

**Elektrophysiologische Studien
zur Funktion des Prionproteins
an der Synapse**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
- Dr. rer. nat. -
des Fachbereichs Biologie
der Universität Bielefeld

vorgelegt von

Stefan Korte

aus Bielefeld

München und Bielefeld 2002

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	1
1 Einleitung	4
1.1 Prionerkrankungen	4
1.2 Zur physiologischen Bedeutung des Prionproteins	7
1.3 PrP als kupferbindendes Protein	11
1.4 Die posttranslationale Spaltung des Prionproteins	14
1.5 Synaptische Übertragung im Cerebellum	15
1.6 Spannungsaktivierte Kalziumkanäle	18
1.7 Zielsetzung	22
2 Material und Methoden	24
2.1 Transgene Mäuse	24
2.2 Genotypisierung von F35-Mäusen	27
2.2.1 Isolierung chromosomaler DNA aus Mausschwanzbiopsat	27
2.2.2 Genotypisierung transgener Mäuse mittels der PCR	28
2.3 Herstellung transversaler Kleinhirnschnitte	31
2.4 Cerebelläre Körnerzellkulturen	31
2.5 Elektrophysiologie	33
2.5.1 <i>Patch-clamp</i> -Elektroden	34
2.5.2 Aufbau des Messplatzes	34
2.5.3 Elektrische Eigenschaften der <i>whole-cell</i> -Konfiguration	35
2.6 Messung synaptischer Ströme an Purkinjezellen	36
2.7 Messung spannungsaktivierter Kalziumströme an Körnerzellen	39
2.8 Messprotokolle	42
2.9 Lösungen	44
2.10 Datenaufnahme und Auswertung	46
3 Ergebnisse	47
3.1 Kurzzeitplastizität an der exzitatorischen Synapse priontransgener Mäuse	47
3.1.1 Doppelpulsverstärkung als Parameter für synaptische Kurzzeitplastizität	47
3.1.2 Kurzzeitplastizität ist unabhängig vom PrP-Expressionsniveau	50

3.1.3	PPF wird nicht durch Chelierung freier Kupferionen beeinflusst	51
3.1.4	Mäuse, die aminoterminal verkürztes PrP exprimieren, zeigen normale Kurzzeitplastizität	52
3.1.5	Postsynaptische Reinsensibilisierung von PrP ^C in <i>Prnp</i> ^{0/0} -Mäuse führt zu einer Verminderung der PPF	55
3.2	Einfluss von zellulärem und rekombinantem Prionprotein auf spannungsaktivierte Kalziumkanäle	56
3.2.1	Unveränderte Kalziumleitfähigkeiten bei <i>Prnp</i> ^{0/0} -Körnerzellen	56
3.2.2	Rekombinantes Prionprotein inhibiert Ca ²⁺ -Ströme durch L-Typ-spannungsaktivierte Kanäle	60
3.2.3	Modulation der VGCCs durch recPrP ist unabhängig von der Expression des PrP ^C und der Tyrosinkinase Fyn	64
3.2.4	Der aminoterminal Bereich von PrP vermittelt die Interaktion mit L-Typ-Ca ²⁺ -Kanälen über die kupferbindende Region	66
4	Diskussion	70
4.1	Einfluss von synaptisch lokalisiertem PrP auf die exzitatorische Übertragung	70
4.2	Modulation spannungssensitiver Kalziumkanäle durch das Prionprotein	78
4.2.1	Anteil und Kinetik von L- und N-Typ-Kalziumströmen wird nicht durch die PrP ^C -Expression moduliert	78
4.2.2	L-Typ-spannungssensitive Kalziumkanäle werden durch rekombinantes PrP inhibiert	80
4.3	Hypothetisches Modell zur Rolle von PrP ^C an der exzitatorischen Synapse	84
4.4	Bedeutung der PrP ^C -PrP ^{Sc} -Konversion für die Pathophysiologie von TSEs	86
5	Zusammenfassung	89
6	Literaturverzeichnis	91
7	Publikationen	113
	Danksagung	114

Abkürzungen

A	Adenin
AMPA	engl.: <i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole proprionic acid</i>
APLP	engl.: <i>amyloid precursorlike protein</i>
AS	Aminosäure
<i>bovPrP</i>	bovines Prionprotein
bp	Basenpaare
BSE	bovine spongiforme Enzephalopathie
C	Cytosin
Ca ²⁺	Kalziumion
CAM KII	Kalzium-Calmodulin-Kinase II
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (engl.: <i>-disease</i>)
C _m	Membrankapazität
C-Terminus	Carboxyterminus
Cu ²⁺	Kupferion
CWD	chronisch zehrende Krankheit (engl.: <i>chronic wasting disease</i>)
DMEM	engl.: <i>Dulbeccos minimal essential medium</i>
DNA	Desoxyribonucleinsäure (engl.: <i>-acid</i>)
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
E	Exon
EPSC	exzitatorischer postsynaptischer Strom (engl.: <i>current</i>)
ER	endoplasmatisches Retikulum
EZL	Extrazellularlösung
FCS	Fötales Kälberserum
FFI	tödliche familiäre Insomnie (engl.: <i>fatal familiar insomnia</i>)
G	Guanin
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
GABA	γ-Aminobuttersäure (engl.: <i>-acid</i>)
GFAP	engl.: <i>glial fibrillary acidic protein</i>
GPI-Anker	Phosphatidylinositolglycolipid-Anker
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom
H	Histidin
HBSS	engl.: <i>Hank`s balanced salt solution</i>
<i>humPrP</i>	humanes Prionprotein

HVA	durch hohe Spannung aktivierbar (engl.: <i>high voltage activated</i>)
I	Intron
IP ₃	Inositol-1, 4, 5-Trisphosphat
IZL	Intrazellulärlösung
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KZS	Körnerzellschicht.
LRP	Laminin-Rezeptor-Vorläufer (engl.: <i>-precursor</i>)
LTP	Langzeitpotenzierung (engl.: <i>long term potentiation</i>)
LVA	durch niedrige Spannung aktivierbar (engl.: <i>low voltage activated</i>)
Mg ²⁺	Magnesiumion
mOsm	Milliosmol
MS	Molekularschicht
<i>mur</i> PrP	murines Prionprotein
N	Neuron
Na ⁺	Natriumion
Neo	Neomycinresistenz-Kassette
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
Npu-Maus	<i>Prnp</i> ^{0/0} -Linie
Nsk-Maus	<i>Prnp</i> ^{0/0} -Linie
N-Terminus	Aminoterminus
ORF	offener Leseramen (engl.: <i>open reading frame</i>)
P	Prolin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase-chain-reaktion</i>)
PCP	Phencyclidin
PDL	Poly-D-Lysin
PF	Parallelfasern
PK	Proteinkinase
PKC	Proteinkinase C
PL	Phospholipase
PP	<i>Patch</i> pipette
PPF	Doppelpulsverstärkung (engl.: <i>paired pulse facilitation</i>)
Prion	proteinartiges infektiöses Element (engl.: <i>proteinaceous infectious particle</i>)
<i>Prnp</i>	Prionproteingen

<i>Prnp</i> ^{0/0} -Maus	Prionprotein- <i>knock-out</i> -Maus
PrP	Prionprotein
PrP ²³⁻²³¹	volle Länge Prionprotein von Aminosäure 23-231
PrP ²³⁻¹¹²	Prionproteinfragment von Aminosäure 23-112
PrP ²³⁻⁹⁸	Prionproteinfragment von Aminosäure 23-98
PrP ⁶⁰⁻⁹¹	Prionproteinfragment von Aminosäure 60-91
PrP ¹²¹⁻²³¹	Prionproteinfragment von Aminosäure 121-231
PrP ¹⁰⁶⁻¹²⁶	Prionproteinfragment von Aminosäure 106-126
PrP ^{Δ32-93}	volle Länge Prionprotein mit Deletion von Aminosäure 32-93
PrP ^{Δ32-134}	volle Länge Prionprotein mit Deletion von Aminosäure 32-134
PrP ^C	zelluläres (engl.: <i>cellular</i>) Prionprotein
PrP ^{PRES}	proteaseresistentes Prionprotein
PrP ^{Sc}	Scrapie-Prionprotein
PZ	Purkinjezelle
Q	Glutamin
Rcm0-Maus	<i>Prnp</i> ^{0/0} -Linie
recPrP	rekombinantes Prionprotein
R _m	Membranwiderstand
R _s	Serienwiderstand
RT	Raumtemperatur
SA	Stimulusartefakt
SEM	Standardabweichung des arithmetischen Mittelwertes (engl.: <i>standard error of mean</i>)
SOD	Superoxiddismutase
SP	Stimulationspipette
T	Thymin
<i>tg</i>	Transgenallel
TME	transmissible Minkenzephalopathie
TSE	transmissible spongiforme Enzephalopathie
UV	ultraviolett
VGCC	spannungsaktivierter Kalziumkanal (engl.: <i>voltage gated calcium-channel</i>)
W	Tryptophan
Zn	Zink
ZNS	Zentrales Nervensystem
Zrch-Maus	Zürich-Maus (<i>Prnp</i> ^{0/0} -Linie)

1 Einleitung

1.1 Prionerkrankungen

Spongiforme Enzephalopathien sind beim Menschen und bei verschiedenen Tierarten beschrieben worden. Es handelt sich dabei um infektiöse, sporadisch auftretende oder vererbare Degenerationskrankheiten des ZNS, die nach einer Jahre bis Jahrzehnte dauernden Inkubationszeit chronisch progressiv und stets tödlich verlaufen. Zu den humanen Prionerkrankungen gehören die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD, engl.: *Creutzfeldt-Jakob-disease*, CREUTZFELD 1920, JAKOB 1921), Kuru (GAJDUSEK & ZIGAS 1959), das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS, GERSTMANN *et al.* 1936) und die tödliche familiäre Schlaflosigkeit (FFI, engl.: *fatal familiar insomnia*, MANETTO *et al.* 1992, MEDORI *et al.* 1992). Bei Säugetieren wurden unter anderem Scrapie bei Schafen und Ziegen (MCGOWAN 1922, DICKINSON 1976), die übertragbare Hirndegeneration der Nerze (TME, transmissible Mink Enzephalopathie, BURGER & HARTSOUGH 1965, HARTSOUGH & BURGER D 1965), die chronisch zehrende Krankheit der Hirsche (CWD, engl.: *chronic wasting disease*, WILLIAMS *et al.* 1980) und die als 'Rinderwahnsinn' bekannt gewordene bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) der Rinder beschrieben (BRADLEY 1998).

Da mittlerweile die Übertragbarkeit praktisch aller Formen der spongiformen Enzephalopathien auch über die Spezies-Grenze hinaus nachgewiesen worden ist (CUILLE & CHELLE 1936, GORDON 1946, GAJDUSEK *et al.* 1966, CHANDLER 1961), bezeichnet man diese Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen auch als transmissible spongiforme Enzephalopathien (TSE). Experimentell konnten TSE-Erreger auf eine Reihe verschiedener Spezies wie Rinder (CLARK *et al.* 1995), Ziegen und Schafe (FOSTER *et al.* 1994), verschiedene Nagerarten (CHANDLER & TURFREY 1972), Nerze (MARSH *et al.* 1991), Neu- und Altweltaffen (GIBBS *et al.* 1968, 1980), Katzen (GIBBS & GAJDUSEK 1973) sowie auf Schweine (DAWSON *et al.* 1990) übertragen werden.

Das klinische Krankheitsbild spongiformer Enzephalopathien ist geprägt durch Demenz und Verhaltensänderungen sowie Sensibilitäts- und Bewegungsstörungen. Die gesicherte Diagnose kann erst durch den histopathologischen Befund nach dem Tode gestellt werden. Hierbei zeigen sich schwammartige Aufweichungen,

Nervenzellverlust, Astrogliose und amyloide Proteinablagerungen im zentralen Nervensystem (KRETZSCHMAR 1993, KRETZSCHMAR *et al.* 1996).

Der zunächst als Virus vermutete Erreger und die unverhältnismäßig langen Inkubationszeiten prägten den Begriff ‘*slow virus disease*’ (ALPER *et al.* 1966). Ungewöhnliche Eigenschaften dieses Erregers, wie die ausgeprägte Resistenz gegen hohe Temperaturen, UV- und kurzwellige ionisierende Strahlung und die Behandlung mit nukleinsäureschädigenden Chemikalien, ließen schon früh den Schluss zu, dass es sich hierbei um eine gänzlich andere Erregerform handeln könnte (ALPER *et al.* 1967, GRIFFITH 1967), die für ihre Replikation nicht auf Nukleinsäuren angewiesen ist. 1982 wurde durch Stanley PRUSINER erstmalig der Begriff ‘*proteinaceous infectious particle*’ (abgekürzt: *prion*) eingeführt, um das potentiell infektiöse Agens von anderen bekannten Erregerformen abzugrenzen. Dies führte dann auch zu der Bezeichnung ‘Prionerkrankung’ für TSE.

In den spongiform veränderten Hirnarealen lagern sich große Mengen fibrillärer Komplexe ab, die durch aggregierte Proteine entstehen (DEARMOND *et al.* 1985). Diese Proteine weisen eine Molekularmasse von 27 - 30 kDa auf und zeichnen sich durch die partielle Resistenz gegenüber Proteasen aus (OESCH *et al.* 1985), wodurch ihre Ansammlung begünstigt wird. Aufgrund der partiellen enzymatischen Unverdaubarkeit werden diese Proteine auch als PrP^{RES} (proteaseresistente Prionproteine) oder PrP^{Sc} (Sc für Scrapie-Form des Prionproteins) bezeichnet.

Das Prionprotein wird in größeren Mengen in praktisch allen Neuronen des ZNS von Säugetieren synthetisiert (KRETZSCHMAR *et al.* 1986). Darüber hinaus ist das Prionprotein, mit Ausnahme der Leber, in den meisten Organen sowie in Gliazellen des ZNS und in geringen Mengen auch im Blut anzutreffen (MANSON *et al.* 1992, OESCH *et al.* 1985, RASCH & DIRINGER 1993, HORIUSHI *et al.* 1995). Bereits Mitte der 80er Jahre wurde als Erstes beim Hamster ein Gen entdeckt, das für das Prionprotein codiert (*Prnp*). Es stellte sich heraus, dass die Aminosäuresequenz von PrP bei den Säugetier-Spezies zu 85 bis 97 % identisch ist, was darauf schließen lässt, dass es sich um ein evolutionär hoch konserviertes Protein handelt (GABRIEL *et al.* 1992). Das physiologische Prionprotein, das als zelluläres PrP oder PrP^C bezeichnet wird, unterscheidet sich allerdings von PrP^{Sc} durch fehlende Infektiösität und seine Proteaseempfindlichkeit (OESCH *et al.* 1985). Ein weiterer Unterschied

besteht in der Tertiärstruktur dieser beiden Isoformen des Prionproteins, die ihrer Aminosäuresequenz nach völlig identisch sind (PRUSINER 1991). Die unterschiedlichen Eigenschaften von PrP^C und PrP^{Sc} dürften in ihren unterschiedlichen Konformationen begründet sein (COHEN *et al.* 1994). Im Gegensatz zum zellulären PrP, das vorwiegend Alpha-Helices (42 %) und fast keine Beta-Stränge ausbildet, liegt das pathologische PrP^{Sc} zu 43 % als Beta-Faltblatt-Struktur und nur zu etwa 30 % als Alpha-Helix vor.

Als Ursache für den infektiösen Charakter dieser Krankheiten wird angenommen, dass PrP^{Sc} beim Kontakt mit PrP^C letzteres direkt oder indirekt dazu veranlasst, seine Konformation dem PrP^{Sc} entsprechend zu verändern und somit die pathologische Isoform anzunehmen (CAUGHEY & RAYMOND 1991, PRUSINER 1991). Darauf aufbauend wurde dann die sogenannte 'Nur-Eiweiß-Hypothese' (engl.: *protein-only-hypothesis*) entwickelt, die bis heute im Allgemeinen akzeptiert ist (PRUSINER 1991). Danach besteht das infektiöse Agens ausschließlich aus Prionprotein. Die Prion-Hypothese (siehe Abbildung 1) nach PRUSINER (1996) geht davon aus, dass sich die beiden Isomere zu einem Heterodimer verbinden, das darauf hin zu einem PrP^{Sc}/PrP^{Sc}-Homodimer transformiert wird. Es folgt die neuerliche Trennung in zwei PrP^{Sc}-Monomere, die nun wiederum in der Lage sind, mit einem PrP^C-Monomer ein Heterodimer zu bilden. Die konformationell veränderten Prionproteine können multimeren Aggregate bilden, die elektronenmikroskopisch als fibrilläre Ablagerungen zu erkennen sind. Es resultiert somit eine exponentielle Vermehrung von PrP^{Sc}, das sich aufgrund seiner Resistenz und partiellen enzymatischen Unverdaubarkeit anhäuft und ablagert und zur Schädigung von Nervenzellen führen kann.

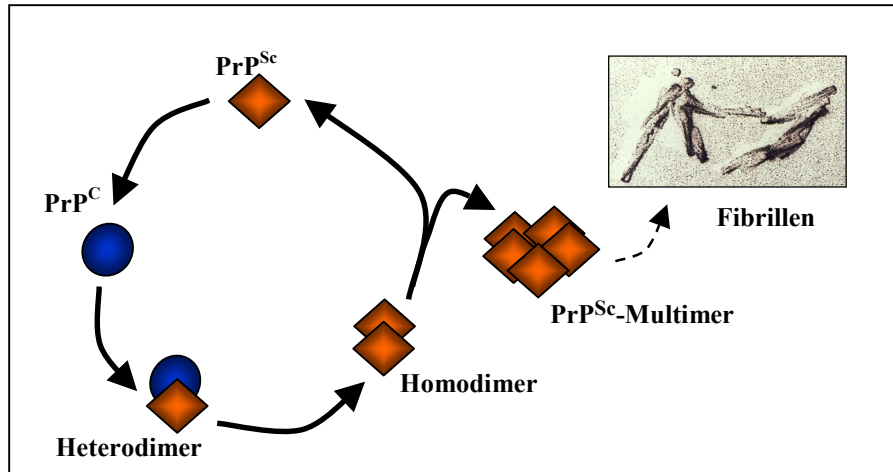


Abbildung 1: Schema der Prion-Hypothese (nach PRUSINER 1991).

PrP^{Sc} bildet mit membranständigem PrP^C ein Heterodimer, das zu einem PrP^{Sc} -Homodimer transformiert. Dieses dissoziiert in zwei PrP^{Sc} -Moleküle, die ihrerseits wieder in den Transformationsprozess einfließen können. Die Anlagerung von weiteren PrP^{Sc} -Molekülen führt zu fibrillären Ablagerungen (elektronenmikroskopisches Bild).

TELLING *et al.* (1995) nahmen an, dass für eine erfolgreiche Umwandlung von PrP^C zur pathogenetischen Isoform ein sogenanntes ‘Protein X’ beteiligt sein könnte, das mit PrP^C interagiert und seine Umformung begünstigt. An dieser Umfaltung sind möglicherweise Chaperone, wie das Hitze-Schock-Protein 60 (EDENHOFER *et al.* 1996) oder das zelluläre Chaperon BiP, beteiligt (JIN *et al.* 2000).

1.2 Zur physiologischen Bedeutung des Prionproteins

Die physiologische Bedeutung von PrP^C ist bislang noch nicht befriedigend aufgeklärt worden. Eine mögliche Funktion bei der Zellverankerung oder Signalübertragung wurde aufgrund der durch einen GPI-Anker (Phosphatidylinositolglycolipid-Anker) vermittelten Lokalisation des zellulären Prionproteins auf der Zellmembran diskutiert (STAHL *et al.* 1987). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass PrP^C nach axonalem Transport in den synaptischen Endigungen zu finden ist (BORCHELT *et al.* 1994, FOURNIER *et al.* 1995, HERMS *et al.* 1999).

Die Generierung von sogenannten *Prnp*-knock-out-Mäusen, bei denen das Gen, das für das Prionprotein codiert, deletiert wurde, ermöglichten einen ersten Ansatz zur Aufklärung der Funktion des zellulären Prionproteins. Die von BÜELER *et al.* (1992) eingeführte Mauslinie (Zürich-Maus (Zrch)) zeigte sich phänotypologisch

weitgehend unauffällig. Einzig eine Veränderung des zirkadianen Rhythmus (TOBLER *et al.* 1996), eine leicht erhöhte Anfälligkeit zu induzierter Epilepsie (WALZ *et al.* 1999) sowie eine verstärkte motorische Aktivität (ROESLER *et al.* 1999) sind bei der Zrch-Maus beschrieben worden. Kennzeichnend ist, dass diese Maus sich nicht mit Scrapie infizieren ließ, während *Prnp*-heterozygote Tiere einen verlangsamten Krankheitsverlauf zeigten. Das spricht dafür, dass die Pathologie der TSE sowohl von der Anwesenheit als auch dem Expressionsniveau von PrP^C abhängt (BÜELER *et al.* 1993). Elektrophysiologische Studien am Hippokampus dieser *knock-out*-Maus deuteten auf eine veränderte GABA-vermittelte Neurotransmission (COLLINGE *et al.* 1994) hin, wobei durch Reinsrierung des Prionproteingens der Wildtyp-Phänotyp wieder hergestellt werden konnte (WHITTINGTON *et al.* 1995). Eine Alteration der inhibitorischen synaptischen Übertragung konnte jedoch in anderen Studien nicht reproduziert werden (HERMS *et al.* 1995, LLEDO *et al.* 1996). Diese differenten Befunde waren wahrscheinlich durch die unterschiedlichen Präparationen und das Alter der Versuchstiere bedingt. So zeigten elektrophysiologische Untersuchungen an Kleinhirnschnittpräparaten von jungen Mäusen, dass die Kinetik inhibitorischer postsynaptischer Ströme tatsächlich durch den Verlust von PrP^C moduliert wird (KRETZSCHMAR *et al.* 2000). COLLINGE *et al.* (1994) beschrieben zudem eine veränderte Langzeitpotenzierung (LTP, engl.: *long term potentiation*) bei der Zrch-Maus. Dieser Befund konnte an einer weiteren *knock-out*-Linie (Npu-Maus) von MANSON *et al.* (1995) bestätigt werden. Zwei weitere Mauslinien, die ebenfalls kein zelluläres PrP exprimieren, wurden nach anderen Strategien generiert. Diese wiederum zeigten einen von denen bis dahin beschriebenen *knock-out*-Linien abweichenden Phänotyp. Sowohl die Nsk- (SAKAGUSHI *et al.* 1996) als auch die Rcm0-Maus (MOORE *et al.* 1999) weisen eine Ataxie und eine cerebelläre Atrophie, verbunden mit dem Verlust von Purkinjezellen, auf. Es wurde vermutet, dass zusätzliche Deletionen von Intronsequenzen des PrP-Gens bei diesen beiden Linien ursächlich für den zu beobachtenden Phänotyp sind (WEISSMANN 1996). MOORE *et al.* (1999) wiesen sowohl bei Nsk- als auch bei der Rcm0-Maus ein erhöhtes Expressionsniveau des PrP-ähnlichen Proteins 'Doppel' nach. Die Autoren begründeten damit die bei den existierenden *Prnp-knock-out*-Linien auftretenden unterschiedlichen Phänotypen.

Ein weiterer elektrophysiologischer Befund an hippocampalen CA1-Neuronen war, dass *Prnp-knock-out*-Mäuse eine Alteration in der späten Nachhyperpolarisation aufweisen, was auf eine Beeinträchtigung kalziumaktivierter Kaliumkanäle durch den Verlust von PrP^C hindeutete (COLLING *et al.* 1996). Dieser Sachverhalt konnte durch *patch-clamp*-Messungen an Purkinjezellen im Kleinhirn insoweit bestätigt werden, dass diese Alteration sich als abhängig vom Expressionslevel des zellulären PrP erwies (HERMS *et al.* 2001). Mit Scrapie infizierte Hamster zeigen ebenfalls eine verminderte mittlere und späte Nachhyperpolarisation (BARROW *et al.* 1999). Die wahrscheinlichste Erklärung für diese Befunde ist, dass das Antwortverhalten des intrazellulären Kalziumgehalts auf Depolarisation in *Prnp*^{0/0}-Tieren sowie mit Scrapie infizierten Mäusen herabgesetzt ist, was für einen alterierten Kalziumeinstrom, z. B. durch spannungsaktivierte Kalziumkanäle oder eine abnorme intrazelluläre Ca²⁺-Homöostase, spricht.

Der regulatorische Einfluss von PrP und eines synthetischen Fragments von PrP (PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶) auf spannungsaktivierte Kalziumkanäle konnte von mehreren Arbeitsgruppen nachgewiesen werden. WHATLEY *et al.* (1995) zeigten an Synaptosomenpräparationen von Mäusehirnen eine Zunahme der intrazellulären freien Kalziumkonzentration durch appliziertes rekombinantes Prionprotein, die anscheinend durch spannungsaktivierte Ca²⁺-Kanäle vermittelt wird. Andere Autoren beschreiben den Einfluss von PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ auf spannungsaktivierte Kalziumkanäle. Dieses Fragment des Prionproteins zeigt pathogenetische Charakteristika von PrP^{Sc}, wie die Tendenz zur Bildung von β -Faltblatt-Strukturen und amyloiden Fibrillen (TAGLIAVINI *et al.* 1993, DE GIOIA *et al.* 1994) und die partielle Resistenz gegen Proteolyse (SELVAGGINI *et al.* 1993). Seine Neurotoxizität wird von mehreren Autoren beschrieben (FORLONI *et al.* 1993, 1994, BROWN *et al.* 1996a, b, FLORIO *et al.* 1996). Es gibt Indizien dafür, dass PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ durch Interaktion mit dem L-Typ-Kalzium-Kanal (L-Typ-VGCC, siehe Kapitel 1.6) über die Erhöhung des Ca²⁺-Einstroms die Proliferation von Astrozyten induziert (FLORIO *et al.* 1996). Mikrofluorometrische Ca²⁺-Messungen an Mikroglia zeigen des Weiteren, dass sich die freie intrazelluläre Kalziumkonzentration von Mikroglia durch Applikation dieses toxischen PrP-Fragments signifikant erhöht (HERMS *et al.* 1997). Spätere Untersuchungen ließen vermuten, dass diese Erhöhung L-Typ-Kanal vermittelt ist (SILEI *et al.* 1999).

THELLUNG *et al.* (2000a) konnten an cerebellären Körnerzellkulturen der Ratte ebenfalls eine Modulation der L-Typ-Ca²⁺-Ströme durch PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ zeigen. Im Gegensatz zu den früheren Studien an Gliazellen wurde hier allerdings eine Reduktion des L-Typ vermittelten Ioneneinstroms postuliert, was in einer Studie an Primärzellkulturen von kortikalen Neuronen und an einer neuroektodermalen Zelllinie (GH3-Zelllinie) verifiziert werden konnte (FLORIO *et al.* 1998, THELLUNG *et al.* 2000b).

Elektrophysiologische Befunde am Hippokampus von mit Scrapie infizierten Mäusen deuten darauf hin, dass das zelluläre PrP oder zumindest das konvertierte PrP^{Sc} modulatorisch in die synaptische Übertragung involviert ist. So wiesen Hippokampus-Neurone von mit Scrapieerregern infizierten Tieren im fortgeschrittenen Krankheitsstadium außer der verminderten Nachhyperpolarisation (JOHNSTON *et al.* 1998b, BARROW *et al.* 1999), eine veränderte Kinetik der Aktionspotentiale, eine verminderte exzitatorische und inhibitorische Signalübertragung sowie eine Alterierung des Ruhemembranpotentials und des Membranwiderstandes auf (JEFFERYS *et al.* 1994, JOHNSTON *et al.* 1996, 1997, 1998a).

Auf Grund der GPI-Anker vermittelten Lokalisation an der Zellmembran (STAHL *et al.* 1987) waren viele Studien auf die Suche nach potentiellen Interaktionspartnern von PrP^C ausgerichtet. GFAP (engl.: *glial fibrillary acidic protein*) war als einer der ersten möglichen zellulären Bindungspartner beschrieben worden (OESCH *et al.* 1990). Des Weiteren wurden Bcl-2 (KURSCHNER & MORGAN 1995, 1996), molekulare Chaperone, das Amyloid-Vorläufer-ähnliche Protein 1 (APLP1, YEHIELY *et al.* 1997), der 37 kDa Lamininrezeptor (RIEGER *et al.* 1997) und ein 66 kDa Membranprotein, das nicht genauer charakterisiert wurde (MARTINS *et al.* 1997), als potentielle Bindungspartner postuliert. Als ein möglicher Interaktionspartner für das zelluläre Prionprotein wurde auch die Tyrosinkinase Fyn diskutiert. Fyn ist als intrazellulär an der Membran lokalisierte Kinase an der Aktivierung von Phospholipasen beteiligt, die ihrerseits Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP₃) generieren (JAYARAMAN *et al.* 1996). IP₃ aktiviert seinerseits den IP₃-Rezeptor, einen intrazellulären Kalziumkanal, der am Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist. Diese IP₃-Bindung resultiert in einer Erhöhung des Kalziumgehaltes innerhalb des Somas durch Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Eine

Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration führt zu einer Inhibierung membranständiger Ca^{2+} -Kanäle (Übersichtsartikel KOSTYUK 1989). Pr^{PC} scheint diese zu den Src-Kinasen gehörenden Tyrosinkinase durch Erhöhung des Phosphorylierungsniveaus zu aktivieren und somit indirekt Einfluss auf die Kalziumhomöostase zu nehmen, wobei Caveolin 1 als Mediator zwischen PrP und Fyn fungieren könnte (MOUILLET-RICHARD *et al.* 2000).

1.3 PrP als kupferbindendes Protein

Es gibt Hinweise, die dafür sprechen, dass PrP eine funktionelle Rolle im Kupfermetabolismus der Zelle einnimmt. Mehrere Studien haben gezeigt, dass Pr^{PC} Kupfer binden kann. So war es erstmals möglich, Pr^{PC} aus dem Hamsterhirn durch eine Kupfer-Affinitäts-Säule zu isolieren (PAN *et al.* 1992). Alle bekannten Säugerprionproteine weisen im aminoterminalen Bereich Tandem-Wiederholungen eines Histidin enthaltenden Peptids auf (Abbildung 2), für das eine Affinität zu Kupferionen in mikromolaren oder nanomolaren Konzentrationen beschrieben wurde (HORNSHAW *et al.* 1995a, b, BROWN *et al.* 1997a, VILES *et al.* 1999, KRAMER *et al.* 2001, JACKSON *et al.* 2001).

