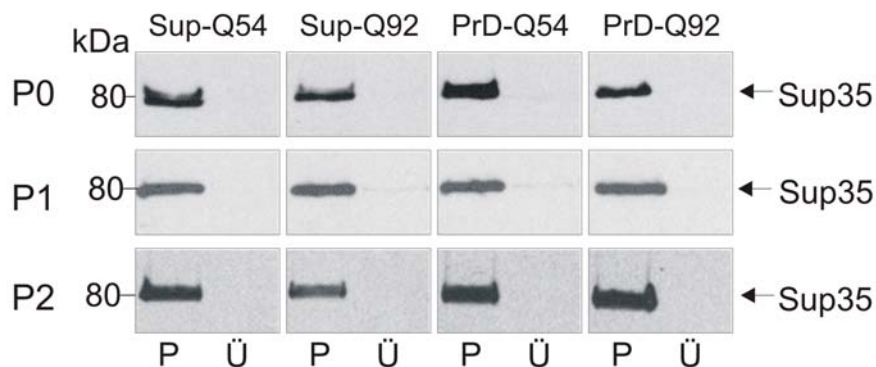


Abbildung 53: Bestimmung der Löslichkeit von endogenem Sup35 in P0-, P1- und P2-Zellen. Lysate der angezeigten Zellen wurden bei 50 000 g für 30 min zentrifugiert, je 25 µg Gesamtprotein vom Pellet (P) und Überstand (Ü) wurden über SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Endogenes Sup35 wurde mit dem anti-Sup Antikörper detektiert.

Es wurde untersucht, ob der $[PSI^+]$ -Phänotyp von P1-Zellen durch eine GdnHCl-Behandlung eliminiert werden kann. Dafür wurden diese Zellen dreimal auf 5 mM GdnHCl-haltigem YPD-Medium passagiert und dann auf SD-Ade Medium gestempelt. P1-Zellen konnten nach der GdnHCl-Behandlung nicht auf SD-Ade Medium wachsen (Abbildung 53). Somit verhielten sich diese Zellen ähnlich wie OT56-Zellen mit Sup35 nach GdnHCl-Behandlung (vgl. Abbildung 49).

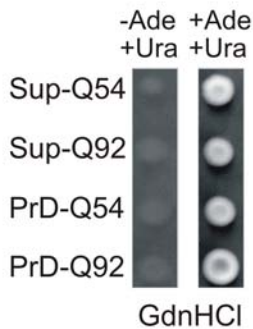


Abbildung 54: Eliminierung von $[PSI^+]$ aus P1-Zellen durch GdnHCl-Behandlung. P1-Zellen wurden dreimal in Folge auf 5 mM GdnHCl-haltigem YPD-Medium angezogen und dann auf SD-Ade oder SD+Ade Medium gestempelt.

3.1.15. Substitution von endogenem Sup35 durch Sup-Htt Fusionsproteine

Um zu untersuchen, ob die rekombinanten Sup-Htt Proteine Sup35 funktionell ersetzen können und somit einen eigenständigen Prionenphänotyp ausbilden können, wurden die Sup-Htt Fusionsproteine in Abwesenheit von endogenem Sup35 exprimiert. Dafür wurden die Hefestämme GT680 ($[psi^-][pin^-]$) und GT561 ($[PSI^+][PIN^+]$) verwendet, bei denen chromosomales *SUP35* deletiert und durch Sup35, das von einem Plasmid mit dem *URA3*-Marker kodiert wird, ersetzt ist. Bis auf die beschriebenen Ausnahmen sind die Stämme GT680 und GT561 isogen zu dem Stamm GT17. Die cDNA-Fragmente, die für Sup35, Sup-Q54 sowie Sup-Q92 kodieren, wurden in das Plasmid pGADYex mit dem *LEU2*-Marker subkloniert. Die drei resultierenden Plasmide wurden dann in GT680-Zellen transformiert. Außerdem wurde das Plasmid pGADYex-SUP35 in GT561-Zellen transformiert. Um das ursprünglich in den Stämme enthaltene, für Sup35 kodierende *URA3*-Plasmid zu eliminieren, wurde eine 5-FOA-Selektion durchgeführt. Nach dieser Selektion wuchsen die Hefezellen nicht mehr auf SD-Medium ohne Uracil, was auf eine erfolgreiche Entfernung der Plasmide mit dem *URA3*-Marker hinweist.

GT680-Zellen mit Sup35, Sup-Q54 oder Sup-Q92 wurden dann auf SD-Ade und SD+Ade Medium gestempelt. Außerdem wurden Lysate dieser Zellen mit dem Filtertest analysiert. Dabei zeigte sich, dass nur GT680-Zellen mit Sup-Q54 oder Sup-Q92 Ade⁺-Kolonien bilden und auch SDS-stabile Aggregate enthalten (Abbildung 54). Folglich können die Sup-Htt Fusionsproteine endogenes Sup35 funktionell ersetzen.

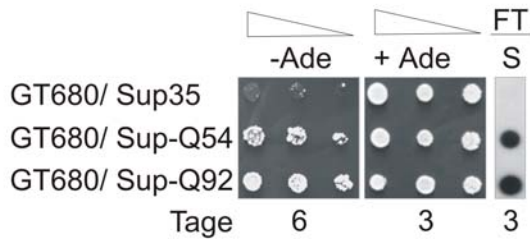


Abbildung 55: Substitution von endogenem Sup35 durch Sup-Q54 oder Sup-Q92. GT680-Zellen ($[\psi^-][pin^-]$), die die angezeigten Proteine exprimieren, wurden in Verdünnungsreihen auf SD-Ade und SD+Ade Medium gestempelt und für die angegebenen Zeiten inkubiert. Für den Filtertest (FT) wurden die Zellen für 3 Tage in flüssigem Medium angezogen. Die Aggregate wurden mit dem anti-Sup (S) Antikörper detektiert.