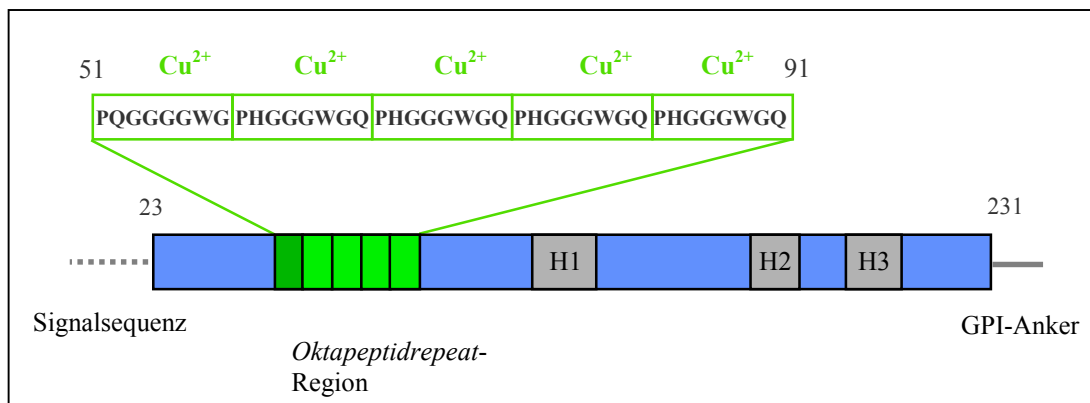


Abbildung 2: Schema des Prionproteins mit der kupferbindenden aminoterminalen Region. Das Prionprotein besteht aus 231 Aminosäuren. Die hoch konservierte Oktapeptidrepeat-Region (AS 51-91, Sequenz (PHGGGWGQ) x 4) im N-terminalen Anteil stellt den kupferbindenden Bereich des Prionproteins dar, der 5-6 Kupferionen kooperativ binden kann. H1-3: C-terminale Histidine.

Diese Oktapeptid-Wiederholungssequenz beinhaltet fünf oder sechs Tandem-Motive mit der Aminosäuresequenz P(H/G)GGGWGQ, die innerhalb der Säugetiere hoch

konserviert ist. Für Hühner-PrP wurde eine ähnliche Region mit 6 Hexapeptid-Tandems identifiziert (GABRIEL *et al.* 1992). Es konnte gezeigt werden, dass die Kupferbindung an rekombinantes PrP den flexiblen unstrukturierten N-Terminus strukturell stabilisiert und somit möglicherweise zur Erhaltung der Konformation von PrP^C beiträgt (MIURA *et al.* 1996). Auch QUAGLIO *et al.* (2001) zeigten eine konformationsabhängige Kupferinteraktion dadurch, dass die Inkubation mit Kupfer die Proteaseresistenz und Unlöslichkeit von PrP^C induziert. Spektroskopische Daten belegten, dass jedes PrP^C-Molekül 5 - 6 Kupferionen kooperativ binden kann (KRAMER *et al.* 2001).

Kupfer ist ein Übergangsmetall, das eine wichtige Rolle in der Biochemie aller aeroben Organismen spielt. Die katalytische Aktivität von diversen Enzymen, die in neuronale Prozesse integriert sind, wird durch Cu²⁺ moduliert (WAGGONER *et al.* 1999, SAYRE *et al.* 2000). Freies Cu²⁺ bedingt außerdem die Generierung von zellschädigenden Radikalen, wie Hydroxyl-Radikalen, die als eine Ursache für oxidativen Stress gelten (ATWOOD *et al.* 1999).

Auch für PrP^{Sc} wurde eine Interaktion mit Kupfer diskutiert. MCKENZIE *et al.* (1998) konnten zeigen, dass mittels Guanidiniumhydrochlorid denaturiertes PrP^{Sc} seine Infektiosität und partielle Proteaseresistenz signifikant schneller in Anwesenheit von Kupfer wiedererlangt. Dies spricht dafür, dass PrP^{Sc} ebenfalls die Fähigkeit zur Kupferbindung besitzt. Infektionsstudien an transgenen Tieren, die aminoterminal deletiertes PrP überexprimieren (PrP^{Δ32-93}), belegten, dass die kupferbindende Region von PrP^C von zentraler Bedeutung für die Pathologie der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien ist. So wiesen die Tiere nach Inokulation mit Scrapie-Hirnhomogenat eine mehr als dreifach verlängerte Inkubationszeit von 232 ± 21 Tagen auf, im Gegensatz zu volle-Länge-PrP^C-überexprimierenden Tieren, die das gleiche PrP^C-Expressionsniveau haben (Tg20). Deren Inkubationszeit betrug nur 60 bis 65 Tage (FLECHSIG *et al.* 2000). Die Priontiter in Hirnen von Mäusen, die trunkiertes PrP ausbilden, waren in allen Krankheitsstadien signifikant reduziert. Zudem war die Infektiosität in terminal erkrankten Tieren um das 10- bis 30-fache und der Anteil von proteaseresistentem PrP um das 30- bis 50-fache geringer als in PrP^C-überexprimierenden Kontrolltieren. Mehrere Arbeitsgruppen haben die physiologische Bedeutung der Bindung zwischen Kupfer und PrP erforscht. BROWN *et al.* (1997a) zeigten, dass die Konzentration

von Kupfer im Gegensatz zu anderen zweiwertigen Metallen in membranangereicherten Hirnextrakten von *Prnp-knock-out*-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp um das 10- bis 15-fache vermindert ist. Zudem wurde an cerebellären Körnerzellkulturen nachgewiesen, dass der Grad der Resistenz gegen oxidativen Stress mit dem Expressionslevel von PrP^C korrelierte (BROWN *et al.* 1997b, BROWN & BESINGER 1998). Diese Beobachtungen sprachen für eine wichtige Rolle des Prionproteins als Kupferaufnahmeprotein an Zellmembranen, die mit der Modulation der Cu/Zn Superoxiddismutase (SOD), dem im Metabolismus hauptsächlich antioxidativ wirkenden Enzym, verbunden sein könnte. Auch eine eigene SOD-Aktivität von PrP^C wurde vermutet, wobei PrP^C selbst eine kupferabhängige enzymatische Aktivität aufweisen könnte (BROWN *et al.* 1999).

Morphologische und biochemische Studien an verschiedenen transgenen Mauslinien geben Evidenzen für eine vornehmlich synaptische Lokalisation des zellulären Prionproteins (HERMS *et al.* 1999). Der in Synaptosomen festgestellte verminderte Kupfergehalt bei *Prnp*^{0/0}-Mäusen deutet darauf hin, dass PrP^C bei der synaptischen Kupferhomöostase involviert ist (BROWN *et al.* 1997a, HERMS *et al.* 1999) und es die Funktion der Synapse moduliert. NAM & HOCKBERGER (1992) zeigten, dass spannungsaktivierte Ca²⁺-Kanäle durch Cu²⁺ inhibiert werden. Wenn, wie vermutet, PrP^C den synaptischen Kupfergehalt puffert, würde das auf einen protektiven Effekt von PrP^C als ‘Kupferfänger’ an der Synapse hindeuten. In der Tat wiesen die Ergebnisse von BROWN *et al.* (1997a) und HERMS *et al.* (1999) darauf hin, dass PrP einen regulatorischen Einfluss auf die synaptische Übertragung haben könnte. PAULY & HARRIS (1998) zeigten, dass Kupfer die Endozytose von PrP^C von der Zelloberfläche in das Zytosol stimuliert. Auf diesem Hintergrund gewinnt die Hypothese an Wahrscheinlichkeit, dass Kupfer extrazellulär durch das Prionprotein cheliiert, durch Endozytose internalisiert und auf andere kupferbindende zytosolische Proteine transferiert wird. Massenspektroskopische Befunde von WAGGONER *et al.* (2000) zeigten allerdings, dass bei subzellulären Fraktionen von Hirnen transgener Mäuse der Kupfergehalt sich nicht entsprechend dem PrP-Expressionsniveau verhält. Des Weiteren konnten sie auch den Befund einer veränderten Superoxiddismutaseaktivität nicht bestätigen. Trotz dieser divergenten Befunde wird die Kupferbindung für PrP^C als gesichert angesehen und ihre Bedeutung für die Pathologie der Prionerkrankungen diskutiert.

1.4 Die posttranslationale Spaltung des Prionproteins

Innerhalb des zellulären Metabolismus unterliegt ein Teil der PrP^C-Moleküle posttranslationalen Spaltungen. Eine Spaltstelle befindet sich innerhalb des GPI-Ankers (BORCHELT *et al.* 1993), wodurch das Protein von der Zellmembran abgelöst wird (siehe Abbildung 3). Verschiedene Untersuchungen lassen vermuten, dass eine auf der Zelloberfläche lokalisierte Phospholipase für diese Spaltung, der ungefähr 10 % der PrP^C-Moleküle unterliegen, verantwortlich ist (CAUGHEY & RAYMOND 1991, TARABOULOS *et al.* 1992, CHEN *et al.* 1995). Ob diese Spaltung einen katabolischen oder sekretorischen Mechanismus darstellt, konnte bisher noch nicht eindeutig geklärt werden. Die zweite Spaltstelle befindet sich in der zentralen Region des Prionproteins, die Teil der als neurotoxisch geltenden Region (PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶) ist, an Aminosäure 111 oder 112 (Chen *et al.* 1995).

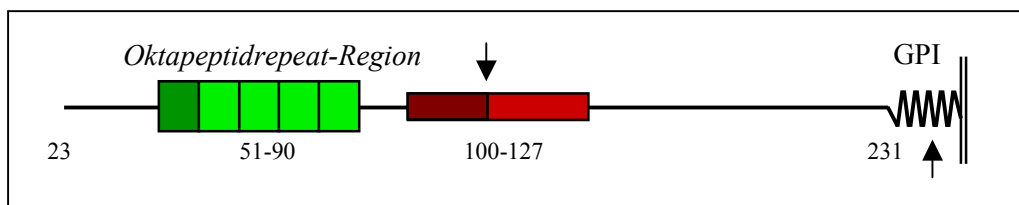


Abbildung 3: Schematische Darstellung des murinen Prionproteins.

Die Spaltstellen in der zentralen Region innerhalb der neurotoxischen Domäne (AS 106-126) und am GPI-Anker sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Aus dieser Spaltung resultieren ein N-terminales 9 kDa großes und das 18 kDa große C-terminale Fragment von PrP. Es bleibt zu klären, ob die zelluläre Spaltung des Prionproteins einen rein im Katabolismus von PrP integrierten Bestandteil darstellt oder ob sie darüber hinausgehend physiologische Funktion besitzt. So postulierten CALLEBEAU *et al.* (1994) eine Beteiligung des C-terminalen Bereiches bei der Zell-Zell-Interaktion oder der Membranfusion. Wie bereits beschrieben, scheint die N-terminale Region auf Grund ihrer kupferbindenden Eigenschaften in den zellulären Kupfermetabolismus integriert zu sein. Auch könnte das N-terminale kupferbindende Spaltprodukt einen biologisch aktiven Liganden mit Signalfunktion darstellen. Eine Funktion als Signalbereich des Proteins für die Clathrin-gesteuerte Reinsерierung wurde ebenfalls vermutet (SHYNG *et al.* 1994, 1995, HARRIS *et al.* 1996). Die Spaltung des zellulären Prionproteins könnte somit eine regulatorische Komponente zur Steuerung der physiologischen Funktion von PrP^C darstellen.

1.5 Synaptische Übertragung im Cerebellum

Das Kleinhirn oder Cerebellum ist ein für die Kontrolle des motorischen Verhaltens wichtiges Hirngebiet. Die Kleinhirnrinde gliedert sich in drei Schichten (Abbildung 4): die Molekularschicht, die Purkinjzellschicht und die Körnerzellschicht (für Übersicht siehe KANDEL *et al.* 1995).

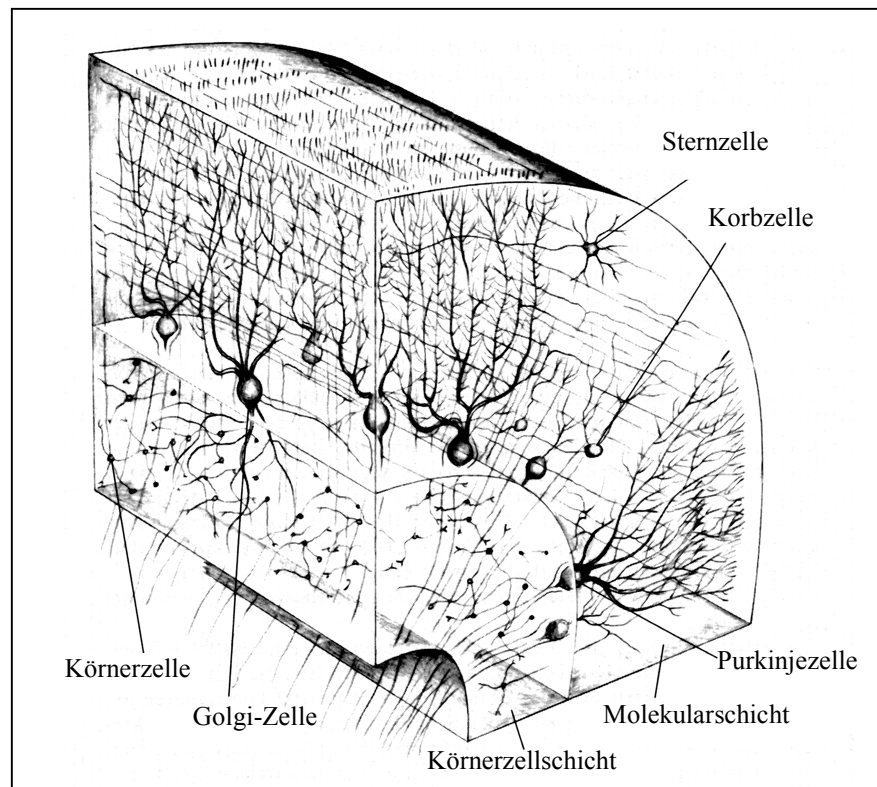


Abbildung 4: Zytoarchitektur des Kleinhirns (nach THOMPSON 1985).

Das Cerebellum weist eine deutliche Schichtung in Körnerzell-, Purkinjzell- und Molekularschicht auf. Letztere wird von den Axonen der Körnerzellschicht gebildet und enthält zudem inhibitorische Interneurone (Stern-, Korbzellen).

Die äußere Schicht wird durch die Molekularschicht gebildet. Sie besteht vorwiegend aus den Axonen der Körnerzellen, die parallel zur Längsachse verlaufen, woraus sich der Name Parallelfaserschicht ableitet. Zudem enthält sie unregelmäßig angeordnete Stern- und Korbzellen, die als Interneurone fungieren. Weit in die Molekularschicht hinein ziehen sich die baumförmig gefächerten Dendriten der darunter liegenden Purkinjzellen, die jeweils in einer Ebene senkrecht zur Längsachse und zu den Parallelfasern verlaufen. Die großen Zellkörper der Purkinjzellen sind einreihig zwischen Molekular- und Körnerzellschicht angeordnet. Die Körnerzellschicht bildet

die innerste Schicht der Kleinhirnrinde. Sie besteht vorwiegend aus kleinen, kugeligen, dichtgepackten Neuronen, den Körnerzellen.

Die gesamte Information, die im Kleinhirn verarbeitet wird, läuft letztendlich über die Purkinjezellen als einzige Ausgangsneurone des Kleinhirns (für Übersicht siehe LLINÀS 1981). Die einzigen exzitatorischen afferenten Eingänge der Purkinjezellen werden direkt von den Kletterfasern und indirekt von den Moosfasern über die Körnerzellen vermittelt. Die Kletterfasern entspringen den Neuronen des Nucleus olivaris inferior in der Medulla oblongata und projizieren direkt auf die Purkinjezellen. Jede Purkinjezelle bekommt exzitatorische Eingänge von einer einzigen Kletterfaser, vornehmlich am Zellkörper und dem proximalen Dendriten. Diese Verbindung zwischen Kletterfaser und Purkinjezelle gehört zu den stärksten synaptischen Kontakten im gesamten ZNS. Im Gegensatz dazu wird der andere exzitatorische Eingang durch mehrere tausend Parallelfaserkontakte von Körnerzellen mit dem distalen Dendriten einer Purkinjezelle bestimmt, wobei jede Körnerzelle ihrerseits Synapsen mit mehreren Moosfasern bildet. Die postsynaptische Antwort der Parallelfaserstimulation ist modulatorisch, das heißt, eine Änderung der präsynaptischen Transmitterausschüttung reguliert die Amplitude der postsynaptischen Antwort. Im Gegensatz dazu erfolgt die postsynaptische Antwort an der Kletterfaser-Purkinjezellsynapse mit konstanter Amplitude erst nach Überschreitung eines Schwellenwertes. Der exzitatorische Eingang über die Parallelfasern wird durch den Kletterfaser-Purkinjezell-Kontakt über heterosynaptische Beeinflussung moduliert, wobei die Kletterfasern die Wirkung der Moosfasern modulieren (ITO 1984). Stern- und Korbzellen, die in der Molekularschicht lokalisiert sind und als Interneurone fungieren, bilden die einzigen inhibitorischen Afferenzen der Purkinjezellen (KONNERTH *et al.* 1990, VINCENT *et al.* 1992).

Das Cerebellum stellt aufgrund seiner Topologie ein ideales Modell zum Studium der synaptischen Übertragung dar. Insbesondere die Purkinjezelle mit ihren klar definierten Afferenzen und ihrer mikroskopisch leichten Identifizierbarkeit bildet ein geeignetes Objekt für physiologische Messungen. Zudem bietet die klare Schichteneinteilung des Kleinhirns die Möglichkeit die evozierte synaptische Übertragung an der Parallelfaser-Purkinjezell-Synapse durch die Stimulation der

glutamatergen Axone (Parallelfasern) zu studieren ohne dass die Purkinjezelle oder der Körnerzellkörper direkt von diesem Stimulus betroffen werden.

Die synaptische Transmission an der Parallelfaser-Purkinjezell-Synapse wird durch Glutamat vermittelt. Glutamat, als wichtigster exzitatorischer Transmitter im ZNS, wird bei der Vesikelausschüttung an der Präsynapse in den synaptischen Spalt freigesetzt und bindet an postsynaptische ionotrope Glutamatrezeptoren (für Übersicht siehe NICOLL *et al.* 1990). Diese werden aufgrund ihrer Agonisten als NMDA (N-Methyl-D-aspartat) und non-NMDA-Rezeptoren bezeichnet (Abbildung 5). Letztere gliedern sich in Kainat-, AMPA- (engl.: *α -amino-3-hydroxy-methyl-4-isoxazole propionic acid*) und Quisqualatrezeptoren.

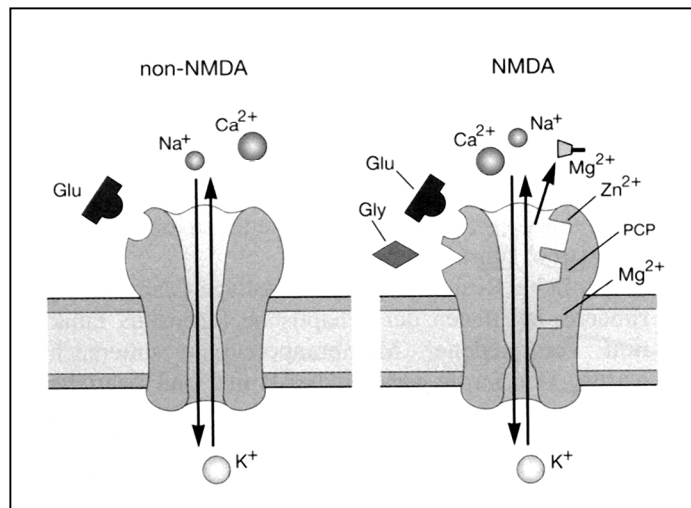


Abbildung 5: Schematische Darstellung ionotroper Glutamatrezeptoren (nach KANDEL *et al.* 1995).

Sie stellen Kationenkanäle dar, die nach Transmitterbindung permeabel für Natrium- und Kaliumionen und im Falle der AMPA- und NMDA-Rezeptoren auch für Kalziumionen sind (siehe Abbildung 5). Die Gesamtheit der messbaren Ioneneinströme erzeugt den exzitatorischen postsynaptischen Strom (EPSC, engl.: *excitatory postsynaptic current*), der mittels der *patch-clamp*-Technik detektiert werden kann. NMDA-Rezeptoren weisen eine Bindungsstelle für Mg^{2+} auf und sind nach Parallelfaserstimulation nur ionenpermeabel, wenn sich die postsynaptische Purkinjezelle in depolarisiertem Zustand befindet, wodurch der Magnesiumblock entfernt wird (MACDONALD & WOJTOWICZ 1980, NOWAK *et al.* 1984). Bei Vorliegen des Ruhemembranpotentials wird der exzitatorische postsynaptische

Ionenstrom rein durch non-NMDA-Kanäle bestimmt. Das kurzzeitige Aufeinanderfolgen zweier Stimuli an der Präsynapse der exzitatorischen Synapse im Kleinhirn bedingt einen Anstieg der zweiten postsynaptischen Antwort in Form einer Erhöhung der Amplitude des zweiten EPSC (KONNERTH *et al.* 1990). Dieses Antwortverhalten auf gepaarte Stimuli wird als Doppelpulsverstärkung (PPF, engl.: *paired pulse facilitation*) bezeichnet. Der PPF liegt eine präsynaptische, wahrscheinlich kalziumabhängige, kurzzeitige Modulation der synaptischen Übertragung zugrunde (ZUCKER 1989) und gilt als ein Maß für die Kurzzeitplastizität einer Synapse.

1.6 Spannungsaktivierte Kalziumkanäle

Ionenkanäle spielen bei zellulären Prozessen wie der axonalen Reizleitung, der synaptischen Übertragung oder dem Aufbau des Membranpotentials eine tragende Rolle. Spannungsaktivierte Kalziumkanäle (VGCC, engl.: *voltage gated calcium channel*) bilden eine Klasse von Ionenkanälen, die als transmembrane Proteine selektiv Kalziumionen über spannungsgesteuerte Mechanismen aus dem Extrazellulärraum in das Lumen der Zelle transportieren.

In Ruhesituation ist die extrazelluläre Kalziumkonzentration um das 10.000-fache höher als die intrazelluläre. Eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration erfolgt über die Aktivierung spannungsgesteuerter Kalziumkanäle, durch Liganden gesteuerte Ionenkanäle, wie NMDA- oder AMPA-Rezeptoren, und durch die Ausschüttung von Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Kalziumspeichern, wie dem Endoplasmatischen Retikulum. Kalziumionen spielen eine wichtige Rolle in der Physiologie der Zelle. Sie agieren als intrazelluläre Botenstoffe und regulieren oder initiieren biochemische oder elektrische Ereignisse. Ca^{2+} -Ionen und dadurch indirekt Ca^{2+} -Kanäle sind an Mechanismen wie der Enzymregulation, Genexpression, Muskelkontraktion sowie einer Reihe von neuronenspezifischen Prozessen wie der Neurotransmitterausschüttung und der Synaptogenese beteiligt.

Bis heute sind sechs verschiedene Klassen spannungssensitiver Ca^{2+} -Kanäle identifiziert worden, die sich aufgrund ihrer Lage, Struktur und elektrophysiologischen und pharmakologischen Merkmale unterscheiden lassen. Sie werden als L-, T-, N-, P-, Q- und R-Typ bezeichnet (BIRNBAUMER *et al.* 1994).

Diese verschiedenen Kanaltypen werden wiederum in zwei Kategorien eingeteilt. Eine Gruppe bilden die LVA-Kanäle, die durch niedrige Spannung aktiviert werden (engl.: *low-voltage-activated*) und durch schnelle Inaktivierungszeiten gekennzeichnet sind. Als einziger Vertreter dieser Kategorie sind bislang die T-Typ-Kanäle (T für transient) identifiziert worden. Sie sind unter anderem in Herzmuskelzellen zu finden, wo sie bei der Aufrechterhaltung der Schrittmacherfunktion eine Rolle spielen (HAGIWARA *et al.* 1988). T-Typ-Kanäle weisen eine niedrige Konduktivität von 8 pS auf. Die andere Gruppe, die aus 'high voltage activated' Kalziumkanälen (HVA, engl. für: durch hohe Spannung aktivierbar) gebildet wird, beinhaltet L-, N-, P-, Q-, und R-Typ. L-Typ-Kanäle (L für engl.: *long-lasting*) werden hauptsächlich in Muskelzellen und im zentralen Nervensystem gefunden und benötigen im Vergleich zu LVA-Kanälen eine zur Aktivierung starke Depolarisation. Sie zeigen zudem keine oder nur eine sehr geringe Inaktivierung (JONES 1998). Die mittlere Kanalkonduktivität wird mit 15 - 25 pS angegeben. Der dritte, als N-Typ bezeichnete Kanal (PLUMMER *et al.* 1989, ABBOTT & LITZINGER 1994), der vorwiegend in Neuronen zu finden ist (N für neuronal), benötigt ebenfalls eine starke Depolarisation, um in den aktivierten Zustand überzugehen. Die Inaktivierbarkeit dieses Kanaltyps liegt zwischen der von L-Typ und T-Typ-Kanal und seine Einzelkanalkonduktivität beläuft sich auf 18 pS. Die übrigen drei als P-, Q-, und R-Typ bezeichneten spannungssensitiven Kalziumkanäle bilden nach der selektiven Blockade von L-, T- und N-Typ den Reststrom. P-Typ-Ströme bilden den hauptsächlichsten Ca^{2+} -Strom in Purkinjezellen (MINTZ *et al.* 1992, ZHANG *et al.* 1993, TERAMOTO *et al.* 1993) und Q-Typ-Kanäle wurden in cerebellären Körnerzellen detektiert. Der nach Inhibierung aller bislang genannten Kanäle verbleibende Strom basiert auf dem Ca^{2+} -Einfluss durch R-Typ-Kanäle (BOURINET *et al.* 1996, NEWCOMB *et al.* 1998), die eine dem T-Typ-Kanal vergleichbare Konduktivität aufweisen.

Obwohl es elektrophysiologisch messbare Unterschiede zwischen den einzelnen Kanaltypen gibt, ist eine genaue Identifizierung eines Ca^{2+} -Stromes nur auf pharmakologischem Wege möglich (MORY *et al.* 1996, ERTEL *et al.* 1997). So werden L-Typ-Kanäle spezifisch durch Dihydropyridine, wie Nifedipin, Nicardipin und Verapamil blockiert. N-, P- und Q-Typ-Kanäle zeigen sich sensitiv gegenüber Peptiden, die aus Mollusken und Spinnen gewonnen werden und als Neurotoxine

wirken, wie Conotoxine und Agatoxine. So interagiert Omega-Conotoxin GVIA selektiv mit dem N-Typ-Kanal in bereits nanomolaren Konzentrationen. Alle spannungsaktivierten Ca^{2+} -Kanäle zeichnen sich durch ihre Sensitivität gegenüber Kadmium aus (SLESINGER & LANSMAN 1991). Dieses Merkmal kann zur Abgrenzung dieser Kanaltypen gegenüber anderen spannungsabhängigen Ionenkanälen (z. B. spannungsensitiven Kaliumkanälen) dienen.

Spannungsaktivierte Kalziumkanäle sind als heteromultimere transmembrane Proteine aus fünf verschiedenen Untereinheiten aufgebaut (JONES 1998, Abbildung 6).

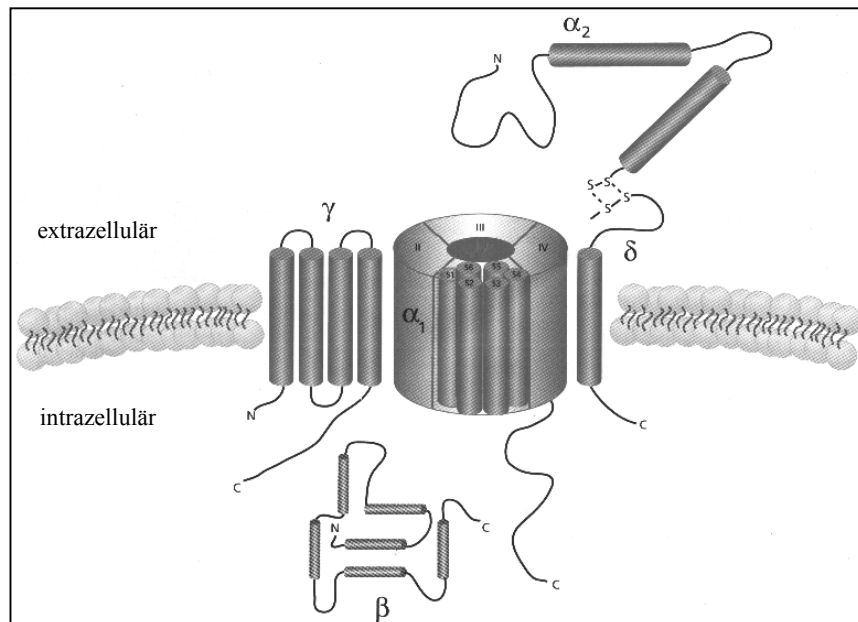


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines $\alpha_1\alpha_2\delta\beta\gamma$ spannungsaktivierten Kalziumkanals (modifiziert nach JONES 1998).

Er wird aus fünf verschiedenen Untereinheiten gebildet, die in einem heteromeren Komplex konstituiert sind, wobei mehrere α_1 -Untereinheiten eine spannungsabhängige Pore bilden.

Die α_1 -Untereinheiten sind für die Funktionalität des Kanals entscheidend. Sie bilden die spannungsabhängige kalziumselektive Pore durch die Membran und in einigen Fällen die Ligand-Bindungsstelle. Die β -Untereinheit sorgt für die postexpressionale Lokalisierung des Proteins. Unterschiedliche Positionierungen in der Membran werden durch unterschiedliche Isoformen dieser Untereinheit bestimmt. Die α_2 -, δ - und γ -Domänen sind funktionell in der Regulation der

spannungsabhängigen Aktivierung und Inaktivierung und der Stabilisierung der Konformation einzugliedern.