3.1.16. Eliminierung von Hsp104 in GT680-Zellen mit Sup-Htt Fusionsproteinen

Um zu überprüfen, ob der Phänotyp, der bei Substitution von endogenem Sup35 durch Sup-Htt Fusionsproteine erzeugt wird, von einer physiologische Hsp104-Konzentration abhängig ist, wurde endogenes Hsp104 durch die Expression von Hsp104-KT, einer dominant-negativen Mutante von Hsp104, funktionell inaktiviert (Wegrzyn et al., 2001). Die Expression von Hsp104-KT wird über einen Galactose-induzierbaren Promoter reguliert, d.h. Hsp104-KT kann nur synthetisiert werden, wenn die Zellen auf Galaktose haltigem Medium angezogen werden. GT680-Zellen mit Sup35, Sup-Q54 oder Sup-Q92 wurden mit dem Hsp104-KT-kodierenden Plasmid transformiert. Auf Glukose haltigem SD-Ade Medium bildeten die GT680-Zellen mit Sup-Q54/Hsp104-KT oder Sup-Q92/Hsp104-KT Kolonien und SDS-stabile Sup-Htt Aggregate (Abbildung 56). Auf Galaktose haltigem Medium bildeten diese Zellen keine Ade⁺-Kolonien, aber SDS-resistente Aggregate. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Proteine Sup-Q54 oder Sup-Q92 in GT680-Zellen unabhängig von Hsp104 aggregieren, aber dass GT680-Zellen mit Sup-Htt Aggregaten nur in Gegenwart von Hsp104 Ade⁺-Kolonien bilden.

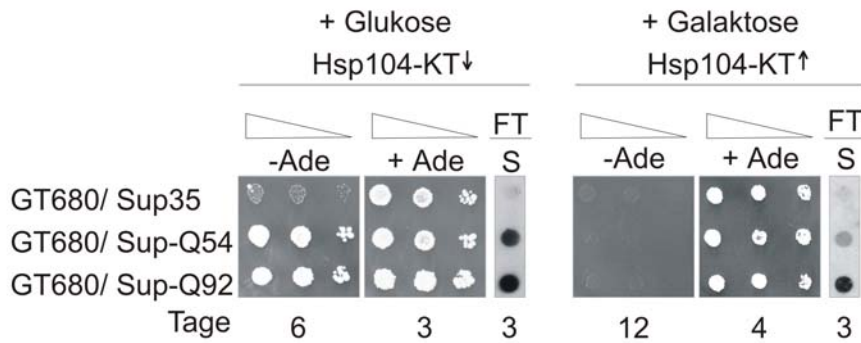


Abbildung 56: Verlust des Ade⁺-Phänotyps durch Inaktivierung von endogenem Hsp104. Die angezeigten Zellen wurden in Verdünnungsreihen auf Glukose oder Galaktose haltiges SD-Ade bzw. SD+Ade Medium gestempelt und für die angegebenen Zeiten inkubiert. Für den Filtertest (FT) wurden die Zellen für 3 Tage in flüssigem Medium angezogen und nach der Filtration die Aggregate mit dem anti-Sup (S) Antikörper detektiert.

Des Weiteren wurde untersucht, ob der Phänotyp, der bei Substitution von endogenem Sup35 durch Sup-Htt Fusionsproteine erzeugt wird, durch eine GdnHCl-Behandlung eliminiert werden kann. Dafür wurden konvertierte GT680-Zellen mit Sup-Q54 oder Sup-Q92 sowie GT561-Zellen mit Sup35 dreimal auf YPD-Medium mit 5 mM GdnHCl passagiert und anschließend auf SD-Ade sowie SD+Ade Platten gestempelt. Wie erwartet, konnten die GT561-Zellen mit Sup35 nicht mehr auf SD-Ade Medium wachsen. In diesen Zellen wurden nach der GdnHCl-Behandlung keine SDS-stabilen Sup35-Aggregate mehr detektiert. Dagegen bildeten die GT680-Zellen mit Sup-Q54 oder Sup-Q92 sowohl Ade⁺-Kolonien als auch SDS-stabile Aggregate (Abbildung 57). Dieses Ergebnis zeigt, dass eine GdnHCl Behandlung keinen Effekt auf Zellen hat, bei denen endogenes Sup35 durch Sup-Htt Fusionsproteine substituiert ist.

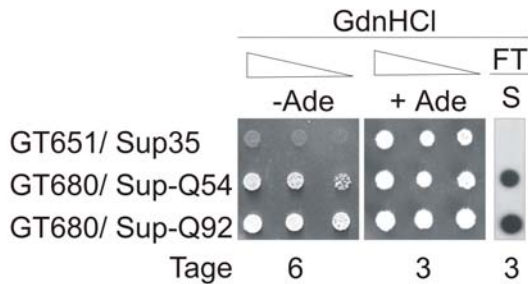


Abbildung 57: Charakterisierung von GT680-Zellen mit Sup-Htt Fusionsproteinen nach einer GdnHCl-Behandlung. Die angezeigten Zellen wurden dreimal auf 5 mM GdnHCl-haltigem YPD-Medium ausgestrichen und dann in Verdünnungsreihen auf SD-Ade und SD+Ade Medium gestempelt und für die angegebenen Zeiten inkubiert. Für den Filtertest (FT) wurden die mit GdnHCl behandelten Zellen für 3 Tage in flüssigem Medium angezogen. Nach Filtration wurden die Aggregate mit dem anti-Sup (S) Antikörper detektiert.

3.1.17. Induktion von $[PIN^+]$ / $[PSI^+]$ durch Expression von Rnq-Htt Fusionsproteinen

Neben Sup35 gibt es noch weitere Proteine wie z.B. Ure2 oder Rnq1, deren unlösliche Formen $[URE3]$ bzw. $[PIN^+]$ Hefeprionen darstellen. Um zu prüfen, ob Hefeprionen generell durch Erhöhung der Aggregationsfähigkeit ihres löslichen Proteins entstehen, wurden verschiedene Fusionsproteine bestehend aus Rnq1 und Htt-Exon1 Fragmenten hergestellt. Die einzelnen Proteine sind in der Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Struktur der Rnq-Htt Proteine

Plasmid	Protein	Schematische Darstellung
pYex2T/L		
pYex2T/L-RNQ1	Rnq1	NT Q/N
pYex2T/L-RNQ-CAG19	Rnq-Q19	NT Q/N
pYex2T/L-RNQ-CAG54	Rnq-Q54	NT Q/N
pYex2T/L-RNQ-CAG91	Rnq-Q91	NT Q/N

NT: N-terminale Domäne von Rnq1 (As 1-152); Q/N: Prion Domäne von Rnq1 (As 153-405); Rotes Segment: Htt-Exon1 Fragment (As 1-44) mit 19 (I), 54 (II) und 91 (III) Glutaminen.

Bei aggregiertem Rnq1 Protein weisen Hefezellen den $[PIN^+]$ -Phänotyp auf. Da $[PIN^+]$ -Zellen keinen selektierbaren Wachstumsphänotyp ausbilden, wurde der Ade^+ -Phänotyp, der bei $[PSI^+]$ Induktion auftritt, als Reportersystem benutzt (Abbildung 58). Bei Überexpression von Sup35 bilden $[psi^-][pin^-]$ -Zellen kaum Ade^+ -Kolonien (vgl. Abbildung 35), während $[psi^-][PIN^+]$ -Zellen mit hoher Effizienz zu $[PSI^+]$ konvertieren (Derkatch et al., 2001; Derkatch et al., 1997; Osherovich and Weissman, 2001). Falls die Aggregation von Rnq1 durch die Expression von aggregierenden Rnq-Htt Fusionsproteinen in $[psi^-][pin^-]$ -Zellen stimuliert wird, sollten diese Zellen zu $[psi^-][PIN^+]$ konvertieren. Bei Überexpression von Sup35 sollten diese $[psi^-][PIN^+]$ -Zellen zu $[PSI^+][PIN^+]$ -Zellen konvertieren und auf SD-Ade Medium wachsen.

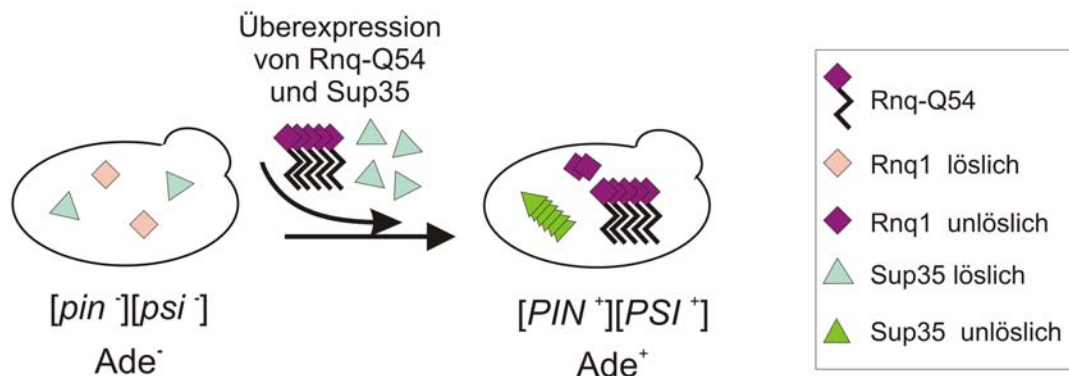


Abbildung 58: Schematische Darstellung der Induktion von $[PIN^+][PSI^+]$ aufgrund der Überexpression von aggregierenden Rnq-Htt Fusionsproteinen und Sup35 in $[psi^-][pin^-]$ -Zellen.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die in der Tabelle 10 aufgelisteten Plasmide zusammen mit pGADYex-Sup35 in GT17-Zellen ($[psi^-][pin^-]$) transformiert. Die Transformanten wurden dann auf SD-Ade und SD+Ade Medium gestempelt, um die Suppression des Nonsense-Codons im *ade1-14* Gen zu detektieren. Nach 12 Tagen Inkubation wuchsen nur Zellen mit Sup35/Rnq-Q54 oder Sup35/Rnq-Q91 auf SD-Ade Medium. Die ermittelten Konversionsraten zeigen, dass die GT17-Zellen mit Sup35/Rnq-Q54 oder Sup35/Rnq-Q91 ca. 2200 bzw. 2600 mal mehr Ade^+ -Kolonien bildeten als die Kontrollzellen mit Sup35 und dem Vektor pYex2T. Im Filtertest wurden in Lysaten von Zellen, die Sup35/Rnq-Q54 oder Sup35/Rnq-Q91 exprimierten, SDS-stabile Rnq1-, Sup35- sowie Htt-Aggregate detektiert (Abbildung 59). Rnq-Htt

Aggregate stimulieren also die Aggregation von Sup35, wodurch der $[PSI^+]$ -Phänotyp entsteht. Diese Ergebnisse zeigen, dass durch die Expression der Fusionsproteine Rnq-Q54 oder Rnq-Q91 der Prionenphänotyp $[PIN^+]$ *de novo* induziert wird.

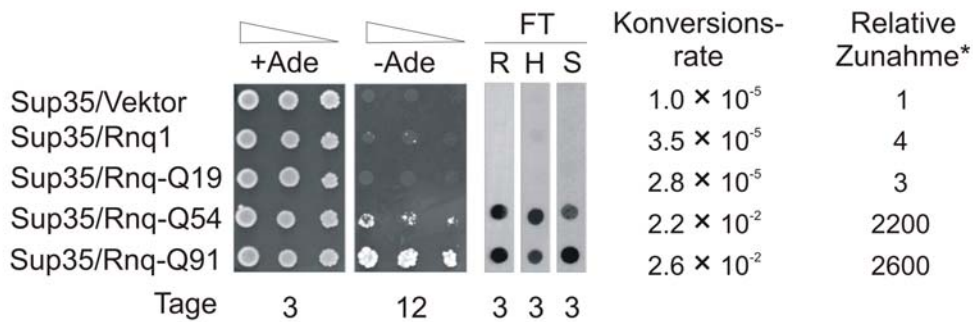


Abbildung 59: Induktion von $[PIN^+][PSI^+]$ durch Coexpression von aggregierenden Rnq-Htt Fusionsproteinen und Sup35. In GT17-Zellen ($[psi^-][pin^-]$) wurden die angezeigten Proteine überexprimiert. Diese Zellen wurden in Verdünnungsreihen auf SD-Ade und SD+Ade Medium gestempelt und für die angegebenen Zeitspannen inkubiert. Für den Filtertest (FT) wurden die Zellen für 3 Tage in flüssigem Medium angezogen. Nach Filtration wurden die SDS-stabilen Aggregate mit den anti-Rnq (R), anti-Sup (S) und anti-Htt (H) Antikörpern detektiert. Die Konversionsraten wurden wie auf Seite 158 beschrieben in 3 unabhängigen Experimenten ermittelt. *Relative Zunahme der gebildeten Ade⁺-Kolonien bezogen auf GT17-Zellen mit den Kontrollplasmiden pYex2T und pGADYex-Sup35.