1.7 Zielsetzung

Die Ursachen der neurodegenerativen Veränderungen bei den transmissiblen spongiformen Encephalopathien ist bislang weitgehend ungeklärt. Um den pathogenetischen Mechanismus, der zur Schädigung der Nervenzellen führt, zu verstehen, kann die Kenntnis der physiologischen Funktion des zellulären Prionproteins einen wichtigen Beitrag leisten. Diese Arbeit soll dazu beitragen, Aufschluss über die Funktion von PrP^C an der Synapse zu erlangen. Folgende Fragestellungen sind Gegenstand dieser Arbeit:

I. Ziel des ersten Teils ist die Klärung der Funktion des Prionproteins bei der synaptischen Übertragung. Besonderes Augenmerk wird hierbei auf die evozierte exzitatorische Übertragung im Cerebellum von prionproteintransgenen Mäusen gelegt. Potentielle Alterationen der exzitatorischen Übertragung an der Purkinjezell-Körnerzellsynapse sollen durch Studien zur Kurzzeitplastizität mittels *patch-clamp*-Messungen aufgezeigt werden. Als Modell dienen hierbei Kleinhirnschnittpräparate von transgenen Mäusen, die das zelluläre Prionprotein sowohl unterschiedlich stark als auch in verschiedenen Zelltypen sowie als teilweise deletiertes Protein exprimieren. Hierbei soll unter anderem eine mögliche Funktion der Kupferbindung des Prionproteins bei der exzitatorischen synaptischen Übertragung untersucht werden.

II. Der Einfluss des Prionproteins auf spannungsaktivierte Kalziumkanäle ist aufgrund der in Kapitel 1.2 dargestellten Ergebnisse als wahrscheinlich anzunehmen. Dieser Sachverhalt soll durch *patch-clamp*-Messungen an kultivierten Körnerzellen aus dem Cerebellum junger Mäuse genauer untersucht werden. Folgende Parameter sind Thema des zweiten Teils dieser Arbeit, um den Einfluss von PrP auf VGCCs zu untersuchen:

1. Ist die Kinetik spannungsaktivierter Ca²⁺-Ströme abhängig von der PrP^C-Expression?
2. Gibt es eine Interaktion von extrazellulär appliziertem rekombinanten PrP mit spannungsaktivierten Kalziumkanälen im Hinblick auf die Rolle von extrazellulär akkumulierten PrP^{Sc}?
3. Ist diese mögliche Interaktion abhängig von den verschiedenen Domänen bzw. Spaltprodukten (Amino-, Carboxyterminus) von PrP?

4. Welche Rolle nimmt die Kupferbindung von PrP beim Einfluss auf spannungsaktivierte Kalziumkanäle ein?
5. Ist die von MOUILLET-RICHARD *et al.* (2000) beschriebene Interaktion der Tyrosinkinase Fyn mit PrP^C relevant für die Funktion spannungsaktivierter Kalzium-Kanäle?

2 Material und Methoden

2.1 Transgene Mäuse

Als Modell zur Überprüfung der Funktion des Prionproteins wurden verschiedene transgene Mauslinien für *patch-clamp*-Messungen am Kleinhirnschnitt und an neuronalen Primärzellkulturen verwendet. Die einzelnen Linien exprimieren das Prionprotein sowohl unterschiedlich stark als auch in verschiedenen Zelltypen sowie als teilweise deletiertes Protein (siehe Abbildung 7). An Hirnpräparationen von Mäusen folgender Linien, die in den zentralen Tierhaltungseinrichtungen des Universitätsklinikums Göttingen und des Instituts für Neuropathologie der LMU in München unter Standardbedingungen gehalten wurden, sind elektrophysiologische Messungen durchgeführt worden:

Wt

Als Kontrollmaus für die *patch-clamp*-Experimente wurde eine Kreuzung der beiden Wildtypen C57BL/6J und 129sv(ev) verwendet, da sämtliche *Prnp*-Mutationstragende Linien auf dem entsprechenden genetischen Hintergrund gezüchtet wurden.

***Prnp*^{0/0}**

BÜELER *et al.* (1992) generierten diese Prionprotein-*knock-out*-Maus (*Prnp*^{0/0}) mittels Unterbrechung von proteinrelevanten Anteilen des PrP-Gens durch ein Neomycinresistenzgen. Diese Tiere exprimieren keine detektierbare Menge an Prionprotein. Sie zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp und lassen sich nicht mit Scrapie infizieren (BÜELER *et al.* 1993).

Tg20

Die Tg20-Maus überexprimiert das *Prnp-a* Allel in 10-facher Menge (FISCHER *et al.* 1996) ebenfalls auf *Prnp*^{0/0}-Hintergrund. Sie wurde durch Kerninjektion eines halbgenomischen Konstruktes generiert. Ausgenommen von der PrP-Expression sind, wie Immunfluoreszenzfärbungen gegen PrP^C zeigen, nur die cerebellären Purkinjezellen. Dies lässt sich womöglich durch das fehlende Intron 2 des verwendeten Konstruktes erklären, das anscheinend essentielle Anteile für die Prionproteinexpression in den Purkinjezellen enthält. Die Tg20-Maus ist im Phänotyp unauffällig. Scrapie-Infektionsstudien an Tg20-Tieren belegen eine signifikant reduzierte Inkubationszeit dieser Mäuse (FLECHSIG *et al.* 2000). Bei der

Betrachtung der synaptischen Übertragung an der Körnerzell-Purkinjezell-Synapse kann diese Maus zur Untersuchung der Funktion des Prionproteins auf prä- und postsynaptischer Seite herangezogen werden.

C4

Zur Klärung der Bedeutung des kupferbindenden Anteils von PrP^C an der Synapse dienten vitale Hirnschnittpräparate (siehe 2.3) der C4-Maus. Sie überexprimiert verkürztes PrP ohne die kupferbindende aminoternale Domäne (PrP^{Δ32-93}) 4-fach auf *Prnp*^{0/0}-Hintergrund (SCHMERLING *et al.* 1998). Phänotypologisch ist diese Maus ebenfalls unauffällig.

F35

Mäuse dieser transgenen Linie exprimieren verkürztes PrP ebenfalls ohne den kupferbindenden N-terminalen Anteil 2-fach (SCHMERLING *et al.* 1998). Allerdings ist der deletierte Bereich bei dieser Linie im Vergleich zum C4-Konstrukt um 41 Aminosäuren erweitert (PrP^{Δ32-134}). Im Gegensatz zur C4-Maus entwickeln F35-Tiere im Alter von ca. 3 Wochen einen auffälligen Phänotyp, der sich durch eine starke Ataxie bemerkbar macht. Gleichzeitig zeigt sich eine ausgeprägte cerebelläre Körnerzelledegeneration. Weil homozygote Tiere nicht zuchtfähig sind, war eine Kreuzung einer heterozygoten Maus, die sowohl das zelluläre PrP als auch das verkürzte PrP^{Δ32-134} trägt, mit einer *Prnp*^{0/0}-Maus erforderlich. Auf diese Weise bestand ein Wurf im Idealfall sowohl aus hemizygot PrP^{Δ32-134}- und hemizygot PrP^C-exprimierenden Jungen als auch aus heterozygot PrP^{Δ32-134}- und PrP^C-exprimierenden Tieren. Mäuse der letzten beiden Genotypen stellten ideale Kontrolltiere für *patch-clamp*-Messungen an F35-Hirnpräparaten dar. Allerdings mussten alle Tiere vorerst mittels der PCR-Methode (siehe 2.2.2) genotypisiert werden.

Tg87

Bei der Tg87 Mutation wurde das *Prnp*-Gen mittels des L7-Promotors in *Prnp*^{0/0}-Mäuse reinsertiert (unpubliziert). L7-Promotor-gesteuerte Genexpression beschränkt sich ausschließlich auf die Retina und die cerebellären Purkinjezellen. Ebenso wie die Tg20-Maus bietet diese Linie die Möglichkeit zum Studium der prä- oder postsynaptischen Funktion von zellulärem Prionprotein.

Tg82

Die Tg82-Mutation entspricht der Tg87-Mutation, wobei sich nur der Integrationsort des *Prnp*-Gens unterscheidet (unpubliziert). Die Mäuse exprimieren PrP^C analog zur Tg87-Linie ausschließlich in der Retina und den Purkinjezellen. Wie auch bei der Tg87-Maus resultiert aus der purkinjezellspezifischen Reinsrierung von PrP^C bei der Tg82-Maus kein offensichtlicher Phänotyp.

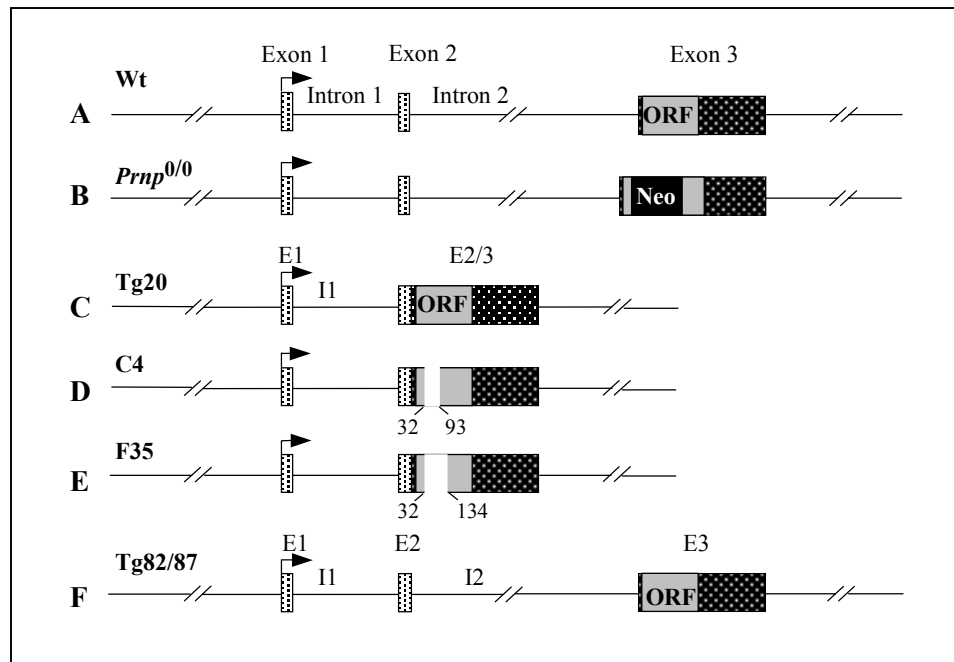


Abbildung 7: *PrP*-Gen und *PrP*-Transgene von im Versuch verwendeten Mauslinien.

A Wildtyp-*PrP*-Gen, **B** Unterbrechung des *Prnp*-Allels bei der *Prnp*-knock-out-Maus durch eine Neomycinresistenz-Kassette (Neo), **C** halbgenomisches Konstrukt der Tg20-Maus, **D** Deletionsmutation (Δ 32-93) bei der C4-Maus, **E** F35-Deletionsmutation (Δ 32-134), **F** über L7-Promotor reinsertiertes *Prnp*-Konstrukt in *Prnp*^{0/0}-Maus bei Tg82- und Tg87-Mäusen.

Fyn^{0/0}

Tiere dieser Mauslinie zeichnen sich durch das Fehlen der *Fyn*-Kinase aus, die zu den Src-Thyrosinkinasen gehört (STEIN *et al.* 1992). Die Tiere zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp. Allerdings belegen elektrophysiologische Untersuchungen am Hippokampus von *Fyn*^{0/0}-Mäusen, dass die Langzeitpotenzierung (LTP) bei unveränderter Kurzzeitplastizität alteriert ist. Die Tiere scheinen ebenfalls eine verminderte Fähigkeit zum räumlichen Lernen (GRANT *et al.* 1992) aufzuweisen.

2.2 Genotypisierung von F35-Mäusen

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl.: *polymerase-chain-reaction*) stellt eine *in-vitro*-Technik dar, mit der man gezielt DNA-Abschnitte, wie transgene Konstrukte innerhalb eines DNA-Stranges, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen flankiert werden, amplifizieren kann (MULLIS & FALOONA 1987, SAIKI *et al.* 1988). Anhand der resultierenden, vervielfältigten DNA-Stränge und ihrer Länge können transgene Tiere identifiziert werden.

2.2.1 Isolierung chromosomaler DNA aus Mausschwanzbiopsat

Die chromosomale DNA aus Mausschwanzbiopsaten wurde mit Hilfe des 'QIAamp Tissue Kit' (Qiagen GmbH, Hilden) nach der Vorschrift des Herstellers isoliert. Alle verwendeten Puffer und Reagenzien waren Teil des 'QIAamp Tissue Kit'. Den Mäusen wurden im Alter von mindestens 15 Tagen mit einem Skalpell ca. 0,5 cm der Schwanzspitze abgeschnitten und diese in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Bei Entnahme von Schwanzbiopsat mehrerer Tiere war darauf zu achten, eine Übertragung von Fremd-DNA zwischen den Einzelproben zu vermeiden, um keine Falschsignale in der PCR-Reaktion zu erhalten. Aus diesem Grund war eine gründliche Reinigung oder das Austauschen des Skalpells nach jeder Biopsie erforderlich.

Die Schwanzproben wurden unter Zugabe von 200 µl Lysispuffer (20 µl Proteinase-K-Stammlösung in 180 µl Puffer ATL) zur Inkubation über Nacht bei 55 ° C in einen Thermoblockschüttler (Eppendorf) gegeben. Verbleibende feste Bestandteile wurden am nächsten Tag abzentrifugiert (14.000 U/min, 5 min bei Raumtemperatur) und der Überstand in ein sauberes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der DNA erfolgte die Zugabe eines Gemisches aus 200 µl Puffer AL und 210 µl Ethanol mit anschließender gründlicher Durchmischung auf einem Vortex (Scientific Industries). Das Gemisch wurde auf eine in einem 2 ml Reaktionsgefäß platzierte 'QIAamp'-Säule überführt und für eine Minute zentrifugiert (8.000 U/min, 21 ° C). Die Säule mit der isolierten DNA wurde in ein neues 2 ml-Gefäß transferiert und zwei Mal mit je 500 µl Puffer AW1 und AW2 gewaschen (mit anschließender Zentrifugation, 1 min, 8.000 U/min, RT). Nachdem die Säule in ein steriles Reaktionsgefäß überführt war, erfolgte die Elution der DNA durch Zugabe von 200 µl Puffer AE (70 ° C) und anschließender Zentrifugation bei 8.000 U/min und

Raumtemperatur. Die isolierte chromosomale DNA aus den Mausschwanzbiopsaten konnte so bis zur folgenden Genotypisierung mittels der PCR-Methode bei 4 ° C gelagert werden.

2.2.2 Genotypisierung transgener Mäuse mittels der PCR

Um DNA mit Hilfe der PCR amplifizieren zu können, benötigt man Oligonucleotidprimer. Das sind kurze DNA-Fragmente, die komplementär zu definierten DNA-Bereichen sind und bestimmte zu amplifizierende DNA-Segmente als Start- und Stoppsignal flankieren. In Gegenwart von Desoxynucleotidtriphosphaten (dNTPs) können DNA-Polymerasen unter geeigneten Versuchsbedingungen die Primer zu Sequenzen verlängern, die zur einzelsträngig denaturierten DNA komplementär sind, so dass am Ende alle DNA-Moleküle doppelsträngig vorliegen. Der Doppelstrang wird durch Erhitzen wieder aufgespalten und nach erneuter Anlagerung der Primer kann die Polymerase unter entsprechenden Temperaturbedingungen wiederum komplementäre Stränge bilden. Dieser temperaturgesteuerte Mechanismus wird im Thermocycler (Eppendorf) mehrere Male wiederholt, so dass am Ende mehrere Kopien des gewünschten DNA-Stranges vorliegen. Zur Detektion der *Prnp*^{0/0}-Sequenz wurden in einer ersten PCR-Reaktion die Primer *RK1*, *RK2* und *RK3* eingesetzt. Für die Identifizierung des F35-Transgenallels wurden in einer zweiten PCR-Reaktion die Primer *P0/0*, *E2* und *Mut217* verwendet. In Tabelle 1 sind die Sequenzen der für beide PCR-Reaktionen verwendeten Primer dargestellt. Alle Primer wurden über die Firma MWG Biotech AG bezogen.

Primer	Sequenz
<i>RK1</i>	5'-TCA GCC TAA ATA CTG GGC AC-3'
<i>RK2</i>	5'-GCC TAG ACC ACG AGA AAT GC-3'
<i>RK3</i>	5'-GCA TCA GCC ATG ATG GAT AC-3'
<i>Mut217</i>	5'-CCT GGG ACT CCT TCT GGT ACC GGG TGA CGC-3'
<i>E2</i>	5'-CAA CCG AGC TGA AGC ATT CTG CCT-3'
<i>P0/0</i>	5'-ATT CGC AGC GCA TCG TCG CCT TCT ATC GCC-3'

Tabelle 1: Primer mit den dazugehörigen Sequenzen für die F35-PCR

Die Primerbindungsstellen, die resultierenden PCR-Produkte und die Amplikonlängen sind schematisch in Abbildung 8 gezeigt.

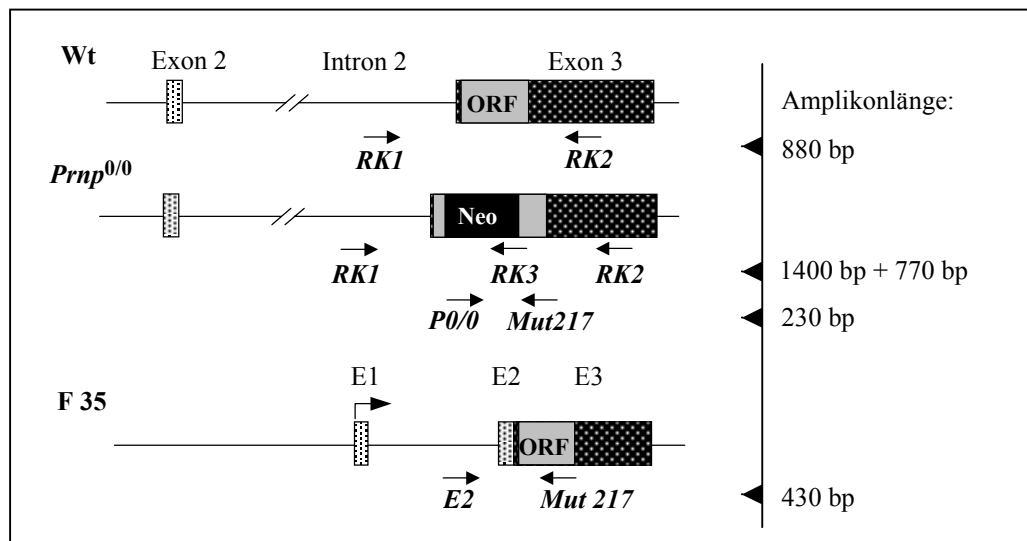


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Primerbindungsstellen.

Rechts sind die resultierenden Amplikonlängen dargestellt, die durch die jeweilige Primerkombination definiert werden. Die 1400 bp-Bande wird aufgrund der Konkurrenzreaktion zwischen RK2 und RK3 nicht amplifiziert.

Der Reaktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen (die Mengenangaben beziehen sich jeweils auf die Analyse einer DNA-Probe):

10 x Reaktionspuffer (Promega)	5,0 µl
Primer 1 (25 pM)	0,4 µl
Primer 2 (25 pM)	0,4 µl
Primer 3 (25 pM)	0,4 µl
dNTP-Mix (10 nM, Invitrogen)	0,4 µl
Taq DNA Polymerase (5 U/µl, Promega)	0,4 µl
MgCl ₂ (25 mM, Promega)	3,0 µl
H ₂ O _{bidest}	38,0 µl
DNA (200ng/µl)	2,0 µl

Die einzelnen Reaktionsansätze wurden in 0,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und in einen Thermocycler (Eppendorf) platziert. Folgende PCR-Programme wurden verwendet:

PCR 1: Wt / *Prnp*^{0/0}

95 ° C	4'	
95 ° C	1'	} 10 x
60 ° C	30"	
72 ° C	1'	
95 ° C	1'	} 25 x
55 ° C	1'	
72 ° C	1'	

PCR 2: F35

95 ° C	5'	
95 ° C	30"	} 35 x
60 ° C	39"	
72 ° C	1'	
72 ° C	5'	

Der Nachweis der amplifizierten DNA-Fragmente geschah durch Auftrennung mittels der Gelelektrophorese in einem 1 %igen Agarosegel mit 0,003 % Ethidiumbromid bei einer Spannung von 80 mV. Die Identifizierung und Charakterisierung der resultierenden Banden erfolgte mittels UV-Licht (siehe Abbildung 9). Als Standard diente eine 1 kb Leiter (Bio Labs).

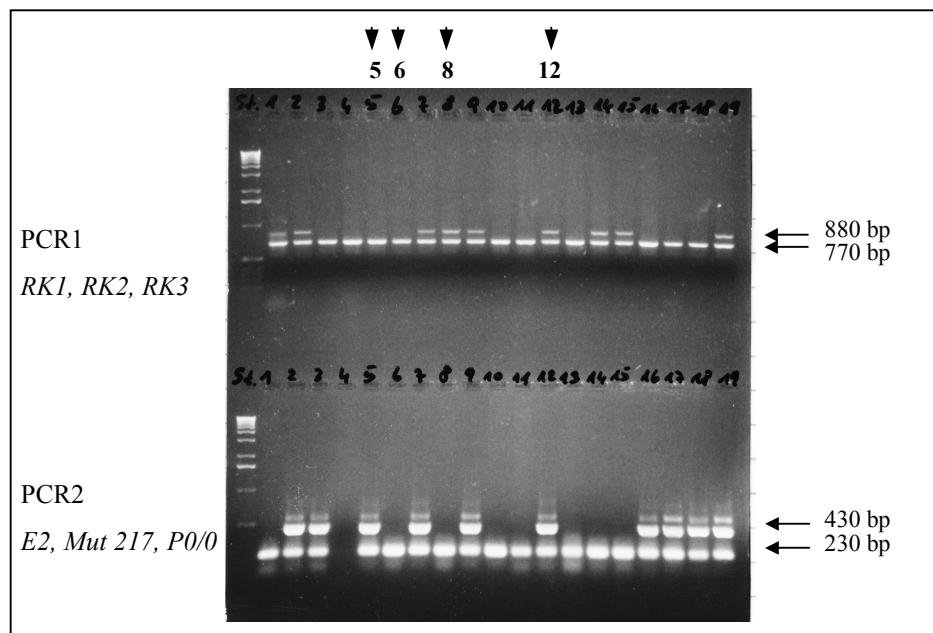


Abbildung 9: Auftrennung der Amplikons durch Gelelektrophorese.

Anhand des Bandenmusters lässt sich der Genotyp der einzelnen Tiere identifizieren: Spur 5: $tg^{+/0} Prnp^{0/0}$ (Phänotyp), Spur 6: $tg^{0/0} Prnp^{0/0}$ (knock-out-Maus), Spur 8: $tg^{0/0} Prnp^{+/0}$ (Wt-Kontrolle), Spur 12: $tg^{+/0} Prnp^{+/0}$ (Zucht-, Kontrolltier). St = Standard (1 kb Leiter).

2.3 Herstellung transversaler Kleinhirnschnitte

Zur Messung der synaptischen Übertragung wurden vitale Kleinhirnschnitte von Mäusen der in Kapitel 2.1 beschriebenen verschiedenen transgenen Linien herangezogen. Die Präparation der Transversalschnitte erfolgte nach dem Protokoll von ILANO *et al.* (1991). Für die Herstellung von Kleinhirnschnitten zur *patch-clamp*-Analyse wurden Mäuse im Alter von 18 - 21 Tagen benötigt. Die chloroformierten Mäuse wurden durch cervikale Dislokation getötet, dekapitiert und das Gehirn in eisgekühlter carbogenbegaster (5 % CO₂, 95 % O₂) artifizieller Cerebrospinalflüssigkeit (EZL, siehe Kapitel 2.9) herauspräpariert. Um die Aktivität der Neuronen auf niedrigem Niveau zu halten, war in der Präparationslösung die Ca²⁺-Konzentration auf 0,5 mM reduziert. Anschließend erfolgte die Abtrennung des Kleinhirns, wobei darauf zu achten war, dass die Meningen weitgehend entfernt wurden. Transversale Kleinhirnschnitte von 150 µm Dicke wurden mittels eines Vibratoms (Leica VT 1000 E) geschnitten. Die Hirnschnitte wurden in ebenfalls carbogenbegaste EZL (2 mM CaCl₂, 35° C) überführt. Nach einer Erholungszeit von einer Stunde konnten die Schnitte in die Messkammer überführt werden.

2.4 Cerebelläre Körnerzellkulturen

Für die Messung von Ionenströmen durch spannungssensitive Kalziumkanäle wurden neuronale Primärzellkulturen aus dem Kleinhirn junger Mäuse der Linien *Wt*, *Prnp^{0/0}* und *Fyn^{0/0}* herangezogen, die zu etwa 80 % aus Körnerzellen bestanden. Die Kulturen wurden nach folgendem Schema angefertigt:

Vorbereiten der Kulturgefäße

Runde Deckgläschen (Menzel-Gläser, Ø = 13 mm) wurden in 1M HCl über Nacht auf einem Laborschüttler gereinigt, anschließend mit *aqua bidest.* und 70 %igem Ethanol gespült und zur Lagerung in 96 %igen Ethanol überführt. Unter der Sterilbank wurden die abgeflamten Deckgläschen in 4-Kammerkulturschalen (Nunc) platziert und jeweils mit 40 µl PDL-Lösung (Poly-D-Lysin, 0,05 mg/ml) beschichtet, um den Neuronen einen optimalen Haftgrund zu bieten. Derart präparierte Kulturschalen ließen sich bei 4 ° C über mehrere Wochen lagern.

Präparation neuronaler Primärzellkulturen

Die Generierung der cerebellären Körnerzellkulturen erfolgte nach dem Protokoll von HERMS *et al.* (2000). Zur Herstellung von Körnerzellkulturen wurden 3 - 4 (je nach Neuronendichte) fünf Tage alte Mäuse für zwei 4er Kulturschalen benötigt. Die chloroformierten Tiere wurden dekapitiert und das Kleinhirn in warmer HBSS (Hank's balanced salt solution) herauspräpariert. Dabei war unbedingt zu beachten, dass die Meningen entfernt wurden, da diese die Dissoziation der Neuronen bei den weiteren Präparationsschritten behinderten.

Die folgenden Schritte wurden soweit als möglich unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Cerebella wurden in temperierter HBSS (37 ° C, 0,8 ml pro Kleinhirn) für ca. 2 min mit der Pipette trituriert und anschließend bei 37 ° C trypsinisiert (0,125 ml Trypsin / ml HBSS). Nach 10 Minuten musste die Enzymreaktion mittels Zugabe von DMEM-Kulturlösung (+ 10 % FCS, + 2 mM Glutamin, + 1 % Penicilin / Streptomycin-Lösung, 37 ° C, 1 ml pro Cerebellum) gestoppt und die Lösung nochmals für ca. 2 min zur Vereinzelung der Zellen mit der Pipette dispergiert werden. Diese Zellsuspension wurde für 2 min auf Eis gestellt oder alternativ kurz zentrifugiert (10 s, 1.000 U/min, RT), damit sich noch vorhandene Meningenteile absetzten. Der Überstand wurde abgenommen und 10 min bei 1.500 U/min und 21 ° C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 2 ml DMEM-Kulturlösung (s. o.) pro 4er Kulturgefäß resuspendiert und 0,5 ml der Zellsuspension in jedes Kulturfach pipettiert (Zelldichte: 1,5 - 2 x 10⁴ Zellen / cm²). Die Kulturgefäße wurden bei 37 ° C und 5 % CO₂ im Kulturschrank gelagert. Auf diese Weise präparierte Kulturen enthielten etwa 80 % Körnerzellen, die durch ihre ovoide, zumeist bipolare Form, mikroskopisch leicht erkennbar waren. Der Restanteil bestand vorwiegend aus Astrozyten, die sich durch ihre sternförmigen Verzweigungen gut von den Neuronen differenzieren ließen, und Mikroglia. Die *patch-clamp*-Messungen an kultivierten Körnerzellen erfolgten am 3. - 5. Tag in Kultur.

2.5 Elektrophysiologie

Die von NEHER und SACKMANN (1976) entwickelte *patch-clamp*-Technik ermöglicht es, auf der einen Seite sowohl transmembrane Ströme der gesamten Zellmembran von Neuronen als auch den Strom durch einzelne Ionenkanäle zu messen und ebenfalls das Membranpotential der 'gepatchten' Zelle zu modulieren. Die *patch-clamp*-Technik stellt ein spezielles Spannungs-Klemm-Verfahren (engl.: *voltage-clamp*) dar und funktioniert auf der Basis eines negativen Rückkopplungsmechanismus. Das heißt, es wird aufgrund von Änderungen des Membranpotentials einer gepatchten Zelle ein Kompensationsstrom generiert, der der Potentialmodulation entgegenwirkt und somit die Spannung über der Zellmembran während eines Experimentes konstant hält. Dieser Kompensationsstrom repräsentiert den Ionenstrom durch eine Membran und kann mittels des *patch-clamp*-Aufbaus gemessen werden.