Um zu kontrollieren, ob GT17-Zellen bei Überexpression von aggregierenden Rnq-Htt Fusionsproteinen und Sup35 wirklich zu $[PIN^+][PSI^+]$ konvertieren, wurde die Löslichkeit von Rnq1 und Sup35 durch Zentrifugationsexperimente untersucht. Die Pellet- und Überstandsfraktionen von GT17-Zellen, die Sup35/Rnq1, Sup35/Rnq-Q19, Sup35/Rnq-Q54 oder Sup35/Rnq-Q91 coexprimierten, wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Westernblotting analysiert. Bei GT17-Zellen, die Sup35/Rnq1 oder Sup35/Rnq-Q19 synthetisierten, waren die Proteine, die mit den anti-Rnq und anti-Sup Antikörpern detektiert wurden, löslich. Dagegen wurden die Proteine Rnq-Htt, Rnq1 und Sup35 in Zellen, die Sup35/Rnq-Q54 oder Sup35/Rnq-Q91 exprimierten, in der Pelletfraktion nachgewiesen (Abbildung 60). Dieses Ergebnis bestätigt, dass durch Coexpression von aggregierenden Rnq-Htt

Fusionsproteinen mit Sup35 die Konversion von $[psi^-][pin^-]$ zu $[PIN^+][PSI^+]$ induziert werden kann.

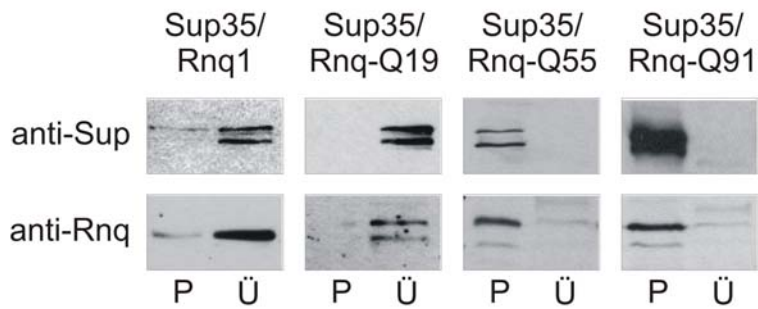


Abbildung 60: Löslichkeit der Proteine Rnq1, Sup35, Rnq-Q19, Rnq-Q55 und Rnq-Q91. Die Lysate von GT17-Zellen, die die angegebenen Proteine exprimierten, wurden für 30 min bei 50 000 g zentrifugiert. Je 25 µg Gesamtprotein von den Pellet (P)- und Überstandsfractionen (Ü) wurden über SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Die Rnq-Htt Proteine und endogenes Rnq1 wurden mit dem anti-Rnq Antikörper und Sup35 mit dem anti-Sup Antikörper detektiert.

3.2. Diskussion

Proteine, die in *Saccharomyces cerevisiae* Prionen bilden können, existieren in mindestens zwei stabilen, ineinander überführbaren Konformationen. Entweder sind sie normal gefaltet und damit löslich oder sie liegen in einer aggregierten Form, der Prionenform, vor und sind unlöslich. Der molekulare Mechanismus, der zur *de novo* Entstehung von Hefeprionen führt, ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Bekannt ist, dass die spontane Entstehung eines Prions durch die Gegenwart eines anderen Prions stark begünstigt wird. Für die spontane Entstehung des Hefeprions $[PSI^+]$ ist sogar die Anwesenheit eines anderen Prions wie z.B. die von $[PIN^+]$ erforderlich (Derkatch et al., 2001; Osherovich and Weissman, 2001).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass $[PSI^+]$ auch in Abwesenheit von $[PIN^+]$ *de novo* entstehen kann. Dafür wurden Zellen des $[psi^-][pin^-]$ Hefestammes GT17, der eine Nonsense-Mutation im *ade1-14* Gen trägt, verwendet. Bei diesen Zellen ist der $[PSI^+]$ -Phänotyp mit einem Ade^+ -Wachstumsphänotyp assoziiert, d.h. nach einer Konversion können die $[PSI^+]$ -Zellen auf SD-*Ade* Medium wachsen. Um $[PSI^+]$ zu induzieren, wurden Fusionsproteine bestehend aus Sup35 und Htt-Exon1 Fragmenten mit 54 oder 92 Glutaminen in GT17-Zellen exprimiert. Da Htt-Exon1 Fragmente mit überlangen Polyglutaminsequenzen in Hefezellen aggregieren (Krobitsch and Lindquist, 2000; Muchowski et al., 2000), war zu erwarten, dass auch Sup-Htt Fusionsproteine mit überlangen Polyglutaminsequenzen von sich aus Aggregate bilden. Tatsächlich wurden SDS-stabile Sup-Htt Aggregate in GT17-Zellen mit den Proteinen Sup-Q54 und Sup-Q92 detektiert. Außerdem bildeten diese Zellen Ade^+ -Kolonien, was auf die Induktion von $[PSI^+]$ hinweist (Abbildung 35).

Die Induktion von $[PSI^+]$ in $[psi^-][pin^-]$ Zellen erfordert nicht nur die Aggregation der rekombinanten Sup-Htt Proteine, sondern auch die von endogenem Sup35, da bereits geringe Mengen an löslichem Sup35 zu einer korrekten Translationstermination führen und somit den $[PSI^+]$ -Phänotyp unterdrücken (Patino et al., 1996; Salnikova et al., 2005). Daher muss endogenes Sup35 durch Sup-Htt Aggregate vom löslichen in den unlöslichen Zustand überführt worden sein. Zentrifugationsexperimente

bestätigten, dass endogenes Sup35 in Zellen mit Sup-Q54 unlöslich ist (Abbildungen 39). Diese Ergebnisse zeigen, dass [*PSI*⁺] auch in Abwesenheit von [*PIN*⁺] spontan entstehen kann, wenn die Aggregation von Sup35 stimuliert wird.

Der Mechanismus, der der Aggregation von Sup-Q54 zugrunde liegt, ähnelt vermutlich dem von Htt und Sup35. Sowohl Htt-Exon1 Fragmente mit einer verlängerten Polyglutaminsequenz als auch unlösliches Sup35 bilden β -Faltblattstrukturen aus und beide Proteine aggregieren wahrscheinlich durch Ausbildung von „polaren Zippern“ (Balbirnie et al., 2001; Perutz et al., 1994; Perutz et al., 2002). Da Sup35 in [*psi*⁻][*pin*⁻] Zellen von sich aus nicht aggregieren kann, liegt vermutlich zunächst nur die Polyglutaminsequenzen von Sup-Q54 als β -Faltblattstrukturen vor. Diese könnten als „polare Zipper“ die intermolekulare Assoziation von Sup-Q54 Proteinen begünstigen. Wahrscheinlich wird dadurch auch die Bildung von β -Faltblattstrukturen in Sup35 gefördert, sodass es zur Ausbildung von Fibrillen und schließlich von Sup-Q54 Aggregaten kommt. Da endogenes Sup35 direkt an rekombinantes Sup-Q54 bindet (Abbildungen 41), ist anzunehmen, dass endogenes Sup35 über homologes „Seeding“ in den unlöslichen Zustand überführt wird, wobei aggregiertes Sup-Q54 als Aggregationskeim dient. Zusätzlich könnte die Aggregation von endogenem Sup35 auch noch durch die Polyglutaminsequenzen über heterologes „Seeding“ gefördert werden.

In [*psi*⁻][*pin*⁻]-Zellen wurde der [*PSI*⁺]-Phänotyp sowohl durch die Expression von Sup-Q54 als auch von Sup-Q92 induziert. Bei Expression von Sup-Q92 konvertierten jedoch mehr Zellen zu [*PSI*⁺] als bei Expression von Sup-Q54. Folglich korrelierte die Länge der Polyglutaminsequenz des Sup-Htt Fusionsproteins mit der Frequenz der Entstehung von [*PSI*⁺] (Abbildung 35). Interessanterweise wurde der [*PSI*⁺]-Phänotyp nicht nur durch Expression von Sup-Htt, sondern auch, und sogar mit einer ca. 10-fach höheren Frequenz, durch Expression der vergleichbaren PrD-Htt Fusionsproteine (PrD-Q54 oder PrD-Q92) erzeugt. Neben einer höheren Konversionsrate wurde darüber hinaus eine schnellere Ausprägung des [*PSI*⁺]-Phänotyps bei Expression der PrD-Htt Fusionsproteine beobachtet. Zudem bildeten Zellen mit PrD-Q54 oder PrD-Q92 früher SDS-resistente Aggregate als Zellen mit Sup-Q54 bzw. Sup-Q92 (Abbildung 36). Auch bei Expression der PrD-Htt Fusionsproteine korrelierte die Länge der Polyglutaminsequenz mit der Frequenz der [*PSI*⁺]-Induktion. Durch

in vitro Aggregationsstudien wurde gezeigt, dass eine direkte Abhängigkeit zwischen der Aggregationsrate und der Länge der Polyglutaminsequenz der PrD-Htt Fusionsproteine besteht. PrD-Q92 bildete früher SDS-resistente Aggregate und konvertierte früher lösliches His-Sup35 als PrD-Q54 (Abbildung 42 und 44). Folglich korreliert die Effizienz der Aggregation der PrD-Htt bzw. Sup35-Htt Fusionsproteine mit der Effizienz der $[PSI^+]$ -Induktion. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Sup-Htt bzw. PrD-Htt Aggregate für eine $[PIN^+]$ -unabhängige *de novo* Entstehung von $[PSI^+]$ verantwortlich sind.

In der Literatur ist ein PrD-Fragment beschrieben, das C-terminal 16 zusätzliche Aminosäuren aufweist und das bei Überexpression in $[psi^-][pin^-]$ Zellen $[PSI^+]$ induzieren kann (Derkatch et al., 2000). Da dieses PrD-Fragment nicht weiter charakterisiert wurde, ist nicht klar, wodurch Sup35 letztendlich konvertiert wurde. Möglicherweise kann es aufgrund seiner zusätzlichen 16 Aminosäuren besser aggregieren als PrD und somit die Aggregation von endogenem Sup35 initiieren.

Zur Zeit werden zwei Modelle diskutiert, die erklären, wie existierende Prionen die *de novo* Entstehung anderer Prionen fördern. Beim „Cross-Seeding“-Modell wird davon ausgegangen, dass vorhandene Prionen als Aggregationskeime fungieren. Diese Keime initiieren über heterologes „Seeding“ die Aggregation eines löslichen Prionenäquivalents, das so in seine Prionenform überführt wird. Beim „Inhibitor“-Modell wird angenommen, dass ein Molekül, möglicherweise ein Chaperon, die Aggregation von löslichen Prionenäquivalenten inhibiert. Existierende Prionen könnten diesen Inhibitor inaktivieren, sodass der Aggregationsprozess des Prionenäquivalents ungehindert ablaufen kann (Derkatch et al., 2001; Osherovich and Weissman, 2001; Osherovich and Weissman, 2002). Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Aggregationsversuche mit den aus *E. coli* aufgereinigten Proteinen His-Sup35, PrD-Q55 sowie PrD-Q89 wurde gezeigt, dass lösliches His-Sup35 Protein allein aufgrund der Aggregation von PrD-Q55 oder PrD-Q89 in den unlöslichen Zustand überführt werden kann (Abbildung 44). Da bei diesen *in vitro* Experimenten die Gegenwart eines spezifischen Aggregationsinhibitors unwahrscheinlich ist, unterstützen diese Ergebnisse das „Cross-Seeding“-Modell für die Initiation der Prionenaggregation.

In der Studie von Derkatch *et al.* wurde gezeigt, dass $[PSI^+]$ in $[psi^-][pin^-]$ Zellen durch Coexpression von N-terminalem Sup35 (NM-Domäne) und aggregationsfähigem Htt-Exon1 Fragmenten induziert werden kann (Derkatch *et al.*, 2004). Auch in der hier vorliegenden Arbeit wurde der $[PSI^+]$ -Phänotyp durch Coexpression von Sup35/Q90 oder PrD/Q90 in $[psi^-][pin^-]$ -Zellen hervorgerufen. Auffällig war jedoch, dass bei Expression dieser Proteinpaare eine längere Inkubationszeit zur Bildung von Ade⁺-Kolonien benötigt wurde und weniger Zellen zu $[PSI^+]$ konvertierten als bei Expression der entsprechenden Fusionsproteine (Abbildung 45). So wurden z.B. bei der Expression von PrD-Q92 150 mal mehr $[PSI^+]$ -Zellen detektiert als bei der Coexpression von PrD/Q90, die zudem 9 Tage früher Ade⁺-Kolonien bildeten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Sup-Q92 oder PrD-Q92 Aggregate bessere Keime für die Initiation der Aggregation von endogenem Sup35 sind als Q90-Aggregate. Im Einklang damit wurde gezeigt, dass die Aggregation von löslichem N-terminalen Sup35 (NM-Domäne) effizienter durch den Zusatz von Sup-NM- als von Rnq1-Aggregaten gefördert wird (Derkatch *et al.*, 2004), sich also homologe Keime besser für die Stimulierung der Sup35-Aggregation eignen als heterologe Keime.