Bei der *patch-clamp*-Technik wird eine spitzgezogene Glaskapillare (Spitzendurchmesser: 1 - 2 μm) unter visueller Kontrolle in sehr engen Kontakt mit der Zellmembran gebracht (*cell-attached*-Konfiguration). Die Glaspipette ist gefüllt mit einer artifiziellen Intrazellulärflüssigkeit und bildet zusammen mit einer chlorierten Silberelektrode die *Patchelektrode*. Die stabile Membran-Glas-Verbindung mit Widerständen im Gigaohm-Bereich (engl.: *Gigaohm-seal*) bewirkt durch die elektrische Abschirmung des Membranflecks (engl.: *patch*) von seiner Umgebung ein sehr gutes Signal-Rausch-Verhältnis. Die Stabilität der Verbindung zwischen Elektrode und der Membran erlaubt es, mechanische Manipulationen der Membran durchzuführen, ohne den hochohmigen Abdichtwiderstand zu zerstören. So wird bei der *whole-cell*-Konfiguration (engl. für Ganzzell-Anordnung), die bei fast allen Experimenten angewandt wurde, das Membranstück unterhalb der Pipettenöffnung durch ruckartiges Ansaugen herausgerissen und man erhält einen niederohmigen Zugang zum Zellsoma (Abbildung 10). Während dieser Konfiguration tauscht sich das Zytoplasma durch Diffusion schnell mit der Pipettenlösung aus und es ergibt sich ein definiertes Ionenverhältnis im Innern der Zelle, das durch die Wahl der Intrazellulärlösung (IZL, siehe Kapitel 2.9) bestimmt wird. Man kann solche Ergebnisse von Ganzzellmessungen als Mittelung vieler simultan aktiver Ionenkanäle auffassen. Messbar ist sozusagen das makroskopische Strommuster einer Zelle, ohne dass man den Beitrag einzelner Ionenkanäle

aufschlüsseln kann. Im Optimalfall bleibt der seitliche Leckwiderstand erhalten und somit der Leckstrom gering, so dass der Ionenstrom durch die gesamte verbleibende Zellmembran messbar wird. Vom Operationsverstärker (im Vorverstärker integriert) werden Spannungsänderungen über der Membran registriert und durch Initiierung eines Kompensationsstromes über die *Patchpipette* ausgeglichen. Im günstigsten Fall stellt dieser Kompensationsstrom das Äquivalent des transmembranen Ionenstromes dar.

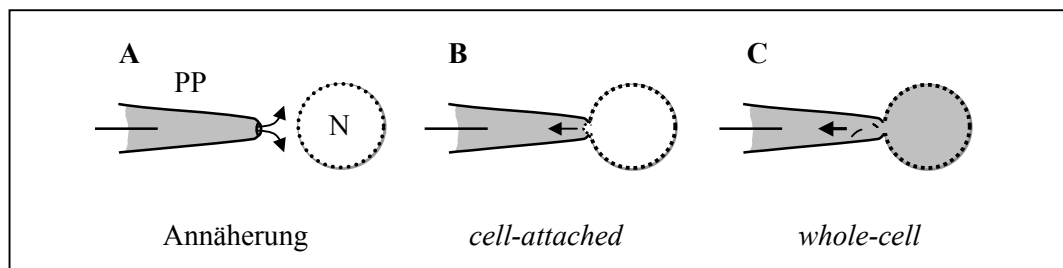


Abbildung 10: Generierung der *whole-cell*-Konfiguration.

Das Annähern der Pipette an die Zelle (A) muss unter angelegtem Überdruck geschehen, um ein Verschmutzen der Öffnung zu vermeiden. Nachdem der Gigaseal unter leichtem Unterdruck etabliert wurde (B), wird die Zellmembran unter Beibehaltung des Gigaseals durch kurzes kräftiges Saugen durchbrochen und das Cytoplasma tauscht sich mit der IZL aus (C). PP: Patchpipette, N: Neuron.

2.5.1 Patch-clamp-Elektroden

Die Elektroden wurden aus Borosilikatglas-Kapillaren (Innendurchmesser 0,9 mm, Aussendurchmesser 1,5 - 1,8 mm, KIMAX-51°, Kimble Products) mittels eines Vertikalpullers (PA-10, E.S.F.) in zwei Zugschritten gefertigt. Für die Ganzzelleableitungen an Purkinjezellen und kultivierten Körnerzellen wurden Elektroden mit einem Öffnungswiderstand von 2 - 3 M Ω bzw. 4 - 5 M Ω verwendet.

2.5.2 Aufbau des Messplatzes

Die optische Einheit bestand aus einem aufrechten Mikroskop (Olympus BX50WI), ausgestattet mit einem Wasserimmersionsobjektiv (Olympus LUMPlanFI, 60x). Zur Überwachung der Messung wurde das mikroskopische Bild mittels einer Digitalkamera (KAPPA CSI) auf einem Monitor abgebildet. Das zu untersuchende Präparat wurde in die mit carbogenbegastem Medium durchspülte Badkammer platziert (Durchflussrate 1,5 - 2 ml/min), die unter dem Objektiv durch zwei Mikro-manipulatoreinheiten in horizontaler Ebene justiert werden konnte.

Die *patch-clamp*-Einheit bestand aus einem motorgesteuerten Mikromanipulator (LN mini / combi, Luigs & Neumann), der über eine Aufnahme für den Vorverstärker verfügte, und der eigentlichen *patch-clamp*-Apparatur. Der Vorverstärker besaß eine Aufnahme für den Pipettenhalter, in den die *Patch*pipetten eingesetzt wurden, und verfügte über einen Erdungseingang für die Badelektrode. Der Operationsverstärker, der den Kompensationsstrom reguliert, ist Teil des Vorverstärkers. Ausgehend vom Vorverstärker wurde das analoge Stromsignal zum *patch-clamp*-Verstärker (EPC 9, HEKA) geleitet. Der EPC 9 wurde über ein leistungsfähiges Computersystem (Macintosh, G4) angesteuert. Mittels der speziell für *patch-clamp*-Messungen entwickelten Software (Pulse 8.50, HEKA) konnte das analog aufgenommene Signal durch den AD-Wandler des EPC 9 digitalisiert dargestellt werden.

Der Messplatz war mit einem zweiten Mikromanipulator ausgestattet (Patchman, Eppendorf), der ebenfalls mit einer Pipettenaufnahme versehen war. Diese war mit einem Pulsgenerator zur Generierung von Strompulsen verbunden, der über den *patch-clamp*-Verstärker getriggert werden konnte. Mit diesem Aufbau war es möglich, am Hirnschnittpräparat zur Messung der Kurz-Zeit-Plastizität die präsynaptischen Axone mit Stromimpulsen zu stimulieren und die resultierenden postsynaptischen Antworten mit der *patch-clamp*-Einheit in digitalisierter Form darzustellen.

Der gesamte Messbereich (Mikroskop, Vorverstärker, Mikromanipulator) stand auf einem schwingungsgedämpften Tisch (TMC), um Vibrationen, die ein Verrutschen der Messpipette oder des zu untersuchenden Präparats zur Folge hätten, zu vermeiden. Zudem sorgte ein Farraday'scher Käfig für die nötige elektromagnetische Abschirmung, um übermäßiges elektrisches Rauschen während der Messungen zu verhindern.

2.5.3 Elektrische Eigenschaften der *whole-cell*-Konfiguration

Die Zellmembran kann man elektrisch durch ihren Widerstand (R_m) und eine dazu parallel angeordnete Kapazität (C_m) darstellen (siehe Abbildung 11). Im *whole-cell*-Modus, bei dem die Pipette mit dem Zellsoma leitend verbunden ist, liegt zwischen Silberdraht und Soma ein Widerstand (R_s) an. Im Idealfall entspricht dieser dem Pipettenwiderstand. Da sich jedoch nach dem Durchbrechen der Membran

Fragmente derselben in Pipettennähe befinden, erhöht sich der Serienwiderstand erheblich. Eine Erhöhung des Serienwiderstandes führt dazu, dass sich die Umladung des Kondensators (C_m) und der Kompensationsmechanismus zur Regulation der Spannung verlangsamen und somit Leitfähigkeitsveränderungen zeitverzögert und verzerrt wiedergegeben werden. Dadurch kann es passieren, dass das Potential der Zelle für eine gewisse Zeit vom Sollwert abweicht, was zu unerwünschten Depolarisationen der Zellmembran führt. Der *patch-clamp*-Verstärker verfügte über Schaltkreise, die diese Erhöhung des Serienwiderstandes kompensieren (*C-fast*-, *C-slow*-Kompensation). Während der Messungen kann ein erneutes Verschließen der Membran unter der *Patchpipette* (engl.: *resealing*) ebenfalls zu einer Erhöhung des Serienwiderstandes führen. Aufgrund dieser Tatsache musste während der laufenden Messung ständig der Serienwiderstand überprüft werden, um im Falle eines *resealings* die *whole-cell*-Konfiguration wieder herzustellen oder gegebenenfalls die Messung abubrechen.

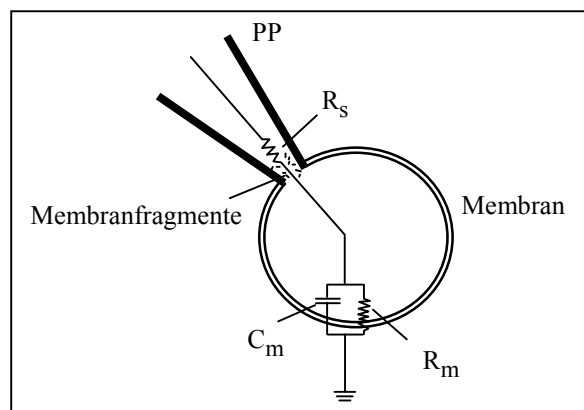


Abbildung 11: Ersatzschaltbild der *whole-cell*-Konfiguration (nach Numberger & Draguhn 1996).

Nach dem Durchbrechen der Zellmembran erhöht sich der Serienwiderstand durch Membranfragmente. *PP*: Patchpipette, R_s : Serienwiderstand, C_m : Membrankapazität, R_m : Membranwiderstand.

2.6 Messung synaptischer Ströme an Purkinjezellen

Der Kleinhirnschnitt wurde nach der Inkubationszeit in der Badkammer mit einem ‘*Grid*’ (U-förmiger Platindraht, der mit Nylonfäden bespannt war) fixiert. Für die Messung evozierter EPSCs wurde vor der Generierung des *Gigaohm*seals eine Stimulationselektrode mit einer Spitzenöffnung von ca. 3 μm und einem Pipetten-

widerstand von ca. 1 M Ω in etwa 200 - 300 μ m Entfernung von der Zielzelle auf der Molekularschicht platziert (monopolare Stimulation, siehe Abbildung 12B). Der Aufbau der Stimulationselektrode entsprach dem der *Patch*elektrode mit der Ausnahme, dass die Pipette statt mit der Intrazellulärflüssigkeit mit der Badlösung gefüllt wurde.

Nach Generierung des Gigaseals wurde *nach C-fast-Kompensierung* die *whole-cell*-Konfiguration herbeigeführt. War die Membran unter der *Patch*pipette durch ruckartiges Ansaugen durchbrochen, so wurde die Erhöhung des Serienwiderstandes durch den *C-slow*-Mechanismus des *patch-clamp*-Verstärkers kompensiert.

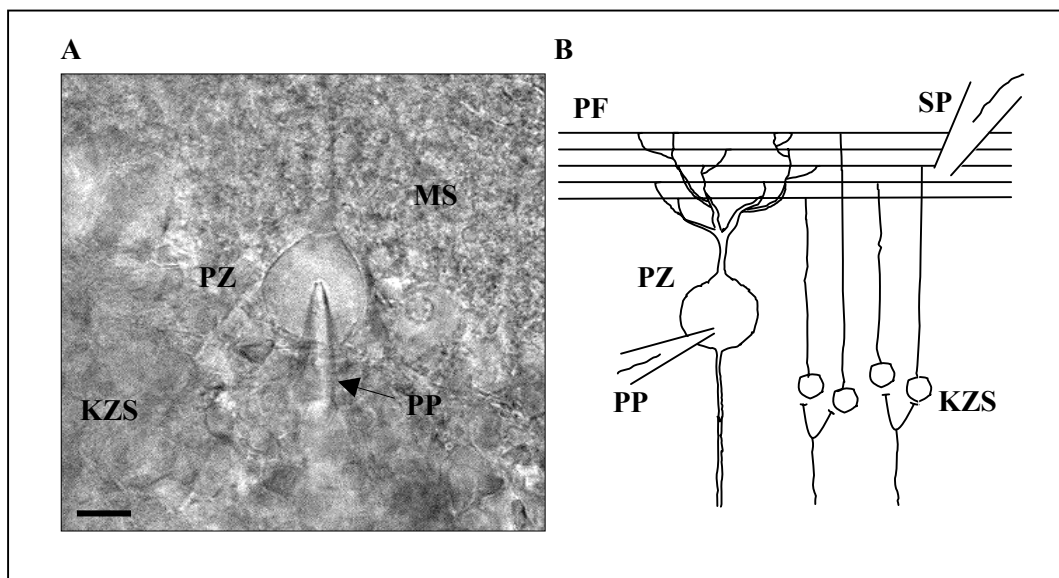


Abbildung 12: *Whole-cell*-Ableitung an Purkinjezellen.

A Lichtmikroskopisches Bild einer gepatchten Purkinjezelle im vitalen Kleinhirnschnitt. Balken entspricht 10 μ m.

B Schematische Anordnung der monopolen Parallelfaserstimulation. MS: Molekularschicht, PZ: Purkinjezelle, PP: Patchpipette, KZS: Körnerzellschicht, PF: Parallelfasern, SP: Stimulationspipette.

Durch die Stimulation der Parallelfasern der Molekularschicht kommt es zur Vesikelausschüttung an der glutamatergen Synapse zwischen Körnerzellen und Purkinjezellen. Die Transmitterbindung an den non-NMDA-Rezeptoren der Purkinjezelle führt zu einem Ioneneinstrom, der mittels der *whole-cell*-Ableitung messbar ist. Die Gesamtheit der aus einem Stimulus resultierenden postsynaptischen Ströme durch die Membran wird als EPSC (engl.: *excitatory postsynaptic current*)

bezeichnet. Variiert wurden sowohl Amplitude als auch Frequenz der Stimulation. Folgende Messprotokolle wurden angewandt:

Kalibrierung des Stimuluspulses

Zur Festsetzung der Stimulusintensität wurde nach erfolgter Generierung der *whole-cell*-Konfiguration die Stromstärke während der Applikation von Einzelstimpulsen von 0,2 ms Länge bei einer Frequenz von 1 Hz am Pulsgeber derart variiert, dass resultierende EPSCs eine Mindestamplitude von 150 - 200 pA aufwiesen (Kapitel 2.8, Protokoll 1.1). Dabei war darauf zu achten, dass eine zu hoch gewählte Stromstärke nicht zu einer übermäßigen Depolarisation der Purkinjezellmembran führte. Die Stimulusintensität wurde für jede Zelle neu bestimmt und lag in der Regel zwischen 1 - 10 mV. Zur Inhibierung spontaner oder evozierter inhibitorischer postsynaptischer Ströme, die die Messung verfälschen, war der Badlösung der GABA-Antagonist Bicuculin in einer Konzentration von 15 μ M zugefügt.

Doppelpulsstimulation

Nach der Kalibrierung der Stimulusstärke wurden gepaarte Pulse über die Stimulationselektrode mit einer Frequenz von 0.5 Hz auf die Parallelfaserschicht appliziert, um die Doppelpuls-Verstärkung (PPF, engl.: *paired pulse facilitation*) zu messen. Die Interstimulusintervalle wurden in einem Bereich zwischen 50 ms und 400 ms variiert (Kapitel 2.8, Protokoll 1.2). Zwischen den einzelnen Doppelpulsen wurde der *Gigaohm*seal durch einen 5 mV Hyper- bzw. Depolarisationspuls überprüft. Die Amplitude der EPSCs wurde im Programm Pulse (HEKA) gemessen und als Verhältnis des 2. zum 1. Stimulus gegen die Intervalllänge aufgetragen.

Repetitive Stimulation

Die repetitive Stimulation und das Antwortverhalten der Zielzelle war ein weiterer Mechanismus, um die Kurzzeitplastizität einer Synapse zu testen. Dazu wurden über die Stimuluspipette 30 Einzelpulse mit einer Frequenz von 14 Hz auf die Parallelfasern gegeben (Kapitel 2.8, Protokoll 1.3) und die resultierenden EPSCs an der Purkinjezelle aufgezeichnet. Aufgenommen wurden die Amplituden der Einzelsignale und diese ins Verhältnis zur Amplitude des ersten EPSC gesetzt.

Langzeitstimulation

Um den Effekt von Kupfer, das durch das Prionprotein gebunden ist, auf die synaptische Plastizität zu testen, wurde ein Messprotokoll herangezogen, bei dem über einen Zeitraum von 16 Minuten bei einer Frequenz von 0.03 Hz durch Doppelpulse evozierte EPSCs aufgezeichnet wurden (Kapitel 2.8, Protokoll 1.4). Das Interstimulusintervall betrug 75 ms. Nach einer Minute wurde der Badlösung kontinuierlich 2 μM Ca-EDTA zugeführt, um Kupferionen zu chelieren. Ausgewertet wurden wiederum die Amplituden der einzelnen EPSCs im Verhältnis zur Mittelwertamplitude der postsynaptischen Ströme vor der Ca-EDTA-Applikation.

2.7 Messung spannungsaktivierter Kalziumströme an Körnerzellen

Für die *patch-clamp*-Messungen wurde ein mit kultivierten Körnerzellen bewachsenes Deckglas in der Badkammer fixiert. Die Generierung der *whole-cell*-Konfiguration ausgewählter Zielzellen (Abbildung. 13) erfolgte wie in Kapitel 2.5 beschrieben.

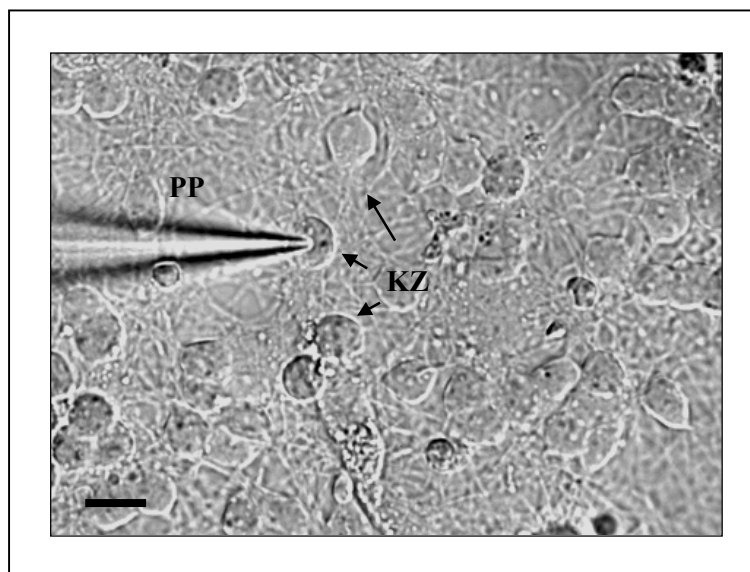


Abbildung 13: Lichtmikroskopisches Bild einer Körnerzellkultur mit gepatchter Körnerzelle. Maßgeblich für die Identifizierung war die ovoide Form der einzelnen Körnerzellen. PP: Patchpipette, KZ: Körnerzellen, Balken entspricht 5 μm .

Ruhemembranpotentialmessungen

Zur Messung von Membranpotentialen wurde direkt nach Durchbrechen der Membran in die Stromklemmenanordnung (engl.: *current-clamp*-Modus) des *patch-clamp*-Verstärkers umgeschaltet. Hierbei war der Strom durch die Membran fest vorgegeben und das Potential variabel gehalten. Durch die Justierung des Stromes auf 0 mV konnte das Ruhemembranpotential von Wt- und *Prnp*^{0/0}-Körnerzellen ermittelt werden.

Messung membranpotentialabhängiger Kalziumströme

Das Haltepotential während der Messungen betrug -70 mV. Die Zellen wurden durch de- und hyperpolarisierende Spannungssprünge von 300 ms Länge bei einer Frequenz von 0,67 Hz stimuliert und der resultierende Ionenstrom aufgezeichnet. Das Membranpotential wurde dabei in 20 mV-Schritten von -100 mV bis +60 mV angehoben (Kapitel 2.8, Protokoll 2.1). Zur genauen Bestimmung des Membranpotentials, an dem die Amplitude des Ioneneinstroms maximal war, wurde ein weiteres Stromspannungsprotokoll angewandt, bei dem die Spannung im Bereich des Maximums von -10 mV bis +35 mV in 5 mV-Schritten variiert wurde (Kapitel 2.8, Protokoll 2.2). Die Öffnungskinetik von Kalziumströmen konnte mit einer Spannungsrampe (Kapitel 2.8, Protokoll 2.3) ermittelt werden. Hierbei wurde das Membranpotential transient von -100 mV bis +60 mV erhöht. Die Zugabe von Tetraethylammoniumchlorid (TEACl) in die Badlösung inhibierte spannungssensitive Kaliumströme, die mit den zu detektierenden Signalen interferiert hätten.

Am Ende jedes Messzyklusses wurde der Badlösung 100 µM CdCl₂ zugesetzt. Kadmium blockiert selektiv spannungssensitive Ca²⁺-Kanäle, so dass der Kalzium-Netto-Strom durch Subtraktion der nicht blockierbaren Ströme berechnet werden konnte.

Pharmakologische Unterscheidung der VGCCs

Um den Anteil von L-Typ und N-Typ-Kanälen bei Körnerzellen von Wt- und *Prnp*^{0/0}-Mäusen zu ermitteln, wurden nach Bestimmung der Basalströme (Kapitel 2.8, Protokoll 2.1) Messungen in Gegenwart der beiden Kalziumkanalblocker Nifedipin (2 µM, L-Typ-spezifisch) und Omega-Conotoxin (ω-CgTx GIVA, 1 µM, N-Typ-spezifisch) durchgeführt.

Effekt von rekombinantem PrP (recPrP) auf spannungssensitive Kalziumkanäle

Zur Simulation der Wirkung von extrazellulärem PrP auf VGCCs wurden *patch-clamp*-Messungen vor und nach Applikation von in Puffer gelösten Peptiden bzw. Proteinen in die Badlösung durchgeführt (Kapitel 2.8, Protokoll 2.1, 2.2). Vorab waren mit den gleichen Messprotokollen die basalen Kalziumströme bestimmt worden. Eine Auflistung der verwendeten rekombinanten Proteine und Proteinfragmente, ihrer Konzentrationen und der Pufferbedingungen findet sich in Tabelle 2. Während einer Inkubationszeit von 2 Minuten, wurde die Badperfusion gestoppt. Gleichzeitig erfolgte eine kontinuierliche Aufzeichnung der Spontanaktivität der Zelle (Kapitel 2.8, Protokoll 2.4), um mögliche, durch die Applikation induzierten Ströme zu detektieren sowie zur Überprüfung der Stabilität des hochohmigen Kontaktes. Überschritt der Leckstrom zwischen Pipette und Membran den Wert von 30 pA, wurde die Messung abgebrochen.

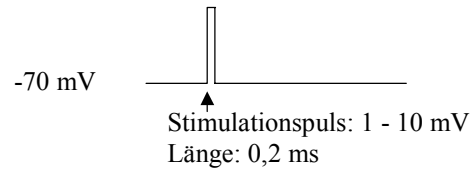
Agentien	Konzentration (nM)	Puffer
BSA	250 nM	TEACl
Cytochrom c	250 nM	TEACl
Lysozym	250 nM	TEACl
<i>mur</i> PrP ²³⁻²³¹	0-500 nM	TEACl
		TEACl + Nif (1 µM)
<i>bov</i> PrP ²³⁻²³¹	250 nM	TEACl
<i>hum</i> PrP ²³⁻²³¹	250 nM	TEACl
		TEACl + EDTA (2 µM)
		TEACl + CuCl ₂ (1 µM)
<i>hum</i> PrP ²³⁻¹¹²	250 nM	TEACl
<i>hum</i> PrP ²³⁻⁹⁸	250 nM	TEACl
<i>hum</i> PrP ⁶⁰⁻⁹¹	250 nM	TEACl
<i>hum</i> PrP ¹²¹⁻²³¹	250 nM	TEACl
CuCl ₂	1 / 10 µM	TEACl

Tabelle 2: Auflistung aller zur Applikation verwendeten Agentien. RecPrP und seine Teilfragmente wurden unmittelbar vor dem Versuch im Puffer gelöst.

2.8 Messprotokolle

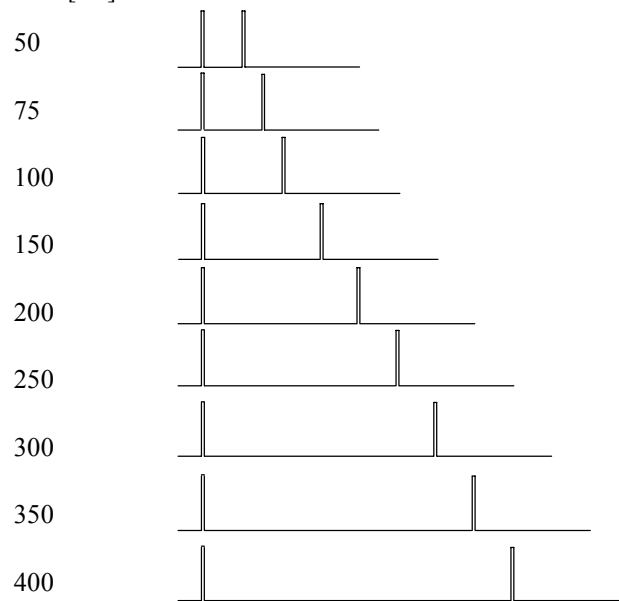
Purkinjezell-EPSC-Messungen

1.1 Kalibrierung des Stimuluspulses



1.2 Doppelpulsstimulation

Pulsintervall [ms]



1.3 Repetitive Stimulation



30 Einzelpulse, 14 Hz

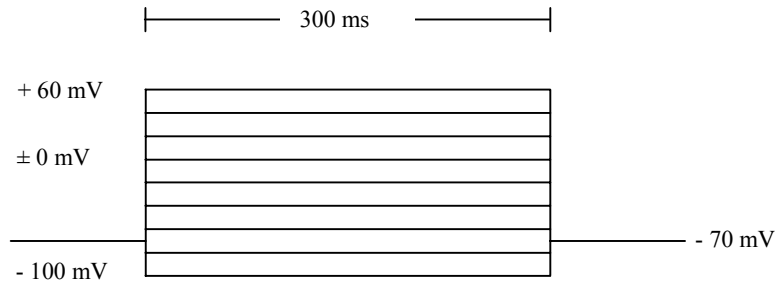
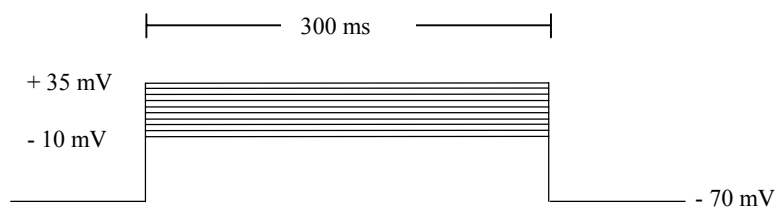
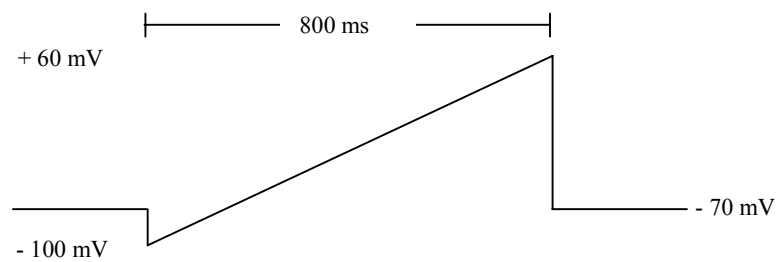
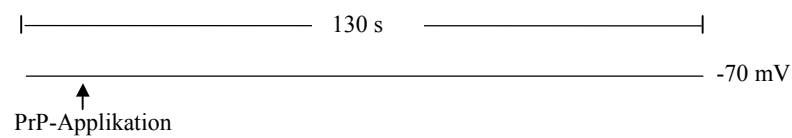
1.4 Langzeitstimulation

EDTA 2 μ M



60 Doppelpulse, Pulsintervall 75 ms, 0,03 Hz

EDTA-Applikation nach 1 min

Körnerzellmessungen**2.1 Spannungstreppe 20 mV****2.2 Spannungstreppe 5 mV****2.3 Spannungsrampe****2.4 Basal-Strom-Aufzeichnung**

2.9 Lösungen

EZL / IZL zur EPSC-Messung an Purkinjellen

Extrazellular- / Badlösung

Chemikalie	Konzentration (mM)
NaCl	125
KCl	2,5
NaH ₂ PO ₄	1,25
NaHCO ₃	26
CaCl ₂	2
MgCl ₂	1
Glukose-Monohydrat	25

pH 7,4 mit NaOH eingestellt
Osmolarität: 296 mOsm

Zur Blockierung inhibitorischer Synapsen während der EPSC-Messungen enthielt die Badlösung 15 μ M Bicuculin.

Intrazellular- / Pipettenlösung

Chemikalie	Konzentration (mM)
CsCl	145
HEPES	10
EGTA	10
CaCl ₂	1
MgCl ₂	2
Na ₂ -ATP	4
Na ₃ -GTP	0,4

pH 7,4 mit CsOH eingestellt
Osmolarität: 296 mOsm

EZL / IZL zur Messung spannungsaktivierter Ca^{2+} -Ströme bei Körnerzellen**Extrazellular- / Badlösung**

Chemikalie	Konzentration (mM)
TEACl	148
KCl	4
CaCl_2	10
MgCl_2	1
HEPES	10

pH 7,4 mit TEAOH eingestellt
Osmolarität: 320 mOsm

Folgende Toxine dienen zur pharmakologischen Differenzierung der einzelnen Kanaltypen:

Toxin	Kanalspezifität	Konzentration (μM)
Nifedipin	L-Typ	2
ω -Conotoxin GIVA	N-Typ	1
Cd^{2+}	Keine	100

Intrazellular- / Pipettenlösung

Chemikalie	Konzentration (mM)
CsCl	120
CsF1	20
MgCl_2	4
EGTA	10
Na_2 -ATP	4
HEPES	10

pH 7,4 mit CsOH eingestellt
Osmolarität: 320 mOsm

2.10 Datenaufnahme und Auswertung

Die Datenaufnahme der *patch-clamp*-Messungen erfolgte über das Programm Pulse 8.50 (HEKA). Die Auswertung und Darstellung der aufgenommenen Daten geschah mit dem Programm IgorPro (Wave Metrics) und dem Tabellenkalkulationsprogramm EXCEL (Microsoft). Die statistische Auswertung zur Prüfung der Signifikanz der erhobenen Mittelwerte wurde mit dem EXCEL-Statistik-Unterprogramm durchgeführt. Da alle Messungen über eine Stichprobenanzahl von $n < 30$ verfügten und die Ergebnisse normalverteilt waren, diente der t-Test für unabhängige Stichproben als statistisches Mittel zur Überprüfung der Signifikanz der Werte (aus SACHS 1997). Unterschiede zweier Mittelwerte waren mit $p < 0,05$ als signifikant eingestuft. Außerdem wurde bei allen Mittelwerten als Fehler der Standardfehler des arithmetischen Mittels (aus SACHS 1997) bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 Kurzzeitplastizität an der exzitatorischen Synapse priontransgener Mäuse

3.1.1 Doppelpulsverstärkung als Parameter für synaptische Kurzzeitplastizität

Zum Studium der synaptischen Übertragung an der exzitatorischen Synapse zwischen Parallelfasern und Purkinjezelle wurde der Mechanismus der Doppelpulsverstärkung (PPF, engl.: *paired pulse facilitation*) als Parameter der Kurzzeitplastizität herangezogen. Er beschreibt die Amplitudenerhöhung zweier kurz aufeinander folgender evozierter EPSCs (KONNERTH *et al.* 1990). In Abbildung 14 sind exemplarisch für die Doppelpulsverstärkung zwei EPSCs in kurzer Aufeinanderfolge aufgezeigt. Diesem postsynaptischen Antwortverhalten liegt eine wahrscheinlich kalziumabhängige Modulation der synaptischen Übertragung zugrunde (ZUCKER 1989). Bei Verlust synaptischer Proteine kann, wie gezeigt wurde, die PPF verändert sein (ROSAHL *et al.* 1993, SILVA *et al.* 1996, AUGUSTIN *et al.* 2001).