Ein entscheidender Faktor für die *de novo* Entstehung von $[PSI^+]$ ist die Überexpression von Sup35, d.h. für die Entstehung von Sup35-Aggregaten ist eine hohe Proteinkonzentration erforderlich (Derkatch *et al.*, 1997). Da auch die Bildung von Htt-Aggregaten konzentrationsabhängig ist, wurde untersucht, ob die $[PSI^+]$ Induktion von der Konzentration der Sup-Htt Fusionsproteine beeinflusst wird. Bei Expression geringer Mengen von Sup-Q54 oder Sup-Q92 in GT17-Zellen wurden weder SDS-stabile Aggregate noch Ade⁺-Kolonien detektiert. Bei Expression geringer Mengen der Proteine PrD-Q54 oder PrD-Q92 in GT17-Zellen konnten SDS-stabile Aggregate und eine Konversion zu $[PSI^+]$ nachgewiesen werden (Abbildung 46). Dabei war die zur Ausbildung von Ade⁺-Kolonien benötigte Inkubationszeit deutlich länger und die Konversionsraten waren deutlich geringer als bei Überexpression derselben Proteine. Folglich ist die spontane Entstehung von $[PSI^+]$ abhängig von der Konzentration der Fusionsproteine. Die zur Induktion von $[PSI^+]$ erforderliche kritische Proteinmenge ist dabei umso geringer, je besser ein Sup-Htt oder PrD-Htt Fusionsprotein aggregiert.

Die „Protein only“ Hypothese (vgl. Seite 13) wurde durch zwei kürzlich veröffentlichte Studien untermauert, in denen es erstmals gelang, den $[PSI^+]$ -Phänotyp durch Transformation von Hefezellen mit *in vitro* aus N-terminalen Sup35 Fragmenten (Sup-NM) generierten Amyloiden hervorzurufen (King and Diaz-Avalos, 2004; Tanaka et al., 2004). Auch das scheinbar im Widerspruch zur „Protein only“-Hypothese stehende Phänomen, dass ein Prion unterschiedliche Prionenphänotypen erzeugen kann, konnte durch diese Studien erklärt werden. Strukturanalysen zeigten nämlich, dass die unterschiedlichen $[PSI^+]$ -Prionenphänotypen durch Sup35-Fibrillen unterschiedlicher Konformationen verursacht werden. Auch die Ergebnisse dieser Arbeit stehen im Einklang mit der „Protein only“ Hypothese, da das Prion $[PSI^+]$ einzig durch die Modifikation des Sup35-Proteins und somit unabhängig von jeglichen anderen äußeren Einflüssen induziert werden konnte.

Für die *de novo* Entstehung von $[PSI^+]$ ist eine physiologische Konzentration des Chaperons Hsp104 erforderlich (Chernoff et al., 1995; Patino et al., 1996). Es wurde daher überprüft, ob auch die durch Expression von Sup-Htt Fusionsproteinen hervorgerufene $[PSI^+]$ Induktion von der Hsp104-Konzentration abhängig ist. Bei Expression von Sup-Q54 oder Sup-Q92 in $[psi^-][pin^-]$ Zellen mit einer chromosomalen *hsp104* Deletion (OT78-Zellen) wurden SDS-stabile Aggregate aber keine Ade⁺-Kolonien gebildet (Abbildung 47). Da in OT78-Zellen mit Sup-Q54 endogenes Sup35 größtenteils unlöslich war, kann davon ausgegangen werden, dass die Sup-Q54 Aggregate auch in Abwesenheit von Hsp104 die Konversion von endogenem Sup35 fördern (Abbildung 48). In Zellen ohne Hsp104 ist jedoch auch eine geringe Menge von endogenem Sup35 sowie von Sup-Q54 löslich, die ausreichend für eine Unterdrückung des $[PSI^+]$ -Phänotyps ist. Bei Überexpression von Hsp104 in GT17-Zellen mit Sup-Q54 oder Sup-Q92 wurden SDS-stabile Aggregate aber nur vereinzelt $[PSI^+]$ -Konvertanten detektiert (Abbildung 47). Bei Zentrifugationsexperimente zeigte sich, dass endogenes Sup35 in GT17-Zellen, die Sup-Q54 und Hsp104 überexprimieren, nicht vollständig in den unlöslichen Zustand konvertierte (Abbildung 48). Somit werden also sowohl bei Eliminierung als auch bei Überexpression von Hsp104 SDS-stabile Sup35-Htt Aggregate gebildet, durch die auch endogenes Sup35 in der unlöslichen Zustand überführt wird. Da diese Konversion in Abwesenheit von Hsp104 aber nicht vollständig ist und somit geringe Mengen an löslichem endogenen Sup35 vorhanden sind, können die Zellen trotz der Akkumulierung von Aggregaten nicht auf

SD-Ade Medium wachsen. In [*psi*⁻][*pin*⁻] Zellen ohne Sup-Htt Fusionsproteine ist eine Konversion von Sup35 in Abwesenheit von Hsp104 nicht möglich, da Hsp104 vermutlich aktiv am Aggregationsprozess von Sup35 durch die Stabilisierung oligomerer Strukturen beteiligt ist (Shorter and Lindquist, 2004). Es ist anzunehmen, dass die Sup-Htt Aggregate als Aggregationskeime eine Hsp104-unabhängige Konversion von endogenem Sup35 ermöglichen. Jedoch ist Anwesenheit von Hsp104 wahrscheinlich erforderlich, um eine vollständige Aggregation von endogenem Sup35 zu gewährleisten. Ein Überschuss von Hsp104 auf der anderen Seite führt wahrscheinlich zur teilweisen Solubilisierung vorhandener Aggregate und so zu einem konstanten geringen Level an löslichem Sup35.