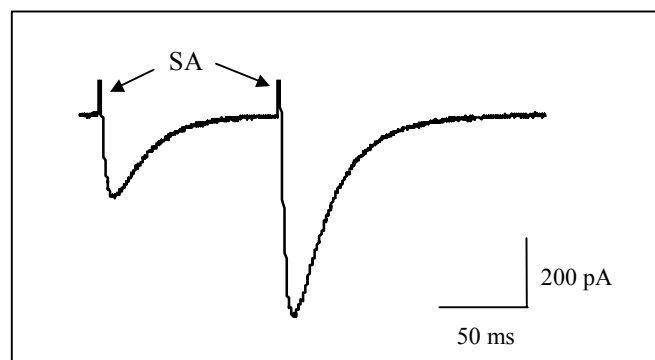


Abbildung 14: Stromsignal der Doppelpulsverstärkung.

Repräsentative Messung zweier EPSCs als Antwort auf einen präsynaptischen gepaarten Stimulus mit einem Interstimulusintervall von 100 ms. Beispielmessung aus einer EPSC-Messung an einer Purkinjezelle aus einem cerebellären Schnittpräparat einer 19 Tage alten Wildtyp-Maus. SA = Stimulusartefakt.

An Kleinhirnschnittpräparaten verschiedener transgener Mäuse, die das Prionprotein sowohl unterschiedlich stark als auch in verschiedenen Zelltypen sowie als deletiertes Protein exprimieren, wurden *patch-clamp*-Messungen an Purkinjezellen im *whole-cell*-Modus durchgeführt. Durch eine externe präsynaptische Stimulation der Parallelfasern wurde ein axonaler Stimulus simuliert, auf den bei Überschreitung

eines Schwellenwertes eine Transmitterausschüttung an der Präsynapse erfolgte. Die Transmitterbindung an postsynaptischen Ionenkanäle resultierte in einem Ioneneinstrom, der zu detektieren war.

Vor Beginn der eigentlichen Messung zur *paired pulse facilitation* (PPF) musste die Stimulationsstärke kalibriert werden. Dies erfolgte über eine transiente Anhebung der Stromstärke eines Einzelpulses von 0 mV bis maximal 10 mV, bis sich ein ausgeprägtes evoziertes EPSC von ausreichender Amplitude (> 100 pA) zeigte. Wie in Abbildung 15 dargestellt, stellte sich die postsynaptische Antwort als graduiertes Signal dar, das mit Stimulusstärke anwuchs.

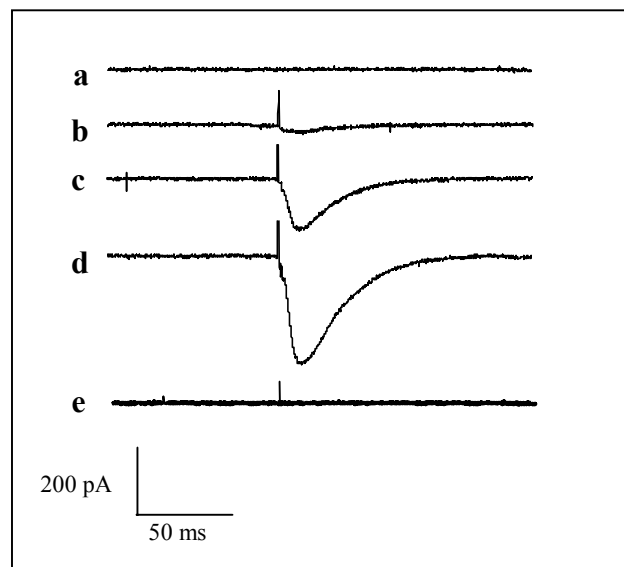


Abbildung 15: Kalibrierung des Stimuluspulses.

Gezeigt sind evozierte Beispiel-EPSCs bei (a) 0, (b) 1, (c) 5, (d) 10 mV Pulsstärke. Die transiente Anhebung der Stimulusstärke resultiert in einer graduierten postsynaptischen Stromantwort. Durch Applikation von CNQX (e, Stimulation mit 5 mV) konnte der postsynaptische Strom blockiert und somit die synaptischen Signale eindeutig als von non-NMDA-Rezeptoren herrührend identifiziert werden.

Erfolgten zwei Stimulationen der Parallelfasern in kurzem Intervall, so zeigte sich eine im Vergleich zum ersten EPSC erhöhte Amplitude des zweiten EPSC. Das Interstimulusintervall war maßgeblich für die Verstärkung der zweiten Antwort, die um so größer war, je kürzer dieses Intervall gewählt wurde (Abbildung 16).

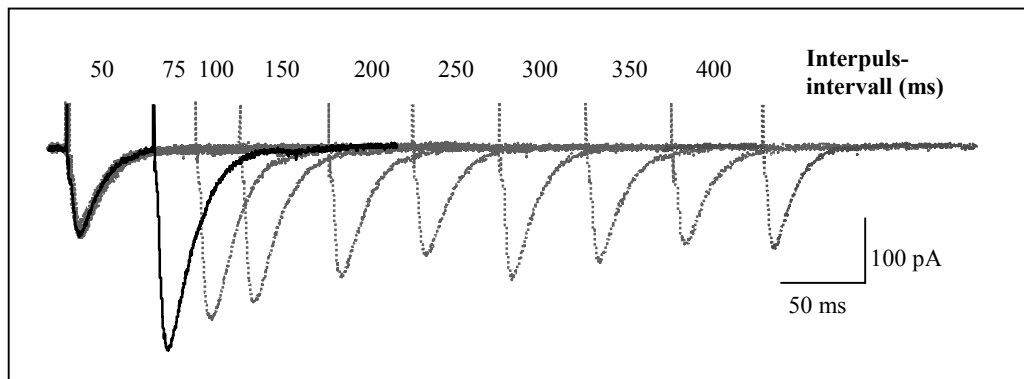


Abbildung 16: Die Doppelpulsverstärkung ist abhängig vom Interstimulusintervall. Dargestellt sind mehrere, übereinandergelegte, aus Doppelpulsstimulationen resultierende EPSCs. Das Interstimulusintervall wurde von 50 ms bis 400 ms variiert. Beispielmessung an einer Wt-Purkinjezelle einer 20 Tage alten Maus.

3.1.2 Kurzzeitplastizität ist unabhängig vom PrP-Expressionsniveau

Um den möglichen Effekt von PrP^C auf die Kurzzeitplastizität zu testen, wurden *patch-clamp*-Messungen an Purkinjezellen von 18 - 21 Tage alten Wildtyp- und *Prnp*^{0/0}-Tieren durchgeführt, wobei der Parameter der *paired pulse facilitation* genauer untersucht wurde. Beim Vergleich der Doppelpulsverstärkung von Wildtyp- und *Prnp*^{0/0}-Mäusen zeigte sich eine Überlappung der Standardabweichungen beider Kurven in allen Bereichen (Abbildung 17). Die *paired pulse facilitation* wurde somit nicht durch den Verlust des zellulären Prionproteins an der Synapse verändert.

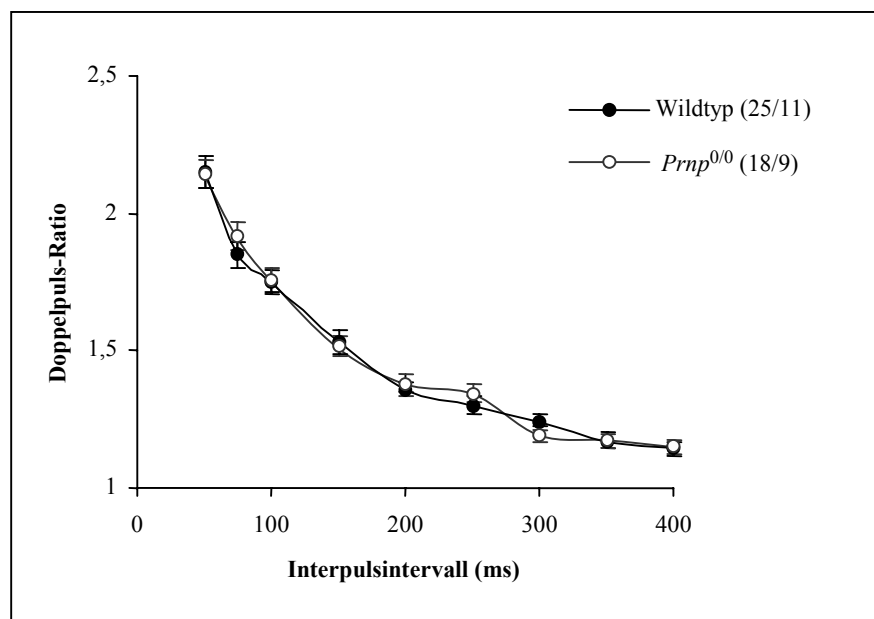


Abbildung 17: Unveränderte Doppelpulsverstärkung bei *Prnp*^{0/0}-Mäusen.

Der Graph beschreibt das Verhältnis der Amplitude vom 2. zum 1. EPSC als Funktion von 10 unterschiedlichen Interstimulusintervallen. Die Daten bilden den Mittelwert von 4 Messungen pro Zelle. Die Klammerausdrücke beschreiben die Anzahl der Zellen und der erforderlichen Präparationen (Wildtyp: 25 Zellen / 11 Tiere, *Prnp*^{0/0}: 18 Zellen / 9 Tiere). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Mittelwertdifferenz wieder (SEM, engl.: standard error of mean).

Bestätigt wurden diese Befunde durch einen zweiten Parameter zur Messung der Kurzzeitplastizität. Hinsichtlich der repetitiven Stimulation der Parallelfaserschicht mittels der Stimulationselektrode war ebenfalls keine Alterierung der postsynaptischen Stromantwort bei *Prnp*^{0/0}-Purkinjezellen festzustellen (Abbildung 18). Die beiden Kurven überschneiden sich ebenfalls in allen Bereichen.

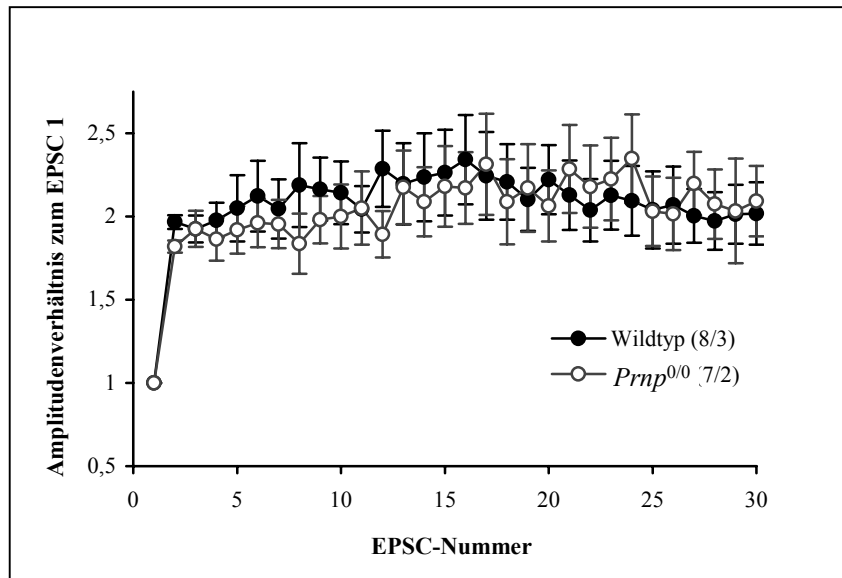


Abbildung 18: Unverändertes Antwortverhalten auf tetanische Stimulation bei *Prnp*^{0/0}-Purkinjezellen.

Die Punkte beschreiben die Amplitude von Einzel-EPSCs innerhalb eines 14 Hz-Stimulus im Verhältnis zum 1. EPSC. Es zeigt sich eine Überlappung der Kurven in allen Bereichen. Wildtyp: 8 Zellen / 3 Tiere, *Prnp*^{0/0}: 7 Zellen / 2 Tiere.

Fehlerbalken = SEM, dünn: *Prnp*^{0/0}.

3.1.3 PPF wird nicht durch Chelierung freier Kupferionen beeinflusst

Wie gezeigt wurde, scheint das zelluläre Prionprotein in die synaptische Kupferhomöostase involviert zu sein (BROWN *et al.* 1997a, HERMS *et al.* 1999), wobei es modulatorischen Einfluss auf den Kupfergehalt im synaptischen Spalt nehmen könnte. Ob sich die Kupferbindung von PrPC modulatorisch auf die exzitatorische synaptische Übertragung auswirkt, sollte im Folgenden betrachtet werden. Es wurden *patch-clamp*-Messungen an Purkinjezellen von 18 - 21 Tage alten Wildtyp- und *Prnp*^{0/0}-Mäusen durchgeführt, bei denen Kupferionen durch Zugabe eines Kupferchelators in die Badlösung gebunden wurden. Über einen Zeitraum von 20 Minuten wurde alle 30 Sekunden ein Doppelpuls mit einem

Stimulusintervall von 75 ms appliziert und die Amplituden der Einzel-EPSCs aufgenommen. Nach 5 Minuten Versuchszeit war der Badlösung 2 μM Ca-EDTA zugeführt worden. Wie in Abbildung 19 dargestellt, war bei *Prnp*^{0/0}-Zellen das Verhältnis der Amplitude des 2. EPSC zu der des 1. EPSC im Vergleich zu den Wildtypmessungen unverändert; die Kurven unterscheiden sich im Verlauf nicht signifikant voneinander. Auch eine Modulation des Amplitudenverhältnisses innerhalb der beiden Mauslinien, hervorgerufen durch die Ca-EDTA-Applikation, war nicht detektierbar.

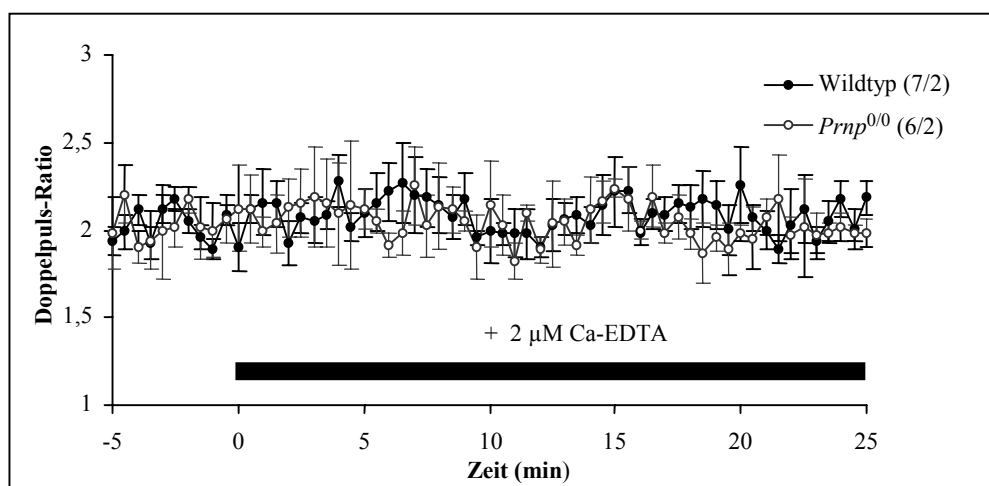


Abbildung 19: Die Chelierung von Kupferionen aus der Badlösung blieb ohne Einfluss auf die PPF.

Gemessen wurde die Doppelpulsverstärkung durch Applikation von 75 ms Doppelstimuli. Die Einzelpunkte resultieren aus dem Amplitudenverhältnis 2./1. EPSC. Die EDTA-Zufuhr nach 5 min Experimentdauer blieb ohne erkennbaren Effekt. Die Daten basieren auf 7 bzw. 6 Purkinjezellmessungen von jeweils 2 Wildtyp- und 2 *Prnp*^{0/0}-Präparationen. Fehlerbalken = SEM (dünn: *Prnp*^{0/0})

3.1.4 Mäuse, die aminoterminal verkürztes PrP exprimieren, zeigen normale Kurzzeitplastizität

Zum Studium des Einflusses des N-terminalen und C-terminalen Bereiches von PrP auf die synaptische Plastizität wurden Tiere herangezogen, die verkürztes PrP ohne die kupferbindende aminoternimale Domäne (PrP Δ 32-93) ausschließlich in den Körnerzellen 4-fach überexprimieren (C4-Maus, SCHMERLING *et al.* 1998). Auch hier wurden Messungen zur Doppelpulsverstärkung durchgeführt. Im Vergleich zu Wildtypmessungen zeigt sich auch hier bei den Untersuchungen zur *paired pulse*

facilitation adäquat zu *Prnp*^{0/0}-Zellen kein physiologisch auffälliger Phänotyp (Abbildung 20 A). F35-Mäuse exprimieren ebenfalls N-terminal trunkiertes zelluläres Prionprotein (SCHMERLING *et al.* 1998), wobei in Purkinjezellen, also auf postsynaptischer Seite, ebenfalls kein PrP detektierbar ist. Der deletierte Bereich ist bei dieser Linie im Vergleich zum C4-Konstrukt um 41 Aminosäuren erweitert (Δ 32-134). Die Mäuse entwickeln im Gegensatz zur C4-Maus einen auffälligen Phänotyp, der sich durch eine Ataxie bemerkbar macht. Um zu überprüfen, ob der beobachtete Phänotyp dieser Tiere im Zusammenhang mit der präsynaptischen Expression von trunkiertem PrP steht, die sich unter Umständen in einer alterierten Kurzzeitplastizität manifestiert, wurde auch bei dieser Mauslinie die Doppelpulsverstärkung an der exzitatorischen Synapse studiert. Da es sich um eine heterozygote Mauslinie handelt, konnten für die Messung der phänotypologisch auffälligen Tiere, die rein das deletierte PrP ausbilden, Kontrolltiere aus dem gleichen Wurf herangezogen werden. Nach der Kreuzung mit *Prnp*^{0/0}-Tieren entstehen sowohl hemizygot trunkiertes PrP ($\text{PrP}^{\Delta 32-134}$)-exprimierende als auch heterozygot $\text{PrP}^{\Delta 32-134}$ - und PrP^{C} -exprimierende und ausschließlich hemizygot PrP^{C} -exprimierende Tiere in ein und dem selben Wurf. Adäquat zu den C4-Mäusen zeigen auch die F35-Tiere keinen elektrophysiologisch messbaren Phänotyp (Abbildung 20 B). Die beobachtete Ataxie und Körnerzelldegeneration lässt sich also nicht auf eine Alterierung der Kurzzeitplastizität bei der exzitatorischen synaptischen Übertragung zurückführen.

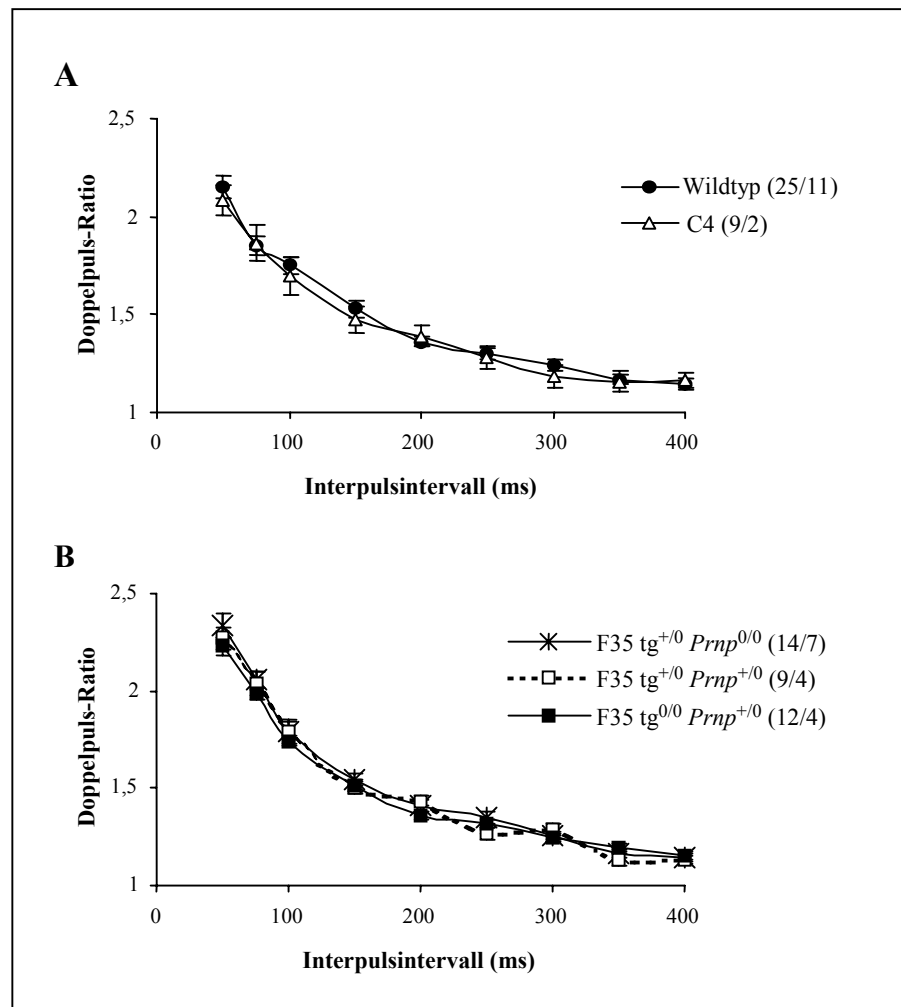


Abbildung 20: Doppelpulsverstärkung ist nicht von der Trunkierung des zellulären PrPs abhängig.

Sowohl die C4-Mutation mit einer Deletion von Aminosäure 32-93 (A) als auch die erweiterte Deletion (B, $\Delta 23-134$) bewirkten keine Alterierung der paired pulse facilitation an der exzitatorischen Synapse. Die Kurvenverläufe decken sich in allen Bereichen mit denen der Wildtyp- bzw. Kontrollmessungen. Fehlerbalken = SEM, Klammerausdruck (Zellen/Versuchstiere).

3.1.5 Postsynaptische Reinserierung von PrPC in *Prnp*^{0/0}-Mäuse führt zu einer Verminderung der PPF

Zur Aufklärung der prä- und postsynaptischen Funktion des zellulären Prionproteins wurden jeweils 4 Tiere der Linien Tg87 und Tg82, die PrPC rein postsynaptisch in den Purkinjezellen exprimieren, und 3 Tiere der Linie Tg20 verwendet. Letztere bilden PrPC im Cerebellum ausschließlich in den Körnerzellen 10-fach aus, also von der Synapse zwischen Parallelfaser und Purkinjezelle ausgehend, auf der präsynaptischen Seite. Die Ergebnisse der *patch-clamp*-Messungen zeigen, dass die zellspezifische Expression im Kleinhirn von entscheidender Bedeutung für die Kurzzeitplastizität an der exzitatorischen Synapse ist. So bedingte die rein purkinjezellspezifische postsynaptische Expression von PrPC im Gegensatz zur rein präsynaptischen Expression eine signifikante Abschwächung der *paired pulse facilitation* in Bereichen kleiner Interstimulusintervalle (Abbildung 21).

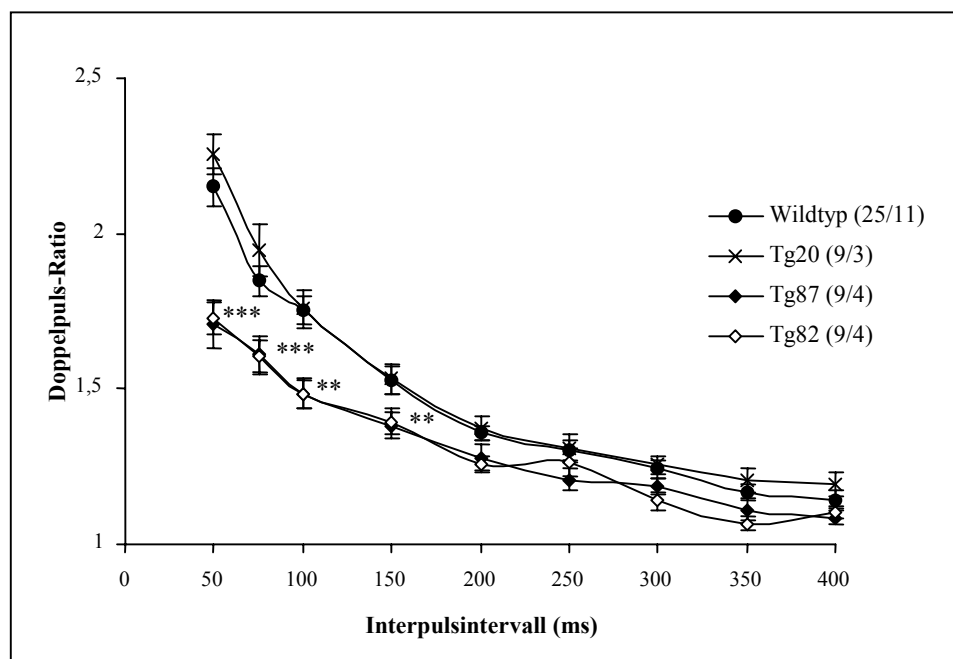


Abbildung 21: Alterierung der PPF durch rein postsynaptische Expression von PrP.

Im Gegensatz zur präsynaptischen Expression in Tg20-Tieren wies die Doppelpulsverstärkung bei Tg82 und Tg87 eine deutliche Verminderung auf, die bei kürzeren Interstimulusintervallen (50 - 150 ms) hochsignifikant erschien (** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$, *t*-Test). Die Messungen an Purkinjezellen aus Tg20-Tieren zeigen in allen Bereichen der Kurve Überlappungen mit der Referenzmessung.

3.2 Einfluss von zellulärem und rekombinantem Prionprotein auf spannungsaktivierte Kalziumkanäle

Diverse in Kapitel 1 beschriebene Studien postulieren eine funktionelle Integration des Prionproteins in die neuronale Kalziumhomöostase, wobei eine Interaktion des Prionproteins mit spannungssensitiven Kalziumkanälen diskutiert wird. Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit eben dieser Interaktion, wobei sowohl Augenmerk auf die Funktion von zellulär exprimierten Prionprotein auf die zelleigenen VGCCs als auch von extrazellulärem PrP in Form von appliziertem rekombinanten PrP auf spannungsaktivierte Kalziumkanäle gerichtet war. Eine mögliche unterschiedliche Funktion der carboxy- und aminoterminalen Regionen, insbesondere der kupferbindenden Oktapeptidregion, wurden untersucht.

3.2.1 Unveränderte Kalziumleitfähigkeiten bei *Prnp*^{0/0}-Körnerzellen

Mikrofluorimetrische Messungen zeigten, dass die Kalziumhomöostase von cerebellären Körnerzellen, die aus dem Kleinhirn von *Prnp*-knock-out-Mäusen (*Prnp*^{0/0}) gewonnen wurden, verändert ist (HERMS *et al.* 2000). So wurde beschrieben, dass sowohl das basale intrazelluläre Kalziumniveau als auch der Anstieg von intrazellulärem Kalzium nach einer Kaliumdepolarisation bei *Prnp*^{0/0}-Zellen signifikant reduziert sind. Um zu untersuchen, ob diese Alteration der Kalziumhomöostase in einem reduzierten Ioneneinstrom durch spannungsaktivierte Kalziumkanäle begründet ist, wurden *patch-clamp*-Experimente an Primärzellkulturen aus dem Kleinhirn von Wildtyp- und *Prnp*^{0/0}-Mäusen durchgeführt.

Um die passiven Membraneigenschaften von PrP exprimierenden und nicht exprimierenden Zellen zu testen, wurden Messungen im *current-clamp*-Modus von 9 Wildtyp- und 9 *Prnp*^{0/0}-Zellen durchgeführt. Diese belegten, dass das Ruhemembranpotential durch Verlust des zellulären Prionproteins nicht verändert wird. Körnerzellen beider Mauslinien wiesen ein Ruhemembranpotential von + 63 mV auf (Wt: $\pm 1,9$ mV, *Prnp*^{0/0}: $\pm 2,0$ mV). Eine Depolarisation der Zellmembran mittels der *Patch*pipette von - 70 mV auf + 20 mV über einen Zeitraum von 300 ms produzierte einen starken Ioneneinstrom mit sehr schnellen Aktivierungszeiten, der zum Pulsende ein Plateau erreichte und erst durch Einstellen des Haltepotentials von - 70 mV inaktiviert wurde (siehe Abbildung 22 A). Das Haltepotential wurde bei

allen Messungen in 20 mV-Schritten von -100 auf $+60$ mV variiert. Die Maximalamplitude der ausgewerteten Ströme betrug im Mittel bei Wildtyp-Körnerzellen $75,8 \pm 15,7$ pA bzw. $81,2 \pm 24,4$ pA bei *Prnp*^{0/0}-Zellen. Beim Vergleich des mittleren Membranpotentials des Maximalstroms konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Wt: 27 ± 3 mV, *Prnp*^{0/0}: 23 ± 3 mV). Messungen, bei denen sich eine Maximalamplitude unter 40 pA zeigte, gingen nicht mit in die Auswertung ein. Um den Anteil an L-Typ- und N-Typ-Strömen zu bestimmen, wurde der Badlösung nach Aufzeichnung der Kalziumströme bei verschiedenen Haltepotentialen Nifedipin und ω -Conotoxin GVIA zugesetzt. Jeweils im Anschluss daran wurden nach einer Inkubationszeit von einer Minute die Messungen wiederholt. Abbildung 22 B zeigt exemplarisch die Strommaxima von Messungen an einer Wildtyp-Körnerzelle nach 4 Tagen in Kultur.

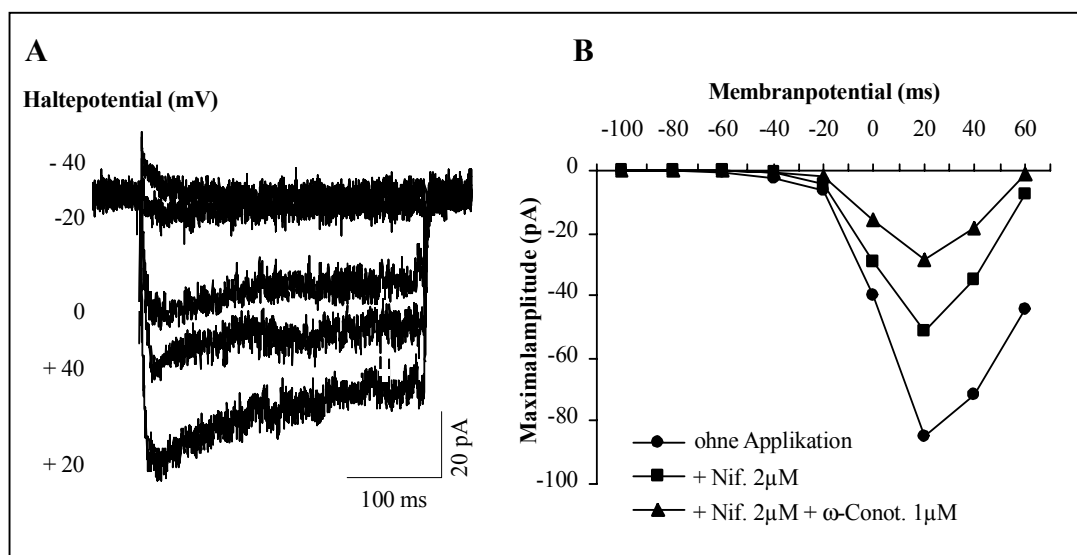


Abbildung 22: Spannungsaktivierte Kalziumströme von Wt-Körnerzellen.

A Übereinandergelegte exemplarische Einzelmessungen bei verschiedenen Halte-/Membranpotentialen. Die Ströme zeigten eine sehr schnelle Aktivierung bis zum Maximum. Die Nulllinie wurde nach Erreichen eines Plateaus gegen Ende des Depolarisationsschrittes erst durch Anlegen des Ruhemembranpotentials erreicht.

B Beispiel für eine Messung an einer Wildtypzelle mit Applikation von Nifedipin und ω -Conotoxin zur Bestimmung vom L-Typ- und N-Typ-Anteil des Gesamtkalziumstromes. Die Einzelpunkte geben die Maxima der Ca^{2+} -Ströme zu den jeweiligen Membranpotentialen an.

Aufgrund der hohen Variabilität der Stromamplituden zwischen einzelnen Zellen wurden, um die Einzelmessungen miteinander vergleichen zu können, die jeweiligen aus den verschiedenen Haltepotentialen resultierenden Strommaxima ins Verhältnis

zur Maximalamplitude gesetzt. Im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen zeigten *Prnp*^{0/0}-Körnerzellen keine veränderte Antwort auf eine Membrandepolarisation. Auch der Anteil von L-Typ- und N-Typ-Strom am Gesamtkalziumstrom war nicht alteriert (siehe Abbildung 23).

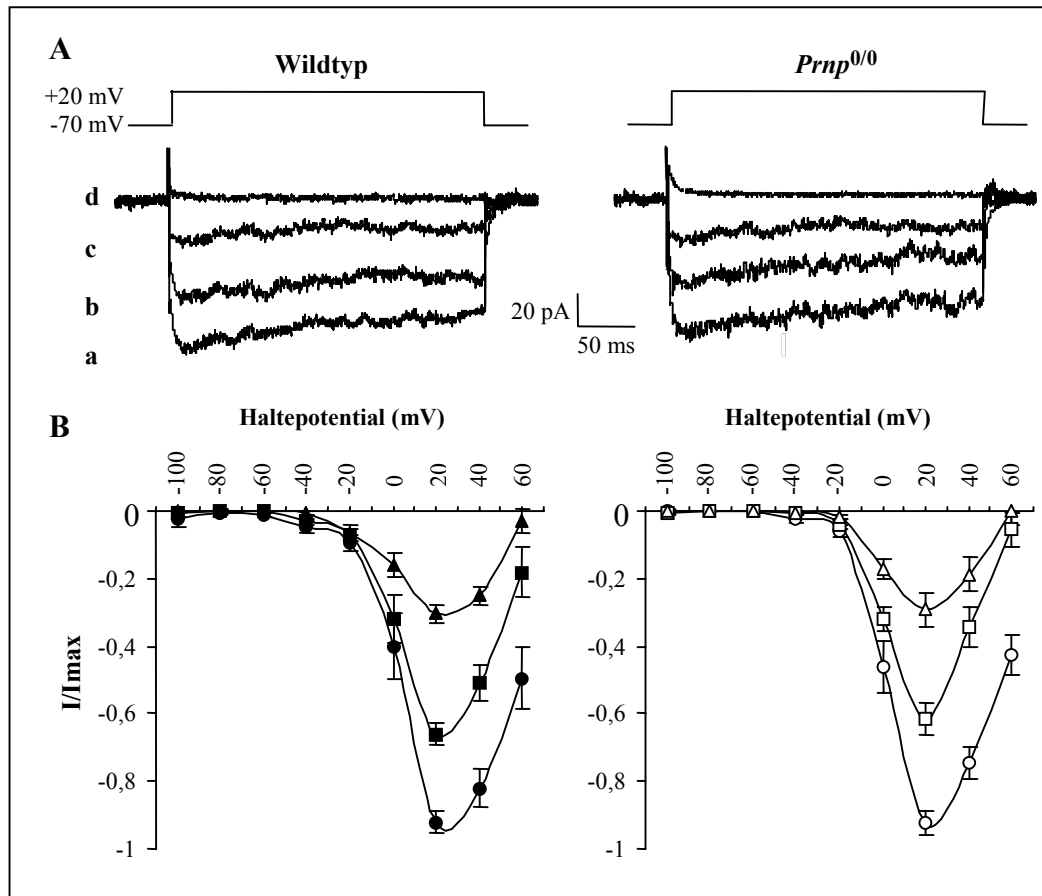


Abbildung 23: Der Anteil von L-Typ- und N-Typ-Strom am Gesamtkalziumstrom alterierte nicht zwischen *Prnp*^{0/0}- und Wildtyp-Körnerzellen.

A Beispiel für die Inhibierung spannungsgesteuerter Kalziumströme durch Kalziumkanalblocker. Exemplarische Messungen an einer Wt- (links) und *Prnp*^{0/0}-Körnerzelle (rechts) nach 5 Tagen in Kultur. Dargestellt ist sowohl der ursprüngliche Kalziumstrom (*a*) als auch nach Applikation von 2 μ M Nifedipin (*b*) und zusätzlich 1 μ M ω -Conotoxin GVIA (*c*), jeweils nach Depolarisierung von -70 mV auf +20 mV. Die Zugabe von 100 μ M CdCl₂ verursachte eine völlige Blockierung spannungsaktivierter Kalziumkanäle (*d*).

In *B* sind die Mittelwerte von 17 Wt-Zellen aus 5 Präparationen (links) und 19 *Prnp*^{0/0}-Zellen aus 6 Präparationen (rechts) dargestellt. Der L- und N-Typ-Anteil unterschied sich nicht signifikant zwischen den beiden Mauslinien. Fehlerbalken = SEM.

Bei *patch-clamp*-Messungen von spannungsaktivierten Kalziumströmen, die sich über einen längeren Zeitraum erstreckten, wurde der sogenannte *rundown*-Effekt beobachtet. Er beschreibt eine kontinuierliche Abnahme der Stromamplitude zwischen aufeinander folgenden Messungen. Dieses Phänomen wird wahrscheinlich durch den Austausch der Pipetten- mit der Intrazellulärlösung verursacht, wobei energiereiche Substanzen verloren gehen. Verlangsamt wurde dieser Effekt durch die Zugabe von ATP-Verbindungen in die Pipettenlösung. Um eine genaue Bestimmung des L- und N-Typ-Anteils zu erreichen, waren Messungen an 6 Wt-Zellen aus 2 Präparationen und 7 *Prnp*^{0/0}-Körnerzellen aus ebenfalls 2 Präparationen mit gleichem zeitlichen Verlauf ohne Applikation von Toxinen durchgeführt worden. Dabei zeigte sich ein *rundown* der Maximalamplitude von $9,7 \pm 2,4$ % (Wt) bzw. $9,8 \pm 2,8$ % (*Prnp*^{0/0}) zwischen den einzelnen Messprotokollen. Abzüglich dieses *rundowns* ergab sich ein L-Typ-Anteil von $22,2 \pm 3,2$ % bzw. ein N-Typ-Anteil von $20,0 \pm 2,6$ % bei Wildtyp-Zellen und $23 \pm 4,8$ % (L-Typ) bzw. $20,7 \pm 4,7$ % (N-Typ) bei *Prnp*^{0/0}-Körnerzellen. Aus den Strom-Spannungskurven ließen sich ebenfalls die Schwellenwerte für die Aktivierung der Ca²⁺-Kanäle errechnen. So lag das mittlere Aktivierungspotential von Wt-Zellen bei -29 ± 6 mV bzw. von *Prnp*^{0/0}-Zellen bei -26 ± 5 mV. Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die gemessenen Parameter zur Charakterisierung von Kalziumströmen bei *Prnp*-knock-out-Mäusen und Wildtyp-Kontroll-Mäusen.

Messparameter	Wildtyp	<i>Prnp</i> ^{0/0}
I _{max}	$75,8 \pm 15,7$ pA	$81,2 \pm 24,4$ pA
Membranpotential / I _{max}	$26,8 \pm 3,1$ mV	$23,5 \pm 3,3$ mV
Aktivierungspotential	-29 ± 6 mV	-26 ± 5 mV
L-Typ-Anteil	$22,2 \pm 3,2$ %	$23 \pm 4,8$ %
N-Typ-Anteil	$20,0 \pm 2,6$ %	$20,7 \pm 4,7$ %
<i>rundown</i>	$9,7 \pm 2,4$ %	$9,8 \pm 2,8$ %

Tabelle 3: Zusammenfassung der gemessenen Parameter zur Charakterisierung von spannungsabhängigen Ca²⁺-Strömen bei kultivierten cerebellären Wildtyp- und *Prnp*^{0/0}-Körnerzellen.

3.2.2 Rekombinantes Prionprotein inhibiert Ca^{2+} -Ströme durch L-Typ-spannungsaktivierte Kanäle

Ein zentraler Punkt dieser Arbeit war es zu klären, auf welche Weise PrP spannungsaktivierte Kalziumkanäle moduliert und ob sich die an Synaptosomen postulierte Alteration spannungssensitiver Kalziumströme durch rekombinantes Prionprotein (WHATLEY *et al.* 1995) durch *patch-clamp*-Messungen an kultivierten Neuronen verifizieren lässt. Dabei sollte versucht werden zu klären, welchen funktionellen Anteil die verschiedenen Domänen des Prionproteins dabei einnehmen.

WHATLEY *et al.* (1995) zeigten, dass sich der intrazelluläre freie Kalziumgehalt von Synaptosomen signifikant durch die Applikation von rekombinantem PrP erhöht. Die Autoren vertraten die Auffassung, dass dies auf einen erhöhten Kalziumeinstrom durch spannungssensitive Kanäle zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit an cerebellären Körnerzellen, dass diese Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration nicht durch spannungsaktivierte Kalziumkanäle vermittelt wird. So resultierte aus der Applikation von rekombinantem Maus-PrP (250 μM) eine signifikante Reduktion des Ca^{2+} -Einstromes durch VGCCs nach einer Membrandepolarisation (Abbildung 24 A). Bei Betrachtung der Konzentrationsabhängigkeit dieses Effektes wurde deutlich, dass diese Inhibierung der Kalziumströme mit zunehmender Konzentration des recPrP anstieg (Abbildung 24 B+C). Eine signifikante Reduktion des Ca^{2+} -Einstromes war bereits bei Konzentrationen ≥ 50 nM zu erkennen.

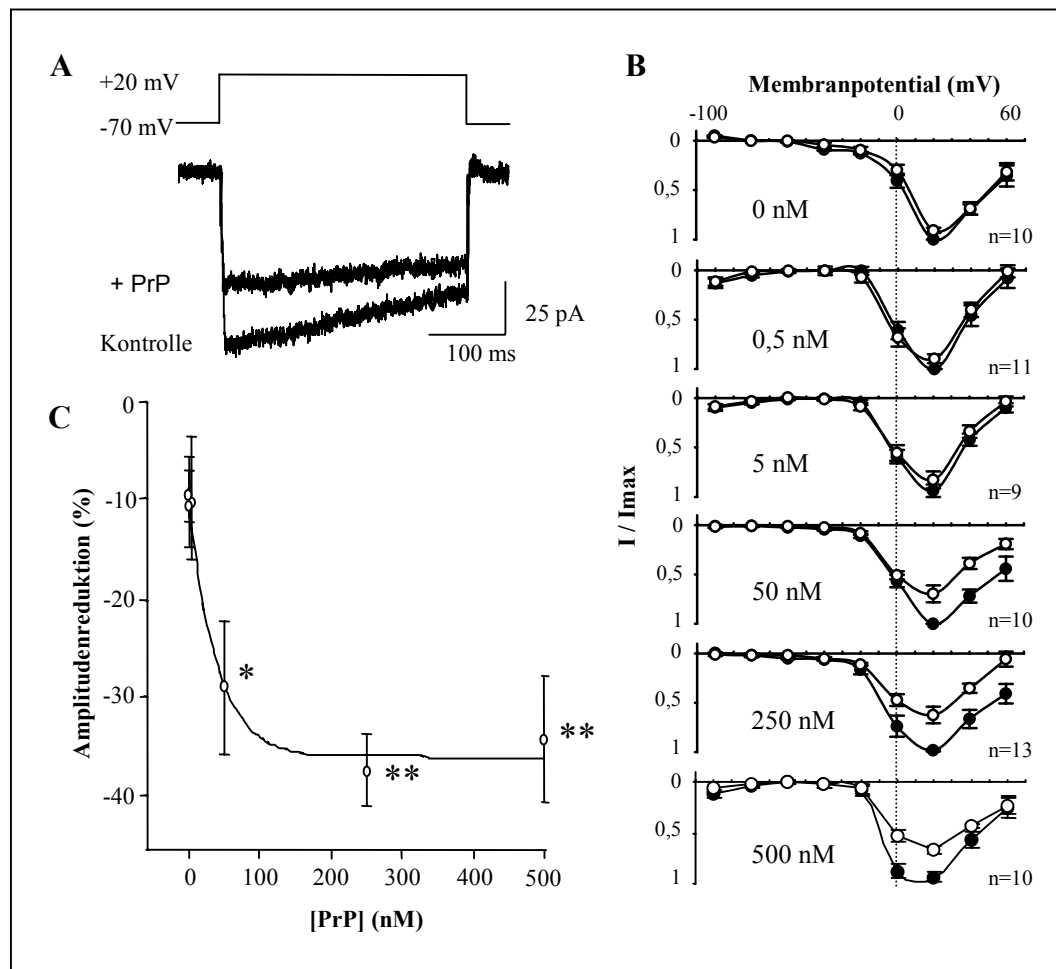


Abbildung 24: Konzentrationsabhängige Reduktion von spannungsaktivierten Ca^{2+} -Strömen durch murines recPrP.

A Stromantwort auf einen Haltepotentialsprung von -70 auf $+20$ mV vor und 2 min nach Applikation von 250 nM murPrP.

B Strom- / Spannungskurven von Experimenten an Wt-Körnerzellen unter verschiedenen PrP-Konzentrationen. Dargestellt sind die Maximumamplituden der aus einem Spannungssprung resultierenden Ströme vor (geschlossene Kreise) und nach Applikation von murPrP (offene Kreise).

C Auftragung der Reduktion der Amplitudenmaxima bei $+20$ mV (siehe **B**) als Funktion der PrP-Konzentration. Der Verlauf der Datenpunkte lässt sich durch eine Exponentialfunktion beschreiben. Fehlerbalken = SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ (t-Test).

Messungen mit BSA, Lysozym und Cytochrom c als Kontrollproteine (Abbildung 25), deren Applikation keinerlei Alterierung des Kalziumeinstromes bedingt, schließen die Möglichkeit eines Artefaktes, hervorgerufen durch den generellen Effekt eines applizierten Proteins, aus.

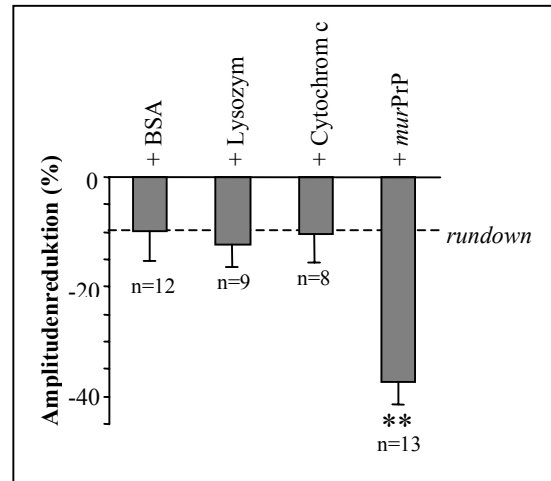


Abbildung 25: Inhibierender Effekt von PrP beruht nicht auf Messartefakten.

Kontrollproteine BSA, Lysozym, und Cytochrom c bewirkten keine Alterierung der Ca^{2+} -Strom-Amplitude. Die Menge des applizierten Proteins betrug jeweils 250 nM. Die Daten geben die Maximalreduktion des Kalziumstroms bei einem Potentialsprung von -70 auf $+20$ mV an. Die gestrichelte Linie beschreibt den normalen rundown zwischen den einzelnen Messungen, ermittelt aus Experimenten ohne Zugabe von Protein. Fehlerbalken = S.E.M. $**p < 0,005$ (t-Test), n = Zellanzahl.

Bei Anwesenheit des L-Typ-Blockers Nifedipin ($1 \mu\text{M}$) in der Badlösung konnte lediglich eine leichte Reduktion des Ca^{2+} -Stromes detektiert werden ($14,3 \pm 5\%$, Abbildung 26), die keinen signifikanten Unterschied zum *rundown* aufwies. Dies deutet darauf hin, dass die Verminderung des Kalziumeinstroms durch recPrP vornehmlich auf spannungssensitiven Kalziumkanälen vom L-Typ basierte.

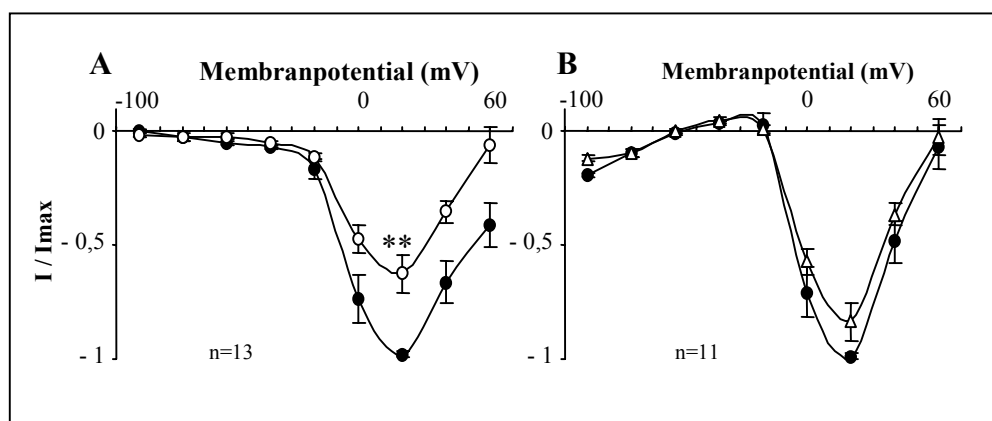


Abbildung 26: Amplitudenreduktion des Ca^{2+} -Stroms ist L-Typ-Kanal spezifisch.

Die Abbildung zeigt Mittelwerte von Messungen mit 250 nM recPrP, **A** ohne und **B** mit Nifedipin ($1 \mu\text{M}$) in der Badlösung, Fehlerbalken = S.E.M. $**p < 0,005$ (t-Test).

Wie in Abbildung 27 gezeigt, resultierte die Zugabe von humanem und bovinem PrP ebenfalls in einer signifikanten Reduktion des Ca^{2+} -Einstroms bei Depolarisation der Körnerzellmembran ($32,3 \pm 3,1$ % bzw. $32 \pm 3,1$ %). Die hohe Konserviertheit des Proteins über die Speziesgrenze hinweg zeigte sich also auch in der physiologisch indifferenten Wirkungsweise von recPrP verschiedener Spezies. Leichte Alterierungen in der Aminosäuresequenz hatten keinen Einfluss auf den VGCC-inhibitorischen Effekt von recPrP.

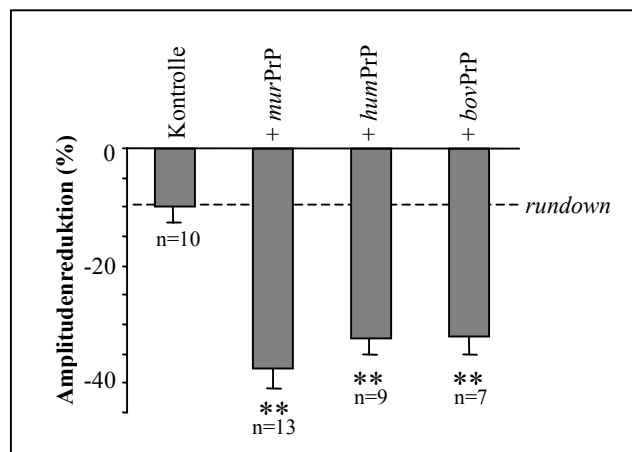


Abbildung 27: Modulation des Ca^{2+} -Influsses ist speziesunspezifisch.

Die Daten geben die Maximalreduktion der Stromamplitude bei einem Membranpotentialsprung von -70 auf $+20$ mV an. Die Kontrolle beschreibt die Reduktion der Amplitude ohne Proteinapplikation (rundown). Fehlerbalken = S.E.M., ** $p < 0,005$ (t-Test).

Um abzusichern, dass die Amplitudenreduktion des Ca^{2+} -Stromes nicht aus einer Verschiebung der Stromspannungskurven resultierte, die durch die Wahl der relativ weiten Modulationsschritte von 20 mV nicht detektierbar waren, wurden zwei andere Messprotokolle angewandt, die näheren Aufschluss über die Kinetik des Stromes geben sollten. Durch eine transiente Modulation des Haltepotentials von -100 auf $+60$ mV (Protokoll 2.3, siehe Kapitel 2.8.2) konnten genauere Öffnungskinetiken des Kalziuminfluxes bestimmt werden. Alternativ dazu wurde im Bereich des Strommaximums das Membranpotential in 5 mV-Schritten von -10 auf $+35$ mV variiert (Protokoll 2.2) und die Maximalamplituden der resultierenden Ströme mittels der *whole-cell*-Ableitung detektiert. Wie in Abbildung 28 dargestellt zeigt, der durch recPrP inhibierte Strom betreffend der Kinetik keinen signifikanten Unterschied zum initialen nicht geblockten Strom. Der Schwellenwert für die Öffnung der Kanäle

betrug $25,2 \pm 5,7$ mV beim initialen Strom und $26,4 \pm 4,9$ mV beim PrP-modulierten Strom (Abbildung: 28 A). Auch eine Verschiebung der Maxima war nicht erkennbar. Das mittlere Haltepotential betrug sowohl bei Kontrollmessungen als auch nach Applikation von rekombinanten PrP $12,5 \pm 5,2$ mV (Abbildung: 28 B).

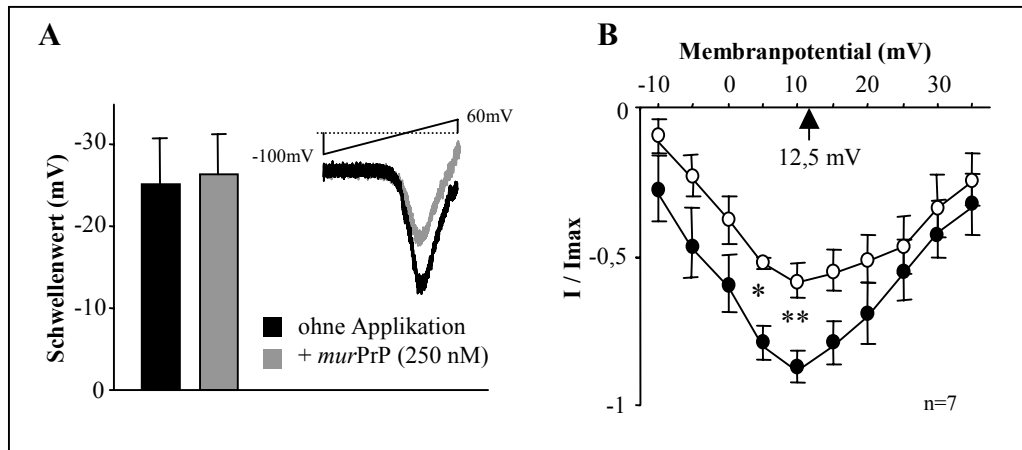


Abbildung 28: Aktivierungsschwellenwert und Maximum der Stromamplitude werden nicht durch PrP-Applikation verschoben.

Der in A gezeigte Graph beschreibt die Entwicklung des Aktivierungsschwellenwertes von spannungsaktivierten Ca^{2+} -Strömen nach Applikation von PrP. Die Daten basieren auf 13 Messungen der Stromantwort von VGCCs auf eine transiente Anhebung des Haltepotentials (Beispielmessung oben rechts).

B stellt die Mittelwerte der Amplituden von Strom-Messungen an 7 Wildtypzellen dar. Messungen wiesen eine 31 %ige Reduktion der Maximalamplitude ohne eine Verschiebung des Membranpotentials auf. Der rechnerische Mittelwert betrug bei beiden Messreihen 12,5 mV. Fehlerbalken = S.E.M., * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ (t-Test).

3.2.3 Modulation der VGCCs durch recPrP ist unabhängig von der Expression des PrP^C und der Tyrosinkinase Fyn

Das zelluläre PrP spielt bei der Pathologie von TSEs eine wichtige Rolle. So konnte gezeigt werden, dass *Prnp*^{0/0}-Mäuse sich nicht mit Scrapie infizieren ließen, während heterozygote Tiere einen verlangsamten Krankheitsverlauf zeigten. Dies spricht dafür, dass die Pathologie von TSE sowohl von der Anwesenheit als auch vom Expressionslevel von PrP^C abhängt (BÜELER *et al.* 1993). Experimente an Körnerzellen, die aus 5 Tage alten *Prnp*^{0/0}-Mäusen gewonnen wurden, deuten darauf hin, dass die Interaktion von rekombinanten mit zellulärem PrP nicht notwendig für eine Alterierung von Ca^{2+} -Strömen durch L-Typ-Kanäle ist. Wie in Abbildung 29 dargestellt, bedingt eine recPrP-Applikation auf *Prnp*^{0/0}-Zellen annähernd die

gleiche Reduktion des Ca^{2+} -Influges, die sich bei Kontrollmessungen an Wildtypzellen zeigte ($33,6 \pm 4,5$ % für $\text{Prnp}^{0/0}$ bzw. $37,5 \pm 3,6$ % für Wt). Dies spricht gegen eine Funktion von PrPC als Rezeptor für extrazelluläres rekombinantes PrP.

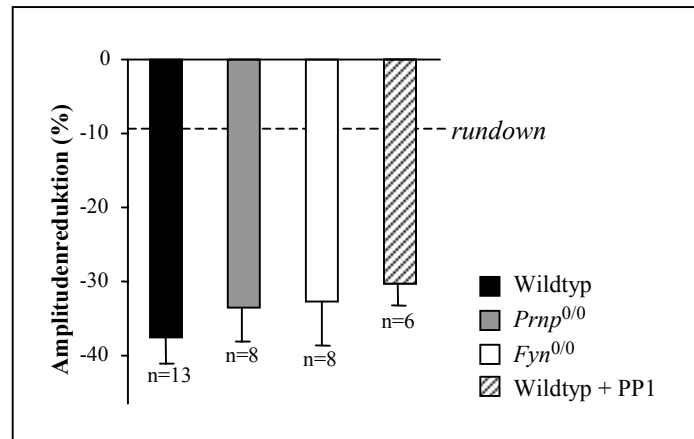


Abbildung 29: Modulation spannungssensitiver Ca^{2+} -Kanäle basiert nicht auf einer Interaktion von extrazellulär appliziertem Prionprotein mit PrPC oder Fyn .

Der Graph beschreibt die Reduktion der Strommaxima durch murines recPrP bei einem Haltepotential von 20 mV bei cerebellären Körnerzellen von Wildtyp- $\text{Prnp}^{0/0}$ - und $\text{Fyn}^{0/0}$ -Mäusen. Der gestreifte Balken zeigt die Reduktion des Kalziumstroms nach PrP-Inkubation bei patch-clamp-Messungen an Wt-Zellen, bei denen die Intrazellularlösung den Src-Kinasen-Inhibitor PP1 enthielt. Fehlerbalken = SEM.