Ein wichtige Eigenschaft von Hefeprionen ist ihre Reversibilität, d.h. sie können vom löslichen in den unlöslichen oder umgekehrt vom unlöslichen in den löslichen Zustand überführt werden (Shorter and Lindquist, 2005; Wickner et al., 2004). Daher wurde untersucht, ob der [*PSI*⁺]-Phänotyp in bereits mit Sup-Q54 konvertierten [*PSI*⁺][*pin*⁻] Zellen durch Überexpression von Hsp104, einer klassischen Methode zur Heilung von [*PSI*⁺], eliminiert werden kann. Die entsprechenden Zellen bildeten SDS-resistente Aggregate und vereinzelte Ade⁺-Kolonien aus, d.h. der [*PSI*⁺]-Phänotyp konnte durch Überexpression von Hsp104 deutlich reduziert, aber nicht vollständig eliminiert werden (Abbildung 49). Erstaunlicherweise wurden auch in den [*PSI*⁺][*PIN*⁺] Kontrollzellen, die Sup35 und Hsp104 überexprimieren, Aggregate detektiert. Diese Zellen zeigten aber kein Wachstum auf SD-Ade Medium. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass bei Überexpression von Hsp104 in [*PSI*⁺] Zellen die Sup35 bzw. die Sup35-Htt Aggregate nicht vollständig aufgelöst werden oder aber die Bildung neuer Aggregate nicht vollständig unterdrückt wird. Dennoch wird genügend lösliches Sup35 generiert, um den [*PSI*⁺]-Phänotyp zu unterdrücken. Wie bereits in der Literatur beschrieben, entsteht durch Überexpression von Hsp104 vermutlich ein Ungleichgewicht zwischen Sup35 und Hsp104, wodurch der Aggregationsprozess von Sup35 gestört wird (Chernoff et al., 1995; Kryndushkin et al., 2003; Patino et al., 1996; Wegrzyn et al., 2001).

Interessanterweise verlieren konvertierte [*PSI*⁺][*pin*⁻] Zellen mit Sup-Q54 durch eine GdnHCl Behandlung nicht den [*PSI*⁺]-Phänotyp. Bei einer solchen Behandlung wird normalerweise die Vermehrung bzw. die Vererbung von [*PSI*⁺] blockiert, was

vermutlich auf eine Inaktivierung von Hsp104 durch GdnHCl zurückzuführen ist (Eaglestone et al., 2000; Ferreira et al., 2001; Grimminger et al., 2004; Ness et al., 2002). Im Prinzip werden bei einer GdnHCl-Behandlung über mehrmalige Kolonie-Vereinzlungen auf GdnHCl-haltigem Medium Zellen erzeugt, die keine Sup35-Aggregate mehr enthalten. Neben [*PSI*⁺] werden auch [*PIN*⁺] und [*URE3*] durch eine GdnHCl-Behandlung eliminiert (Derkatch et al., 1997; Ripaud et al., 2003). Eine GdnHCl-Behandlung ist nur temporär, d.h. Zellen, die nach einer solchen Behandlung auf Medium ohne Zusatz von GdnHCl angezogen werden, synthetisieren wieder aktives Hsp104. Daher ist es denkbar, dass die durch Sup-Q54 konvertierten Zellen zwar durch GdnHCl geheilt werden, der [*PSI*⁺]-Phänotyp aber auf GdnHCl-freiem Medium sofort wieder *de novo* induziert wird.

Ein stabiler Prionenphänotyp muss von der Mutter- auf die Tochterzelle vererbt werden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Sup-Htt Aggregate essentiell für die Induktion von [*PSI*⁺] sind, aber die Vererbung von [*PSI*⁺] unabhängig von diesen Aggregaten erfolgt (Abbildung 61). Der Prionenphänotyp wurde nach der Entfernung der Sup-Htt oder PrD-Htt Aggregate aus den Konvertanten stabil über mehrere Generationen hinweg weitervererbt (Abbildung 51). Diese Zellen bildeten außerdem weiterhin SDS-stabile Sup35-Aggregate (Abbildung 52). Die Sup-Htt Aggregate verhalten sich demnach äquivalent zu [*PIN*⁺], denn auch die [*PIN*⁺] zugrundeliegenden Aggregate werden nur für die Induktion, nicht aber für die Vererbung von [*PSI*⁺] benötigt (Derkatch et al., 2000; Derkatch et al., 1997). Interessanterweise konnte der [*PSI*⁺]-Phänotyp nach Verlust der Sup-Htt Aggregate durch eine anschließende GdnHCl-Behandlung eliminiert werden, d.h. die Zellen verhielten sich bei der Heilung wieder wie „normale“ [*PSI*⁺][*PIN*⁺] Zellen. Dieses Phänomen ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass in diesem Fall kein aggregierendes Sup-Htt Fusionsprotein synthetisiert wurde, das die *de novo* Entstehung von [*PSI*⁺] hätte induzieren können. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Aggregate für die Replikation von Prionen essentiell sind und unterstützen somit das “Seed-nucleation“-Modell (vgl. Seite 14) für die Prionenreplikation (Jarrett and Lansbury Jr, 1993).