Zur Klärung, ob die von MOUILLET-RICHARD *et al.* (2000) beschriebene Interaktion der Tyrosinkinase Fyn mit PrPC z. B. durch Modulation der intrazellulären Kalziumkonzentration (siehe Kapitel 1.2) relevant für die Funktion spannungsaktivierter Ca^{2+} -Kanäle ist, wurden *whole-cell*-Messungen an *Fyn-knock-out*-Körnerzellen durchgeführt. Auch bei diesen Experimenten zeigte sich keine zu den Kontrollmessungen alterierende Inhibierung durch die Applikation von rekombinantem PrP. Durch intrazellulär appliziertes PP1 werden Tyrosinkinasen der Src-Familie, zu denen auch Fyn gehört, inhibiert. Die Simulation des *Fyn-knock-out*-Zustandes durch die Zugabe von PP1 in die Intrazellularlösung bei Wildtyp-Zellen bestätigte den Befund der unveränderten Leitfähigkeit der VGCCs bei $\text{Fyn}^{0/0}$ -Zellen. Eine Fyn -abhängige Alterierung spannungssensitiver Ca^{2+} -Ströme als Grund für die Reduktion des Kalziumeinstromes konnte somit ausgeschlossen werden.

3.2.4 Der aminoternale Bereich von PrP vermittelt die Interaktion mit L-Typ-Ca²⁺-Kanälen über die kupferbindende Region

Das Prionprotein weist eine deutliche strukturelle Zweiteilung auf; es verfügt über den strukturierten C-terminalen Bereich sowie über die flexible kupferbindende aminoternale Region. Der Metabolismus von PrP^C beinhaltet die proteolytische Spaltung des Proteins an Aminosäure 111 oder 112 (CHEN *et al.* 1995) in C- und N-terminalen Bereich. Ob diese unterschiedlich strukturierten Spaltprodukte des Proteins physiologisch von Bedeutung sind, wird diskutiert.

Wie gezeigt werden konnte, inhibiert rekombinantes PrP spannungsaktivierte Kalziumkanäle vom L-Typ bei kultivierten cerebellären Körnerzellen. Um eine mögliche differente Funktion von N- und C-terminalen Bereich hinsichtlich dieses Mechanismus zu untersuchen, wurden spannungssensitive Kalziumströme vor und nach der Applikation verschiedener Fragmente von humanem rekombinanten PrP aufgezeichnet. Es zeigte sich, dass die Zugabe des reinen N-terminalen Bereiches eine zum Volle-Länge-Protein adäquate Reduktion des Ca²⁺-Influges führt (PrP²³⁻⁹⁸: 25,9 ± 3,1 %, PrP²³⁻¹²¹: 27,2 ± 2,7 %, PrP²³⁻²³¹: 32,3 ± 3,1 %, siehe Abbildung 30).

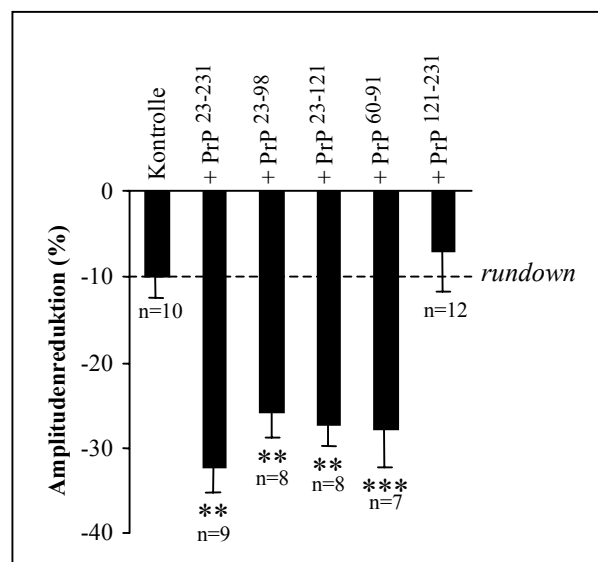


Abbildung 30: Charakterisierung der Wirkung einzelner Domänen des humanen Prionproteins auf die Amplitude spannungssensitiver Kalziumströme.

Der N-terminale Bereich von PrP inhibierte VGCCs signifikant, wobei dieser Effekt anscheinend auf die hochkonservierte Oktapeptidregion zurückzuführen war. Die Applikation des carboxyterminalen Anteils blieb ohne Wirkung auf die Stromamplitude. Die Konzentration der applizierten Proteine betrug jeweils 250 nM. Fehlerbalken = SEM, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,005$ (t-Test).

Im Gegensatz dazu resultierte die Gegenwart des carboxyterminalen Bereiches (PrP¹²¹⁻²³¹, $7,0 \pm 4,6$ %) in der Badlösung nicht in einer signifikanten Alterierung spannungssensitiver Ströme. Der Bereich von PrP, der für die Modulation der VGCCs verantwortlich ist, konnte weiter durch *patch-clamp*-Messungen unter der Zugabe von PrP^{Δ60-91} eingegrenzt werden. Die Befunde deuten darauf hin, dass die hochkonservierte Oktapeptidregion, die den kupferbindenden Bereich des Prionproteins repräsentiert, verantwortlich für die Inhibierung der Ca²⁺-Kanäle war ($27,9 \pm 4,4$ %).

Die bisher erlangten Befunde deuten auf eine Inhibierung der L-Typ-Ströme durch den kupferbindenden Bereich des Prionproteins hin. In den darauf folgenden Versuchen wurde versucht aufzuklären, ob die Kupferbindung essentiell für den hemmenden Effekt von PrP ist. In der Tat belegen Experimente, bei denen das an PrP gebundene Kupfer durch Ca-EDTA cheliiert wurde, dass der Entzug von Kupferionen die Reduktion der Stromamplitude durch PrP verhindert (siehe Abbildung 31). Ursachen könnten darin zu finden sein, dass der hochflexible aminoternale Bereich des rekombinanten Prionproteins durch die Kupferbindung strukturell stabilisiert wird. Diese Vermutung wurde bereits 1996 von MIURA *et al.* aufgestellt. Die strukturelle Form des N-terminalen Bereiches könnte wiederum entscheidend für die direkte oder indirekte Interaktion des rekombinanten Prionproteins mit dem L-Typ-Kanal sein. Auch eine kupferabhängige Bindung von recPrP an einen zellulären Rezeptor, der über intrazelluläre Mechanismen die Leitfähigkeit von L-Typ-Kanälen moduliert, kann nicht ausgeschlossen werden.

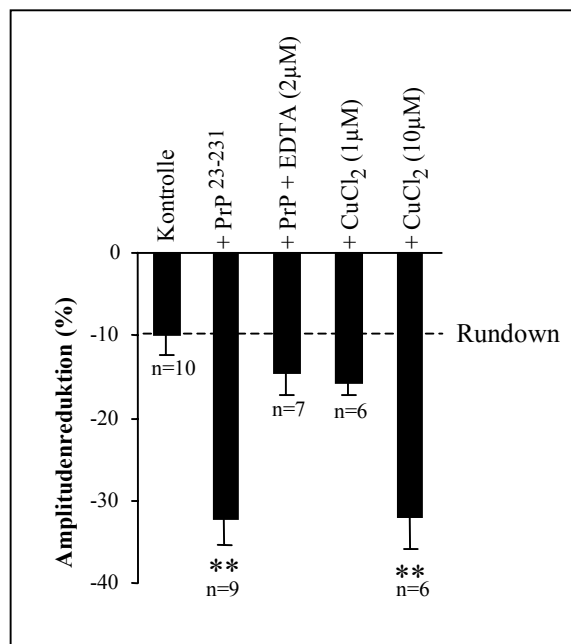


Abbildung 31: Die Kupferbindung von PrP ist essentiell für die Modulation spannungsaktivierter Ca^{2+} -Kanäle.

Die Chelierung des PrP-gebundenen Kupfers durch Ca-EDTA resultierte in einer Aufhebung des inhibierenden Effektes von PrP. Die Konzentration der Proteine betrug jeweils 250 nM. Eine Zugabe von 1 μM CuCl_2 , das der ungefähren Menge von PrP-gebundenen Kupferionen entspricht, inhibierte den Kalziumstrom nicht signifikant. Im Gegensatz dazu hemmten 10 μM CuCl_2 den Kalziumeinstrom adäquat zu recPrP. Fehlerbalken = SEM
** $p < 0,005$ (t-Test).

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass das durch PrP gebundene Kupfer direkt mit den L-Typ-Kanälen interagiert. Eine 30 %ige Reduktion spannungsabhängiger Kalziumströme von Purkinjezellen durch Kupferionen im mikromolaren Bereich wurde bereits 1992 durch NAM & HOCKBERGER beschrieben. Um diese Annahme zu testen, wurden Experimente durchgeführt, bei denen extrazellulär Kupferchlorid appliziert wurde. Eine 1 mikromolare Konzentration entspricht annähernd der Menge von Kupferionen, die durch 250 nM PrP gebunden werden können. Diese Konzentration war allerdings nicht ausreichend, um eine dem recPrP adäquate Inhibierung von Kalziumströmen zu generieren. Im Gegensatz dazu entsprach die Amplitudenreduktion von Ca^{2+} -Strömen durch die 10-fache Menge Cu^{2+} der durch 250 nM PrP hervorgerufenen Inhibierung. Dies lässt den Schluss zu, dass die Ursachen der Inhibierung der spannungsaktivierten Kalziumströme durch PrP auf dessen kupferabhängiger Konformation basieren, die sowohl eine direkte Interaktion mit dem L-Typ-Kanal erlaubt als auch über einen zellulären Rezeptor.

Eine andere Möglichkeit der Inhibierung spannungssensitiver L-Typ-Kalziumkanäle besteht darin, dass die recPrP-Applikation durch die Interaktion mit einem PrP-spezifischen Rezeptors zu einer Kupferanreicherung am Ca²⁺-Kanal führt.

4 Diskussion

4.1 Einfluss von synaptisch lokalisiertem PrP auf die exzitatorische Übertragung

Die Doppelpulsverstärkung oder englisch *paired pulse facilitation* (PPF) ist ein Parameter zur Beschreibung der Kurzzeitplastizität exzitatorischer Synapsen. Sie beschreibt eine Zunahme des Verhältnisses der Amplituden zweier kurz aufeinander folgender evozierter EPSCs. Ursache hierfür ist die auf den 2. Stimulus erfolgende verstärkte Vesikelausschüttung an der Präsynapse (KATZ & MILEDI 1968, MALLART & MARTIN 1968, ZUCKER 1989), die eine erhöhte postsynaptische Stromantwort auslöst. Der Betrag der *paired pulse facilitation* nimmt mit der Größe des Interstimulusintervalls ab. Lange Zeit wurde angenommen, dass eine Erhöhung des präsynaptischen ionisierten Kalziumgehalts nach dem ersten Stimulus ursächlich für die Erhöhung der zweiten Stromantwort ist (MAGLEBY 1987, ZUCKER 1989). Allerdings deuten neuere Befunde von BLUNDON *et al.* (1993) und WINSLOW *et al.* (1994) darauf hin, dass nicht alleine die erhöhte freie somatische Kalziumkonzentration ursächlich für die Doppelpulsverstärkung sein kann, sondern vielmehr die vermehrte Ca^{2+} -Bindung an intrazelluläre Rezeptoren, die bei der Vesikelausschüttung involviert sind. CHAPMAN *et al.* (1995) zeigten zum Beispiel, dass Ca^{2+} -Ionen die Interaktion von Synaptotagmin und Syntaxin 1 regulieren, zwei synaptische Proteine, die zum Vesikelfusionsapparat gehören. Der Verlust von synaptischen Proteinen kann die Kurzzeitplastizität modulieren. So wiesen Mäuse, denen präsynaptische Proteine wie Synapsin 1 oder Munc 13-3 fehlen, zum Beispiel eine Alterierung der PPF bei unveränderter Kinetik der EPSCs auf (ROSAHL *et al.* 1993, AUGUSTIN *et al.* 2001). Bei beiden Mauslinien wurde eine Erhöhung der *paired pulse facilitation* durch die *knock-out*-Mutation des betreffenden Proteins erreicht.

Das Prionprotein wird ubiquitär im Gehirn exprimiert. In Lokalisationsstudien, die mittels Histoblot durchgeführt wurden, zeigte sich ein starkes PrP-Signal im Neuropil. Dies spricht für eine präferenzielle Lokalisation des Prionproteins in Regionen von hoher Synapsendichte (DEARMOND *et al.* 1997, TARABOULOS *et al.* 1992). Bestätigt wurden diese Befunde durch Untersuchungen von HERMS *et al.* (1999). Mittels synaptosomaler Membranfraktionierung und immunhistochemischer Nachweismethoden wiesen auch diese Autoren eine vorwiegend synaptische

Lokalisation von Pr^{PC} nach. Da das Prionprotein ein ähnliches Expressionsmuster wie andere synaptische Proteine aufweist, sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, ob ein alterniertes Expressionsniveau von Pr^{PC} die synaptische Kurzzeitplastizität im Cerebellum von prionproteintransgenen Mäusen beeinträchtigt.

Die *patch-clamp*-Experimente an Purkinjezellen aus Schnittpräparaten vom Kleinhirn transgener Mäuse zum Studium der *paired pulse facilitation* belegen, dass das Fehlen des Prionproteins keinen Einfluss auf die Kurzzeitplastizität der Parallelfaser-Purkinjezell-Synapse hat. So zeigen *knock-out*-Mäuse (*Prnp*^{0/0}) keine Alterationen im Vergleich zum Wildtyp (siehe Kapitel 3.1.2). Jedoch ist damit nicht generell ausgeschlossen, dass eine Alterierung des Expressionsniveaus von Pr^{PC} die exzitatorische synaptische Übertragung moduliert. Untersuchungen an CA1-Neuronen aus Schnittpräparaten des Hippokampus Rab3A-defizienter Mäuse zeigten eine synaptische Depression der exzitatorischen Übertragung auf einen kurzen tetanischen Reiz (GEPPERT *et al.* 1994) bei einer unveränderten PPF. *Prnp*^{0/0}-Mäuse zeigten allerdings auch im Hinblick auf diesen synaptischen Parameter keine Veränderung im Vergleich zum Wildtyp (Kapitel 3.1.2). Die Kurzzeitplastizität wird demnach anscheinend nicht durch den Verlust von Pr^{PC} beeinträchtigt. Allerdings könnte die *knock-out*-Mutation eines Proteins auch in der Verschiebung des Expressionsniveaus anderer synaptischer Proteine resultieren (AUGUSTIN *et al.* 1999a,b, 2000). Im Falle der fehlenden Pr^{PC}-Expression könnte dadurch ein möglicher physiologisch messbarer Effekt maskiert sein (Abbildung 32 B). So haben MOORE *et al.* (1999) bei zwei unterschiedlichen *Prnp*^{0/0}-Mauslinien (Ngsk und Rcm0) ein erhöhtes Expressionsniveau des PrP-ähnlichen Proteins ‘Doppel’ nachgewiesen. Beide Linien entwickeln einen ausgeprägten Verlust von Purkinjezellen und eine progressive Ataxie (SAKAGUCHI *et al.* 1996). Wie gezeigt, konnte dieser Phänotyp durch Reinsrierung von Wildtyp-PrP aufgehoben werden (NISHIDA *et al.* 1999). MOORE *et al.* (1999) begründeten die unterschiedlichen Phänotypen bei den existierenden *Prnp*-*knock-out*-Linien damit, dass Pr^{PC} und ‘Doppel’ um den gleichen zellulären Rezeptor konkurrieren, wobei Pr^{PC} die zellschädigende Wirkung von ‘Doppel’ antagonisiert. Obwohl die in dieser Arbeit verwendete sogenannte Zrch-Maus (BÜELER *et al.* 1992) kein erhöhtes Expressionsniveau des Proteins ‘Doppel’ aufweist (MOORE *et al.* 1999), ist nicht

ausgeschlossen, dass durch den Verlust von PrP^C als kompensatorischer Mechanismus das Expressionsniveau anderer synaptischer Proteine alteriert ist.

Auch die Expression von PrP oder N-terminal trunziertem PrP auf präsynaptischer Seite bedingt keine Alterierung der Kurzzeitplastizität im Vergleich zur *Prnp*^{0/0}- und Wildtyp-Maus. Die von SCHMERLING *et al.* (1998) generierten Mauslinien, bei denen aminoterminal verkürztes PrP in die *Prnp*^{0/0}-Maus präsynaptisch reinseriert wurde (F35, C4), zeigten ebenso wenig Veränderungen in der *paired pulse facilitation* (Kapitel 3.1.4) wie die präsynaptisch PrP überexprimierende Tg20-Maus (Abbildung 32 C). Eine gestörte synaptische Übertragung ist somit höchstwahrscheinlich nicht Ursache des Körnerzelluntergangs. Die Autoren schlugen vor, dass PrP^C mit seinem zellulären Rezeptor interagiert und dadurch eine Signalfunktion einnehmen würde. Sie nahmen an, dass in *Prnp*^{0/0}-Mäusen ein anderes Protein mit geringerer Bindungsaffinität die physiologische Funktion von PrP durch Bindung an dessen Rezeptor übernimmt, wodurch der Verlust des zellulären Prionproteins kompensiert wird. Eine Deletion des N-terminalen Bereiches verursacht demnach zwar eine Bindung an den zellulären Rezeptor durch den C-terminalen Bereich, allerdings bleibt aufgrund der Deletion des hochflexiblen Bereiches ein potentielles, durch PrP bedingtes Signal aus. Das trunzierte Protein konkurriert nach SCHMERLING *et al.* (1998) mit dem in *Prnp*^{0/0}-Mäusen hochregulierten Protein X (Abbildung 32 D). Dadurch wäre auch der ausgeprägte Phänotyp bedingt. Allerdings zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die alleinige präsynaptische Lokalisation des trunzierten PrPs keinen Einfluss auf die *paired pulse facilitation* hat.

Eine vermehrte Expression von PrP oder N-terminal deletiertem PrP auf präsynaptischer Seite verändert somit nicht die exzitatorische synaptische Übertragung. Anders jedoch stellt es sich dar, wenn PrP^C isoliert auf postsynaptischer Seite exprimiert wird. So zeigen die vorliegenden Untersuchungen an Tg82-Mäusen, dass eine L7-Promotor-gesteuerte Reinserierung des *Prnp*-Allels in *Prnp*^{0/0}-Mäuse (Abbildung 32 E) eine Alterierung der PPF bedingt. Eine rein postsynaptische Expression des zellulären Prionproteins ohne Expression in den Körnerzellen, also ausschließlich auf postsynaptischer Seite, bewirkt eine Abschwächung der PPF. Dass es sich nicht um einen Artefakt handelt, der durch das Wiedereinbringen von PrP^C über den L7-Promotor in *knock-out*-Mäuse an einen

bestimmten Locus zustande kommt, konnte durch Befunde zur PPF an einer zweiten Mauslinie bestätigt werden. Auch bei dieser Linie wurde PrP^C über einen zur Tg82-Mutation differenten Integrationsort in *Prnp*^{0/0}-Mäuse über den L7-Promotor reinseriert (Tg87). Die synaptische Übertragung an der Körnerzell-Purkinjezell-Synapse von Tg87-Mäusen ist analog zu den Tg82-Tieren verändert, was ebenfalls durch eine Verminderung der PPF deutlich wird. Im Gegensatz dazu hat das Wiedereinbringen des zellulären Prionproteins in Körnerzellen, also auf präsynaptischer Seite (Tg20-Maus), keinen Einfluss auf die *paired pulse facilitation*.

Der an den beiden L7-Linien (Tg82/87) gewonnene Befund zur PPF impliziert, dass, wie von SCHMERLING *et al.* (1998) angenommen, auf postsynaptischer Seite eine räumliche Beziehung zwischen PrP^C und einem Rezeptor existiert. Auf Grund dieser Ergebnisse stellt sich die Frage, warum dieser Phänotyp von dem der Wildtypmaus differiert, da auch diese in Purkinjezellen PrP^C exprimiert (LAINE *et al.* 2001). Dies könnte dadurch bedingt sein, dass die Reinserierung von PrP^C in *Prnp*^{0/0}-Mäuse einen funktionell additiven Effekt zur möglichen kompensatorischen Modulation des Expressionsniveaus anderer postsynaptischer Proteine darstellt. Die Möglichkeit der Bindung von PrP^C an seinen zellulären Rezeptor kann auch als Erklärungsansatz für die unveränderten Befunde zu Kurzzeitplastizität an den übrigen untersuchten transgenen Linien dienen. Da Tg20- und F35-Mäuse PrP^C bzw. trunkiertes PrP (Δ 32-121) nur präsynaptisch in den Körnerzellen überexprimieren, bleibt der postsynaptische modulierende Effekt auf Grund der nicht erfolgten Überexpression in den Purkinjezellen aus (siehe Abbildung 32). Dies spricht für eine postsynaptische Modulation der PPF durch die Reinserierung von PrP^C in *Prnp*^{0/0}-Purkinjezellen.

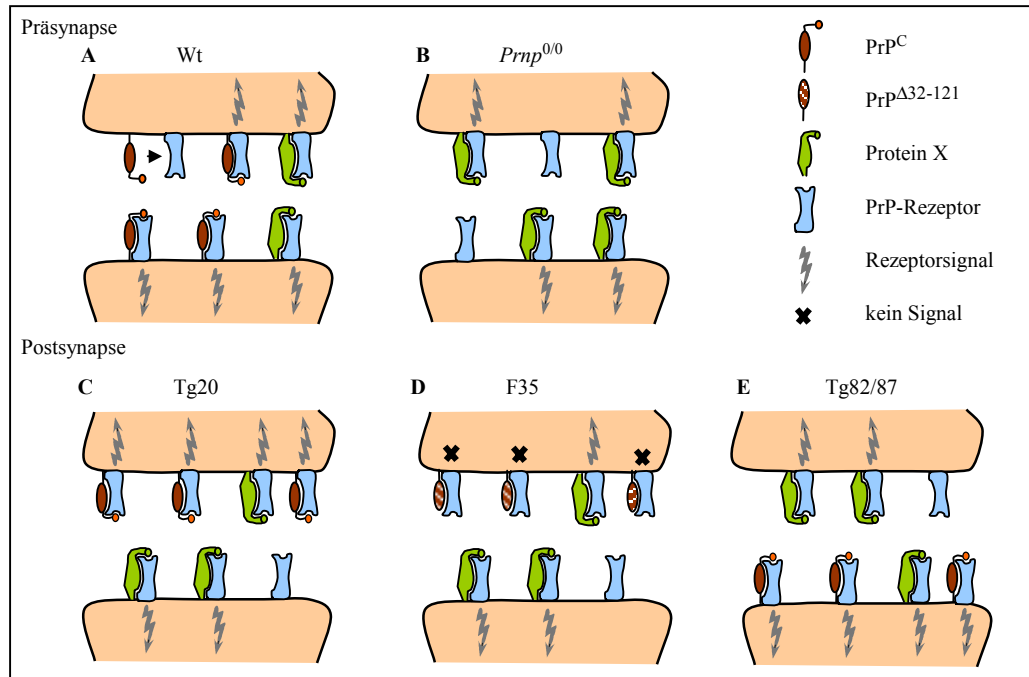


Abbildung 32: Modell zur Interaktion von PrP^C mit seinem zellulären Rezeptor (modifiziert nach SCHMERLING *et al.* 1998).

A Die Bindung an den Rezeptor bedingt ein intrazelluläres Signal (Blitz). Sowohl präsynaptische Nicht- (**B**) als auch Überexpression (**C**) von PrP^C oder trunkiertem PrP (**D**) haben keinen Einfluss auf das postsynaptische Signal. Eine Alterierung der synaptischen Übertragung an der Körnerzell-Purkinjenzell-Synapse findet ausschließlich durch den additiven Effekt der purkinjellspezifischen postsynaptischen Reinsensibilisierung von PrP^C in Prnp^{0/0}-Mäuse statt (**E**).

Eine Verminderung der *paired pulse facilitation* ist ein Merkmal für eine Verstärkung der synaptischen Übertragung. WANG & KELLY (1996, 1997a/b) zeigten, dass diese Abschwächung in der Tat durch postsynaptische Mechanismen verursacht werden kann. So bedingt eine Inhibierung der postsynaptischen Kalzium/Calmodulin-(CaM)-Signalkaskade eine Alterierung der synaptischen Doppelpulsverstärkung. Die Aktivierung kalziumabhängiger Proteinkinasen steigert die synaptische Übertragung durch direkte Interaktion mit non-NMDA-Rezeptoren und führt somit zu einer Abschwächung der Doppelpulsverstärkung. Die Bindung von PrP an einen postsynaptischen Rezeptor könnte eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang setzen, die eine Veränderung der Ca²⁺-Konzentration bewirkt. Studien von HERMS *et al.* (2000) zeigen, dass der freie intrazelluläre Kalziumgehalt in Prnp^{0/0}-Körnerzellen vor und nach einer Kaliumdepolarisation im Vergleich zum Wildtyp in der Tat vermindert ist. Sie argumentieren, dass der Verlust von PrP^C eine Veränderung der intrazellulären Kalziumhomöostase verursacht. Auch die Befunde

von WHATLEY *et al.* (1995) sprechen dafür, dass PrP^C funktionell an der Kalziumhomöostase beteiligt zu sein scheint. Die Autoren vertreten die Hypothese, dass das Prionprotein an einen Rezeptor bindet, der mit einer *second-messenger*-Kaskade gekoppelt ist, die regulatorischen Einfluss auf den intrazellulären Kalziumgehalt hat. Die Beeinträchtigung der späten Nachhyperpolarisation bei *Prnp*^{0/0}-Mäusen (COLLINGE *et al.* 1994, HERMS *et al.* 2001) sowie bei konditionierten *Prnp*-knock-out-Tieren (MALLUCI *et al.* 2002) stützen die Hypothese, dass das Prionprotein an der Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration beteiligt ist. Diese nimmt wiederum möglicherweise indirekt Einfluss auf ionotrope Glutamatrezeptoren. Auch die Ergebnisse von HERMS *et al.* (2000), die mittels eines kalziumsensitiven Farbstoffes eine Verringerung des intrazellulären basalen Kalziumgehaltes sowie nach Depolarisation von *Prnp*^{0/0}-Körnerzellen nachwiesen, bestätigen diese Befunde.

Eine Möglichkeit zur Modulation von non-NMDA-Rezeptoren über eine Erhöhung des Kalziumtiters könnte die von MOUILLET-RICHARD *et al.* (2000) postulierte Regulation der Src-Kinase Fyn durch PrP^C darstellen (Abbildung 33 I). Es konnte gezeigt werden, dass PrP^C das Phosphorylierungsniveau von Fyn erhöht, woraus deren Aktivierung resultiert. Fyn ist als intrazelluläre Kinase an der Aktivierung von Phospholipasen beteiligt, die dadurch bedingt Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP₃) generieren (JAYARAMAN *et al.* 1996). IP₃ interagiert seinerseits mit dem IP₃-Rezeptor, einem intrazellulären Kalziumkanal, der am Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist. Diese IP₃-Bindung resultiert in einer Erhöhung des somatischen Kalziumgehaltes aus intrazellulären Kalziumspeichern. Eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration aktiviert Ca²⁺-abhängige Proteinkinasen, was zu einer funktionellen Modulation von non-NMDA-Rezeptoren führt. Eine Beeinflussung von postsynaptischen Rezeptoren durch reinseriertes zelluläres PrP könnte somit eine Abschwächung der PPF bedingen (Abbildung 33 I).

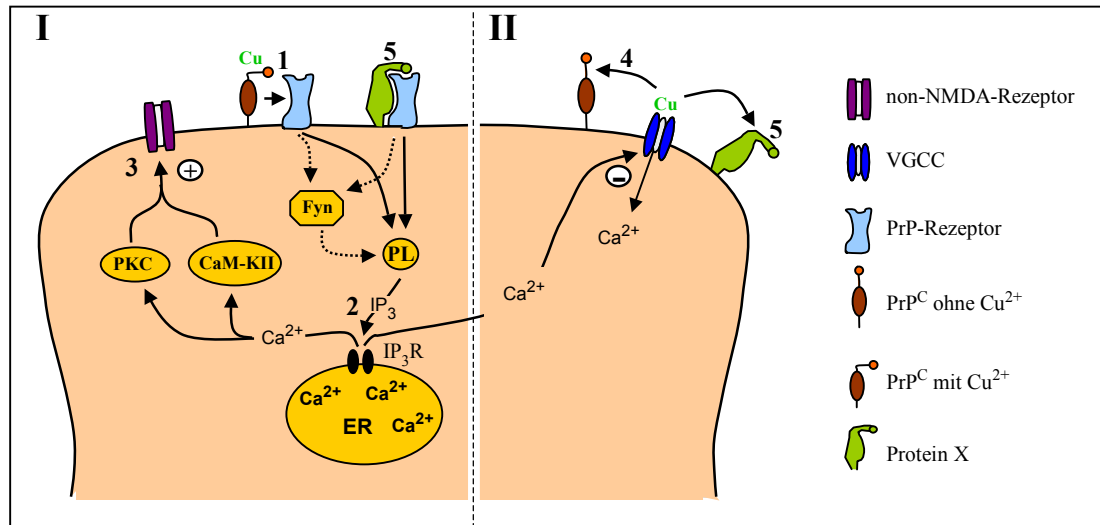


Abbildung 33: Modell zur Ca^{2+} -abhängigen postsynaptischen Modulation der PPF durch über den L7-Promotor reinsertiertes PrP^{C} .

Zwei Mechanismen zur Verstärkung der synaptischen Übertragung an exzitatorischen Synapsen sind denkbar.

I PrP^{C} induziert direkt durch die Bindung an seinen zellulären Rezeptor (1) über die Aktivierung der Fyn-Kinase, oder direkt über Phospholipasen (PL), die Bildung von IP_3 . IP_3 bindet an Rezeptoren (IP_3R) des ER (2). Daraus resultiert die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Durch die Erhöhung des Ca^{2+} -Titers werden über aktivierte Ca^{2+} -abhängige Proteinkinasen (PKC, CaM-KII) non-NMDA-Rezeptoren moduliert (3).

II Alternativ ist eine indirekte Modulation durch die Chelierung von Kupferionen durch PrP^{C} denkbar. Dadurch erhöht sich die Offenwahrscheinlichkeit für spannungsaktivierte Kalziumkanäle (VGCC) (4), was ebenfalls zu einer Erhöhung der somatischen Ca^{2+} -Konzentration führt. Eine Reinsertierung des Prnp -Allels in $\text{Prnp}^{0/0}$ -Tiere könnte einen additiven Effekt zum alterierten Expressionslevel kompensatorisch wirkender Proteine (PX) darstellen (5).