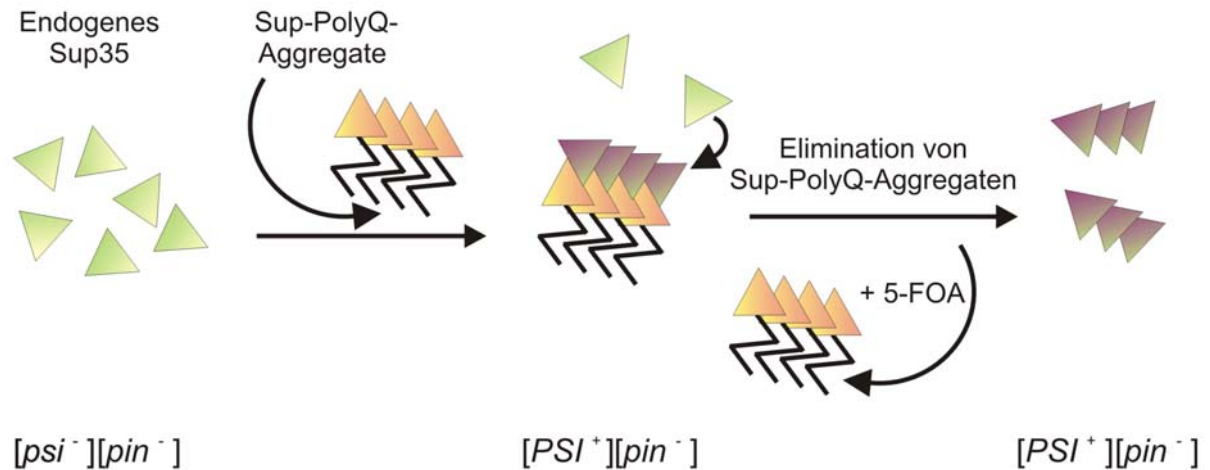


Abbildung 61: Modell für die *de novo* Entstehung von $[PSI^+]$ in Gegenwart von Sup-Htt Aggregaten. Bei Überexpression von Sup-Htt Fusionsproteinen wie z.B. Sup-Q54 in $[psi^-][pin^-]$ Zellen entstehen Sup-Htt Aggregate aufgrund von überlangen Polyglutaminsequenzen. Dabei lagern sich die von den Polyglutaminen gebildeten β -Faltblattstrukturen, in der Zeichnung durch Zick-Zack-Linien symbolisiert, aneinander an. Die Stabilität dieser Anordnung wird durch Wasserstoffbrückenbindungen gewährleistet. Die Sup-Htt Aggregate dienen als Keime für die Initiation der Aggregation von endogenem Sup35. Nach vollständiger Aggregation steht der Hefezelle kein lösliches und damit kein funktionelles Sup35 mehr zur Verfügung, d.h. sie konvertiert zu $[PSI^+][pin^-]$. Die Sup-Htt Aggregate sind essentiell für die Induktion, nicht aber für die Erhaltung des $[PSI^+]$ -Phänotyps, denn $[PSI^+]$ wird nach Eliminierung der Sup-Htt Aggregate durch 5-FOA-Behandlung über mehrere Generationen hinweg von der Mutter- auf die Tochterzelle weitervererbt.

Das Hefeprotein New1 wurde aufgrund seiner Sequenzhomologie zu PrD identifiziert. Sein N-Terminus weist ähnlich wie die PrD von Sup35 Oligorepeats und N/Q-reiche Abschnitte auf. Wie Sup35 oder Rnq1 kann auch New1 aggregieren und als ein PSI-induzierender Faktor agieren. Bislang wurde aber noch kein eigenständiger, mit New1 assoziierter Prionenphänotyp identifiziert (Santoso et al., 2000; Shorter and Lindquist, 2005). Ein Fusionsprotein bestehend aus der aggregierenden N-terminalen Domäne von New1 (As 1-153) und der funktionell essentiellen C-terminalen Domäne von Sup35 (As 254-685) erzeugt den künstlichen Prionenphänotyp $[NU^+]$. $[NU^+]$ -Zellen enthalten das unlösliche Fusionsprotein, bilden Ade^+ -Kolonien und sind auch wieder in $[nu^-]$ überführbar (Osheroich and Weissman, 2001). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Sup-Q54 oder Sup-Q92 in Abwesenheit von endogenem Sup35 ebenso wie das New1-Sup35 Fusionsprotein einen künstlichen Prionenphänotyp in Hefezellen hervorrufen können. $[psi^-][pin^-]$ Zellen ohne

endogenes Sup35 aber mit exogen exprimiertem Sup-Q54 oder Sup-Q92 waren lebensfähig, d.h. Sup35 konnte funktionell durch die Sup-Htt Fusionsproteinen ersetzt werden. Diese Zellen bildeten sowohl SDS-stabile Aggregate als auch Ade⁺-Kolonien aus (Abbildung 55). Jedoch konnten Sup-Q54 bzw. Sup-Q92 weder durch Eliminierung von Hsp104 noch durch eine GdnHCl-Behandlung in einen stabilen löslichen Zustand überführt werden (Abbildung 56 und 57). Somit induzieren diese beiden Proteine keinen künstlichen Hefeprionenphänotyp.

Ähnlich wie [*PSI*⁺] konnte ein weiteres Hefeprion, nämlich [*PIN*⁺], durch Fusion des entsprechenden löslichen Prionenäquivalentes Rnq1 mit Htt-Exon1 Fragmenten *de novo* erzeugt werden. Vermutlich können demnach Hefeprionen generell durch „Polyglutamin-Tagging“ der entsprechenden Proteine *de novo* und unabhängig von anderen Prionen induziert werden. Möglicherweise gilt dies auch für Prionen von Säugetieren. Es wäre interessant zu überprüfen, ob durch die Expression von aggregierenden PrP-Htt Fusionsproteinen in einer Maus die für Prionenerkrankungen typischen Symptome induziert werden können. Bis jetzt existieren für tierische und menschliche Prionenerkrankungen lediglich Mausmodelle, bei denen der PrP-Phänotyp durch eine direkte Injektion von Prionenmaterial in das Tier induziert wird (Castilla et al., 2005; Legname et al., 2004). Eine PrP-PolyQ Maus mit induzierbarem Prionenphänotyp könnte eine große Bereicherung für die Identifizierung potentieller Wirkstoffe zur Behandlung von Prionenerkrankungen darstellen.

Darüber hinaus könnte die Strategie des „Polyglutamin-Tagging“ allgemein dafür genutzt werden, gezielt zu untersuchen, inwieweit die Aggregation bestimmter Proteine ihre Funktion beeinflusst. Seit kurzem häufen sich experimentelle Daten, dass eukaryotische Proteine wie z.B. Snf4, Swi1, CPEB und TIA1 potentielle Prionen sind (Shorter and Lindquist, 2005). Der Wechsel zwischen löslichem und unlöslichem Zustand kann vom Verlust der ursprünglichen Funktion begleitet sein. So führt z.B. die Aggregation der Hefeproteine Sup35 und Ure2 zur sterischen Blockierung ihrer aktiven Zentren (Baxa et al., 2002). Der Prionenstatus kann aber auch das Funktionsspektrum eines Proteins erweitern (True et al., 2004; True and Lindquist, 2000; Wickner et al., 2004). Das CPEB-Protein des Seehasen *Aplysia* ist beispielsweise nur in seiner aggregierten Form aktiv. In diesem Zustand aktiviert es in stimulierten Synapsen die Translation von spezifischen mRNAs, wodurch das synaptische

Wachstum gefördert wird (Si et al., 2003a). In der Hefe verhält sich CPEB wie ein klassisches Prion, d.h. es existiert ein löslicher und ein unlöslicher Zustand, die beide ineinander überführbar sind. Zudem wird es cytoplasmatisch vererbt (Si et al., 2003b). In der Literatur wird diskutiert, ob die Eigenschaft einiger Proteine, unter bestimmten Bedingungen stabil in einem löslichen bzw. unlöslichen Zustand vorzuliegen und somit entweder funktionell aktiv oder inaktiv zu sein, ein allgemeiner Mechanismus ist, um die Funktion von Proteinen zu steuern (Shorter and Lindquist, 2005; Wickner et al., 2004). Die Polyglutamin-gesteuerte Aggregation von Proteinen kann in Zukunft dafür genutzt werden, um gezielt den unlöslichen Zustand von potentiellen Prionen zu induzieren, wodurch dann deren Funktion im Detail untersucht werden kann.