Eine weitere mögliche Erklärung der Befunde lässt sich aus den kupferbindenden Eigenschaften des Prionproteins ableiten. Wie von mehreren Autoren postuliert, scheint das zelluläre Prionprotein in die synaptische Kupferhomöostase involviert zu sein (BROWN *et al.* 1997a, HERMS *et al.* 1999), wobei dies modulatorischen Einfluss auf den Kupfergehalt im synaptischen Spalt haben könnte. NAM & HOCKBERGER (1992) zeigten, dass spannungsaktivierte Kalziumkanäle durch Kupferionen in mikromolaren Konzentrationen inhibiert werden. So könnte an den Purkinjezellen lokalisiertes PrP^{C} Kupferionen chelieren und die Hemmung spannungsaktivierter Kalziumkanäle verhindern (Abbildung 33 II). Eine Folge davon wäre die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration nach Depolarisation der Membran. Um die Rolle der Kupferbindung von PrP^{C} auf die synaptische Übertragung genauer zu untersuchen, wurden weitere Experimente zur

Kurzzeitplastizität durchgeführt. Hierbei wurden Zeitverlaufsstudien zur Messung der *paired pulse facilitation* an Wildtyp- und *Prnp*^{0/0}-Purkinjezellen unter Chelierung von Kupferionen durch Ca-EDTA durchgeführt. Wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben, resultiert die Bindung von Kupfer nicht in einer Alterierung der EPSC Amplituden bei Wildtyp- und *Prnp*^{0/0}-Zellen. Auch Mäuse mit aminoterminal deletiertem PrP^C (Δ 32-93, C4; Δ 32-134, F35), bei denen die gesamte kupferbindende Oktarepeatregion fehlt, zeigen keine Veränderungen der exzitatorischen Kurzzeitplastizität im Vergleich zu Kontrolltieren. Die Kupferbindung scheint demnach nicht essentiell für die exzitatorische synaptische Übertragung zu sein. Allerdings muss bei beiden Deletionsmutanten darauf hingewiesen werden, dass sich die Reinsierung des verkürzten PrPs nicht auf die Purkinjezellen bezieht, und mit diesem Versuchsansatz nur eine präsynaptische Beteiligung der Kupferbindung an der PPF ausgeschlossen werden kann. Die Generierung von transgenen Mäusen, die aminoterminal verkürztes PrP^C ohne die kupferbindende Oktapeptidregion über den L7-Promotor exprimieren, könnte zur Klärung der Funktion des Kupfers an der postsynaptischen Seite exzitatorischer Synapsen beitragen. Die Untersuchungen an den F35-Mäusen geben allerdings eindeutige Hinweise darauf, dass die bei dieser Maus zu beobachtende ausgeprägte Körnerzelledegeneration nicht, wie von SCHMERLING *et al.* (1998) postuliert, auf eine Modulation der exzitatorischen synaptischen Übertragung zwischen Parallelfasern und Purkinjezellen zurückgeführt werden kann. Diese ist, wie die vorliegende Arbeit zeigt, unverändert.

Die Möglichkeit der Interaktion von PrP^C mit einem zellulären Rezeptor (Abbildung 33 I) erscheint zur Erklärung der Befunde zur PPF als ein wahrscheinlicher Mechanismus. Diverse Studien beschreiben mögliche Interaktionspartner für das Prionprotein wie GFAP (engl.: *glial fibrillary acidic protein*, OESCH *et al.* 1990), Bcl-2 (KURSCHNER & MORGAN 1995, 1996), molekulare Chaperone, das Amyloid-Vorläufer-ähnliche Protein 1 (APLP1, YEHIELY *et al.* 1997) und ein 66-kDa Membranprotein, das bislang nicht genauer charakterisiert werden konnte (MARTINS *et al.* 1998). RIEGER *et al.* identifizierten 1997 mittels Transfektionsstudien an Hefezellen den 37-kDa Laminin-Rezeptor-Vorläufer (LRP) als einen potentiellen Bindungskandidaten für das zelluläre Prionprotein. Durch Co-Infektions- und Co-Transfektionstudien an Säuger- und Insektenzellen konnte diese

Interaktion *in vivo* verifiziert werden. Der Lamininrezeptor stellt einen multifunktionales membranassoziiertes Protein dar, das in diverse kalziumgesteuerte Mechanismen funktionell integriert ist, wie die neuronale Zellproliferation (GHUYSEN-ITARD *et al.* 1992), gekennzeichnet durch Neuritogenese (TOMASELLI & REICHARDT 1988), Zellmigration (LIESI *et al.* 1992, RIVAS & HATTEN 1995) und die Re- und Degeneration sowohl von Axonen als auch von Neuronen (SALONEN *et al.* 1997). Auf Grund der Kalziumabhängigkeit der genannten Mechanismen ist eine Interaktion des Prionproteins mit dem 37-kDa Laminin-Rezeptor-Vorläufer für eine mögliche postsynaptische Regulation der Kalziumhomöostase denkbar.

4.2 Modulation spannungssensitiver Kalziumkanäle durch das Prionprotein

Mehrere Autoren postulieren eine Beteiligung des Prionproteins bei der Regulation der neuronalen Kalziumhomöostase (WHATLEY *et al.* 1995, FLORIO *et al.* 1996 HERMS *et al.* 1997, 2000). So wird die Alteration von spannungssensitiven Kalziumkanälen als Ursache für den Untergang von Neuronen diskutiert. Es wurde gezeigt, dass Modulationen der Kalziumhomöostase durch den alterierten Ca^{2+} -Einstrom durch VGCCs zur Apoptose von Neuronen führt (GALLO *et al.* 1987, GALLI *et al.* 1995, BERRIDGE 1998). Eine Konvertierung von PrP^{C} zu PrP^{Sc} könnte bewirken, dass mit dem Verlust des zellulären Prionproteins ein Funktionsverlust von PrP^{C} im Hinblick auf seine modulierende Wirkung auf Ca^{2+} -Kanäle einhergeht. Auf Grund dieser Überlegungen sollte diese Arbeit durch *patch-clamp*-Experimente an cerebellären Körnerzellkulturen Aufschluss über die Modulation von spannungssensitiven Kalziumkanälen durch PrP geben. Auch die Relevanz der einzelnen Domänen des Prionproteins, unter anderem im Hinblick auf die kupferbindenden Eigenschaften des Proteins, stellte einen wichtigen, aufzuklärenden Punkt dar.

4.2.1 Anteil und Kinetik von L- und N-Typ-Kalziumströmen wird nicht durch die PrP^{C} -Expression moduliert

HERMS *et al.* 2000 zeigten, dass die PrP^{C} -Expression Einfluss auf die Kalziumhomöostase hat. Mikrofluorometrische Messungen belegen eine Verminderung des intrazellulären Kalziumgehalts vor sowie nach Depolarisation von

kultivierten Körnerzellen aus dem Cerebellum von *Prnp*^{0/0}-Mäusen durch eine hohe Kaliumchloridkonzentration. Die Autoren vermuten, dass die veränderte Kalziumhomöostase durch spannungssensitive L-Typ-Kalziumkanäle vermittelt wird. *Patch-clamp*-Experimente an kultivierten Körnerzellen, die Teil dieser Arbeit waren, zeigen, dass die Kalziumleitfähigkeiten und der Anteil von L- und N-Typ-VGCCs bei *Prnp*^{0/0}-Zellen allerdings nicht wie erwartet alteriert sind. Auch eine Modulation des Ruhemembranpotentials, hervorgerufen durch den Verlust des zellulären Prionproteins, stellte sich nicht dar. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die *patch-clamp*-Technik eine möglicherweise bestehende Modulation von Kalziumströmen maskiert. Der Kalziumeinstrom durch spannungssensitive Kalziumkanäle wird durch verschiedene intrazelluläre Mechanismen moduliert. Ein Austausch der Intrazellulärlösung durch die Pipettenlösung könnte in einem Verlust zytoplasmatischer Substanzen resultieren. So konnten GUERRA *et al.* (1996) nachweisen, dass intrazelluläre freie Sauerstoffradikale L-Typ-VGCCs modulieren. Durch Applikation der antioxidant wirkenden Cu/Zn-Superoxiddismutase (SOD) wurde dieser Effekt antagonisiert. Das kupferbindende Enzym Superoxiddismutase zeigt in *Prnp*^{0/0}-Mäusen eine signifikant reduzierte Aktivität (BROWN *et al.* 1997b). Falls die aufgrund des PrPC-Verlustes verminderte SOD-Aktivität verantwortlich für einen verminderten Einstrom von Kalziumionen durch L-Typ-VGCCs ist, wäre dieser Effekt bei *patch-clamp*-Messungen durch den raschen Austausch der Intrazellularflüssigkeit mit der Pipettenlösung nicht zu detektieren.

Ob die Expression von PrPC tatsächlich bei der Modulation spannungsaktivierter Kalziumkanäle eine Rolle spielt, kann durch diese Experimente allerdings nicht ausgeschlossen werden. Diverse Studien belegen, dass spannungsaktivierte Kalziumströme bei der Entwicklung von Neuronen regulatorischen Mechanismen unterliegen (BLALOCK *et al.* 1999, COLLINGS *et al.* 1999). Ihre Ausprägung und Verteilung ist stark assoziiert mit verschiedenen kritischen Phasen der Zellentwicklung, wie der Differenzierung (SPITZER *et al.* 1994), dem Neuritenwachstum (MATTSON & KATER 1987, RUSANESCU *et al.* 1995) oder der Synaptogenese (BASARSKY *et al.* 1994). Es ist denkbar, dass eine physiologisch relevante Folge des PrP-Verlustes für VGCCs durch modulatorische Mechanismen, wie die Überexpression anderer Proteine, teils kompensiert wird. Somit ist es möglich, dass der funktionelle Zusammenhang zwischen PrP und

spannungssensitiven Kalziumkanälen nur schwer durch den Vergleich spannungssensitiver Kalziumströme von Wildtyp- mit *knock-out*-Körnerzellen untersucht werden kann.

4.2.2 L-Typ-spannungssensitive Kalziumkanäle werden durch rekombinantes PrP inhibiert

Um die Interaktion von PrP mit spannungssensitiven Kalziumkanälen zu untersuchen, wurden weitere Experimente an cerebellären Körnerzellkulturen durchgeführt, bei denen rekombinantes Prionprotein bei fortlaufender Messung in die Messkammer appliziert wurde. Wie gezeigt wurde, resultiert die Applikation von rekombinantem Prionprotein in einer signifikanten Reduktion des Ioneneinstroms durch spannungsaktivierte Kalziumkanäle. Die Zugabe von bovinem und humanem rekombinanten PrP resultierte in annähernd der gleichen Inhibition des Kalziumeinstroms wie die Applikation von Maus-PrP. Dies lässt den Schluss zu, dass leichte Variationen in der Aminosäuresequenz von PrP (GROSHUP *et al.* 1997) keinen Einfluss auf den beobachteten Effekt von rekombinantem Prionprotein auf spannungssensitive Kalziumkanäle haben.

Eine Inkubation der Zellen mit Nifedipin hebt die gemessene Verminderung spannungssensitiver Ströme auf. Ursache für die beobachtete Inhibierung ist somit eine Modulation der Leitfähigkeit von L-Typ-VGCCs durch die Applikation von recPrP. Auch der Betrag der Reduktion entspricht dem gemessenen L-Typ-Strom-Anteil bei cerebellären Körnerzellen (Kapitel 3.2.1). Dieser Befund lässt sich gut mit den von WHATLEY *et al.* (1995) an Synaptosomenpräparationen aus dem Gehirn der Ratte erhobenen Daten vereinbaren. Die Autoren beschreiben eine mögliche Rolle des Prionproteins bei der Regulation der Leitfähigkeit spannungsaktivierter Kalziumkanäle. So wurde gezeigt, dass die Applikation von rekombinantem Prionprotein auf Synaptosomen, einen dosisabhängigen Anstieg des freien intrazellulären Kalziums bewirkt. Ein weiterer Befund dieser Arbeit war, dass die Inkubation von depolarisierten Synaptosomen mit gegen PrP^C gerichteten Antikörpern eine Reduktion des intrazellulären Kalziumgehaltes hervorrief, die durch die Applikation von rekombinantem PrP aufgehoben wurde.

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine Depolarisation von kultivierten Körnerzellen, die zuvor mit recPrP inkubiert wurden, keinen vermehrten Anstieg des Kalziumeinstroms durch spannungsaktivierte Kalziumkanäle hervorruft. Im Gegenteil zeigen die in Kapitel 3.2.2 dargestellten Ergebnisse, dass eine Inhibierung von L-Typ-Kanälen die Folge einer Behandlung mit recPrP ist. Eine Inaktivierung von L-Typ-VGCCs durch eine Erhöhung des intrazellulären Kalziumgehaltes wird von mehreren Autoren beschrieben (KALMANN *et al.* 1988, IMREDY & YUE 1994, ZÜHLKE & REUTER 1998). Die Applikation von recPrP verursacht nach WHATLEY *et al.* (1995) eine Erhöhung des intrazellulären freien Kalziums. Die Befunde dieser Arbeit sprechen allerdings dafür, dass die Interaktion von rekombinatem PrP mit seinem zellulären Rezeptor den wahrscheinlichen Mechanismus zur Modulation des intrazellulären Kalziumtiters und damit der Leitfähigkeit von VGCCs darstellt. Diese Bindung von PrP an den Rezeptor könnte eine Inhibierung von L-Typ-VGCCs über intrazelluläre Mechanismen, wie z. B. die Modulation der intrazellulären Kalziumkonzentration durch die Ca^{2+} -Freisetzung aus endogenen Speichern bewirken (Abbildung 34 I). Eine Anhebung des somatischen Ca^{2+} -Titers verringert die Leitfähigkeit spannungssensitiver Kalziumkanäle entweder durch direkte Interaktion mit einer regulatorischen Untereinheit des Kanals oder durch Aktivierung einer intrazellulären Kinase, die spannungsaktivierte Kalziumkanäle durch Phosphorylierung inaktiviert (LEVITAN 1999). Die Beteiligung der Fyn-Kinase an der Regulation spannungssensitiver L-Typ-Kanäle kann durch zweierlei Befunde ausgeschlossen werden. Körnerzellen Fyn-defizienter Mäuse, zeigen ebenso wie Wt-Zellen, denen durch die *Patchelektrode* nach der Inkubation mit rekombinatem PrP der Src-Kinasehemmer PP1 zugeführt wurde, keinen veränderten Kalziumeinstrom auf eine Depolarisation.

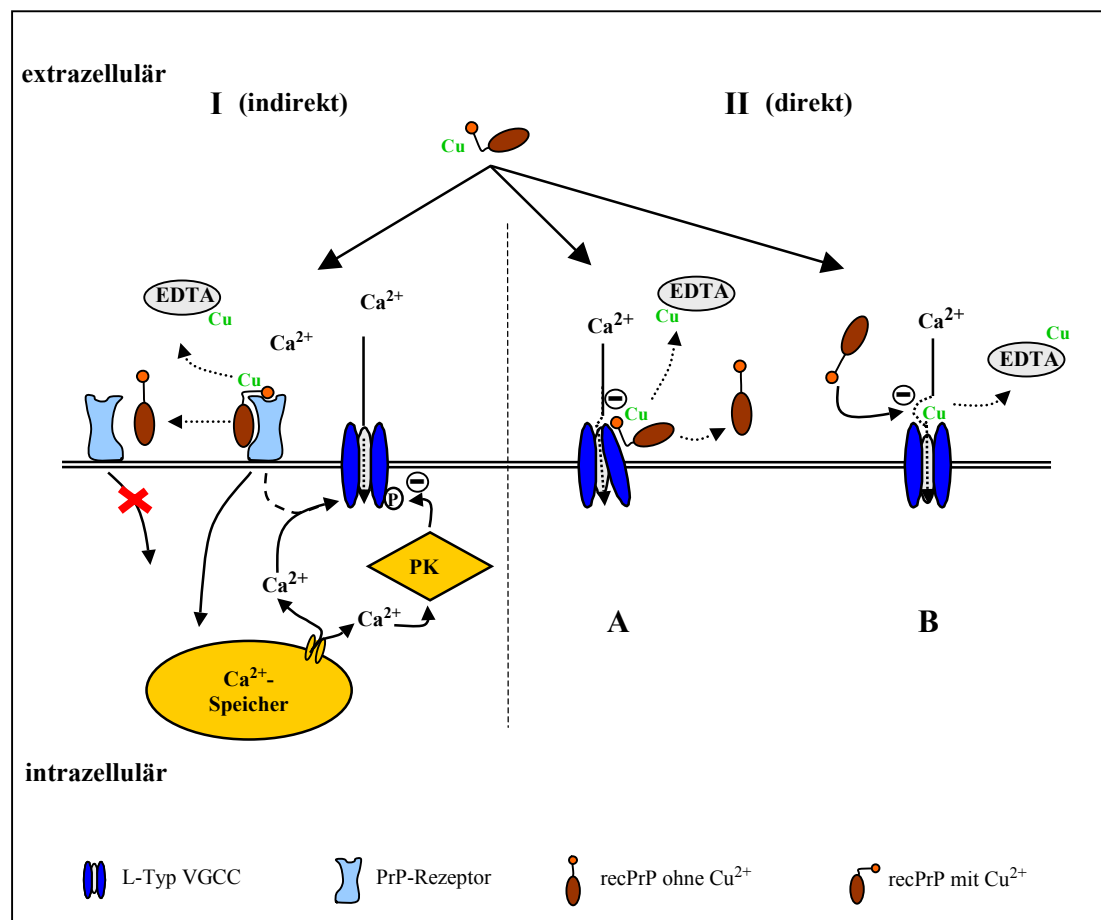


Abbildung 34: Hypothese zur Wirkungsweise von recPrP auf L-Typ VGCCs.

I Rekombinantes PrP bindet an einen membranständigen Rezeptor. Die recPrP-Bindung verursacht eine Erhöhung der freien intrazellulären Kalziumkonzentration über die Ausschüttung aus intrazellulären Kalziumspeichern. Ca²⁺ moduliert den L-Typ-Kanal direkt oder über die Phosphorylierung (P) durch eine Ca²⁺-abhängige Proteinkinase (PK).

II RecPrP könnte direkt mit seiner durch Kupfer strukturierten N-terminalen Region L-Typ-Kalziumkanäle blockieren (A). Die Applikation von recPrP führt zu einer Anreicherung von Kupferionen an der Membran, die ihrerseits spannungsaktivierte Kalziumkanäle inhibieren können (B).

Die Applikation von Ca-EDTA bedingt eine Chelierung von PrP- und VGCC-ständigem Cu²⁺, wodurch die direkte (I) und indirekte (II) Inhibition (⊖) der VGCC aufgehoben wird.

Eine mögliche Ursache für eine herabgesetzte Leitfähigkeit von spannungssensitiven Kalziumkanälen durch appliziertes PrP könnte auch von den kupferbindenden Eigenschaften von PrP herrühren. So belegt die vorliegende Arbeit, dass die Kupferbindung von rekombinantem Prionprotein einen wesentlichen Faktor bei der beobachteten Inhibition von dihydropyridinsensitiven Kalziumkanälen darstellt. Wie gezeigt wurde, ist die aminoterminalen Region des Prionproteins mit der hoch konservierten *Oktapeptidrepeat*-Region für den modulatorischen Einfluss auf

spannungssensitive Kalziumströme verantwortlich. Im Gegensatz dazu bedingt die alleinige Applikation des carboxyterminalen Anteils keinen signifikanten Effekt. Es ist möglich, dass Kupfer die Struktur von PrP verändert und somit eine indirekte Modulation der Leitfähigkeit von VGCCs bedingt (Abbildung 34 I). MIURA *et al.* (1996) zeigten, dass Kupferionen in der Lage sind, den flexiblen N-terminalen Bereich des Prionproteins strukturell zu stabilisieren. Diese Hypothese gewinnt durch die Beobachtung an Gewicht, dass eine Chelierung von Kupferionen mit Ca-EDTA die Inhibierung von L-Typ-Strömen aufhebt.

Alternativ ist denkbar, dass über eine direkte Interaktion von PrP^C mit dem L-Typ-VGCC dessen Leitfähigkeit herabgesetzt wird (Abbildung 34 II). Dieser Mechanismus könnte sowohl durch PrP direkt (Abbildung 34 IIA) als auch durch das an PrP gebundene Kupfer (Abbildung 34 IIB) hervorgerufen werden. Auch hierbei spielt die Konformation des N-terminalen Bereiches die entscheidende Rolle, da eine Chelierung des N-terminal gebundenen Kupfers die Inhibition aufhebt. 10 μM CuCl_2 rufen eine dem *recPrP* adäquate Inhibierung von Ca^{2+} -Strömen hervor. Dieser Befund steht im Einklang mit Ergebnissen von NAM & HOCKBERGER (1992), die ebenfalls eine 30 %ige Abnahme von Kalziumströmen in Purkinjezellen durch Kupferionen, die von Edelstahl-Injektionsnadeln freigesetzt werden, beschreiben. Im Gegensatz dazu bedingt die Applikation von 1 μM CuCl_2 keine Modulation spannungssensitiver Kalziumströme. Diese Kupferkonzentration entspricht ungefähr der Menge an Kupferionen, die von 250 nM PrP gebunden werden können. Angenommen, rekombinantes PrP würde sich an der Zellmembran anreichern, so würde dies auch zu einer Ansammlung von Kupferionen in der direkten Umgebung spannungsaktivierter Kalziumkanäle führen, so dass die lokale Kupferkonzentration an der Membran weit über der applizierten Menge an CuCl_2 liegt (Abbildung 34 II B). Die Chelierung der Kupferionen durch EDTA hebt den Kupferblock oder den kupferbedingten PrP-Block von L-Typ-Kanälen auf.

4.3 Hypothetisches Modell zur Rolle von PrP^C an der exzitatorischen Synapse

Das zelluläre Prionprotein wird im Cerebellum sowohl in den Purkinjezellen als auch in den Körnerzellen exprimiert (LAINE *et al.* 2001). Aus den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen lassen sich folgende Schlussfolgerungen über die Funktion des zellulären Prionproteins an Prä- und Postsynapse ziehen:

Bei der synaptischen Vesikelverschmelzung gelangen Kupferionen in den synaptischen Spalt (HARTTER & BARNEA 1988, KARDOS *et al.* 1989). Kupfer ist in der Lage, spannungsaktivierte Kalziumkanäle zu inhibieren (NAM & HOCKBERGER 1992) und damit deren Leitfähigkeit herabzusetzen. Befunde dieser Arbeit deuten darauf hin, dass speziell die L-Typ-Kalziumkanäle von dieser Inhibition betroffen sind. An der Membran lokalisiertes Prionprotein verhindert möglicherweise die Hemmung der VGCCs durch Chelierung der Kupferionen mittels seines unstrukturierten N-terminalen Bereiches (Abbildung 35 (1)) und erhöht damit die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals. Dies spricht für den protektiven Charakter von synaptisch lokalisiertem PrP. Die aminoternale Kupferbindung führt zu einer Umfaltung und der strukturellen Stabilisierung von PrP^C (MIURA *et al.* 1996). Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass PrP^C möglicherweise in Abhängigkeit von der Kupferbindung des Aminoterminus an einen Rezeptor bindet (Abbildung 35 (2)). Durch diesen Rezeptor wird über eine Signalkaskade Kalzium aus intrazellulären Speichern mobilisiert (Abbildung 35 (3)). Der Anstieg des somatischen Kalziumtiters wiederum moduliert die Leitfähigkeit spannungssensitiver Kalziumkanäle (LEVITAN 1999, Abbildung 35 (4)).

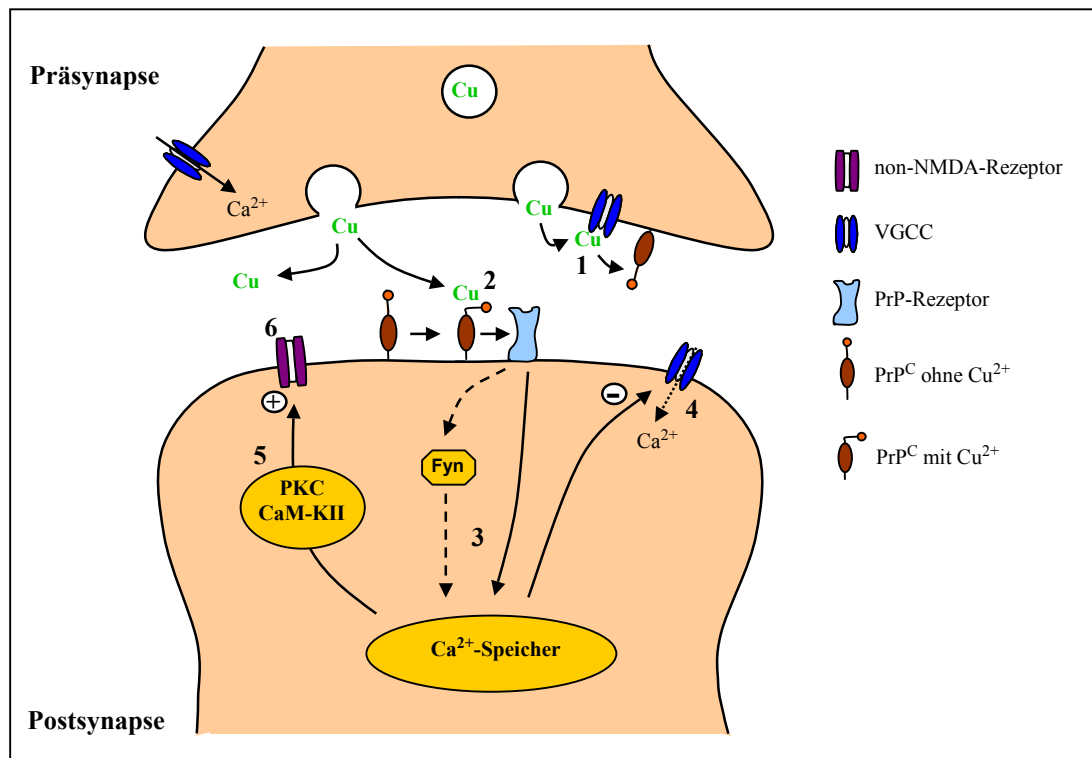


Abbildung 35: Hypothetisches Modell zur Funktion von PrPC an der exzitatorischen Synapse. Erläuterung siehe Text.

Die Interaktion von PrPC mit seinem zellulären Rezeptor kann ebenfalls als Erklärungsansatz für die erhobenen Befunde der vorliegenden Arbeit zur Kurzzeitplastizität herangezogen werden. Ausschließlich postsynaptisch PrP-exprimierende Mäuse weisen eine alterierte Kurzzeitplastizität an der exzitatorischen Synapse auf. PrPC könnte direkt über die Rezeptorbindung oder über die daraus resultierende Interaktion mit der Fyn-Kinase (MOUILLET-RICHARD *et al.* 2000) intrazelluläre Mechanismen steuern, die eine Alterierung der Kalzium/Calmodulin-Signalkaskade induzieren (Abbildung 35 (5)). Ob hierbei die kupferbindenden Eigenschaften entscheidend sind, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden. Angesichts der Tatsache, dass eine Chelierung von Kupferionen keine Beeinflussung der Kurzzeitplastizität bedingt (siehe Kapitel 3.1.4), erscheint diese Möglichkeit aber unwahrscheinlich. Eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration beeinflusst non-NMDA-Rezeptoren über aktivierte Proteinkinasen (Abbildung 35 (6), WANG & KELLY 1996, 1997a/b) und wirkt dabei modulatorisch auf die exzitatorische, synaptische Übertragung.

Zusammengenommen deuten die in dieser Arbeit dargestellten Befunde der *patch-clamp*-Messungen darauf hin, dass Pr^{PC} bei der Modulation der synaptischen Übertragung an der exzitatorischen Synapse eine wichtige Rolle spielt. Bedeutende Gesichtspunkte sind hierbei die kupfer- und N-Terminus-abhängige Beeinflussung spannungsaktivierter Kalziumkanäle sowie die postsynaptische Regulation der intrazellulären Kalziumhomöostase durch das zelluläre Prionprotein.

4.3 Bedeutung der Pr^{PC}-Pr^{Sc}-Konversion für die Pathophysiologie von TSEs

Für die Pathophysiologie von Prionerkrankungen könnte die Konversion von Pr^{PC} zu Pr^{Sc} mit einem Funktionsverlust des zellulären Prionproteins einhergehen. Der Verlust von Pr^{PC} an der exzitatorischen Synapse hätte mehrere Folgen. Die fehlende Pufferkapazität der Zelle durch PrP würde zu einer erhöhten Kupferkonzentration an der Membran führen, da bei der synaptischen Vesikelverschmelzung Kupfer von der Präsynapse her in den synaptischen Spalt gelangt. Die Kupferinhibition von spannungsaktivierten L-Typ-Kalziumkanälen (Abbildung 36 (1)) kann sowohl prä- als auch postsynaptisch zu einer Störung der Kalziumhomöostase führen, wodurch sich auch der beobachtete Untergang von Neuronen erklären ließe (KRETZSCHMAR *et al.* 1996). Da die Interaktion von Pr^{Sc} mit Kupfer als wahrscheinlich gilt (MIURA *et al.* 1996, MCKENZIE *et al.* 1998), führt die Akkumulation der pathologischen Isoform an der Membran zudem zu einer Anreicherung von Kupferionen an der Membran (Abbildung 36 (2)). Verstärkt wird dieser VGCC-inhibierende Effekt dadurch, dass die protektive Wirkung durch den Verlust von Pr^{PC} als Kupferfänger an der Synapse möglicherweise nicht mehr gegeben ist. Diese Faktoren führen zu einer Inhibierung von spannungsaktivierten Kalziumkanälen.

Geht man davon aus, dass die Konversion von Pr^{PC} zu Pr^{Sc} die Fähigkeit des Proteins zur Bindung an einen zellulären Rezeptor nicht beeinträchtigt, so wäre es denkbar, dass die extrazelluläre Aggregation von Pr^{Sc}, das im Gegensatz zu Pr^{PC} eine partielle Resistenz gegen Proteolyse aufweist (OESCH *et al.* 1985), zu einer Daueraktivierung des Rezeptors und der damit verbundenen intrazellulären Signalkaskade führt (Abbildung 36 (3)). Daraus würde eine massive Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Kalziumspeichern resultieren (Abbildung 36 (4)).

Elektrophysiologische Studien von JOHNSTON *et al.* (1998b) an mit Scrapie infizierten Mäusen stützen diese Vermutung einer alterierten Kalziumhomöostase durch die Konversion des zellulären Prionproteins zu seiner pathologischen Isoform.

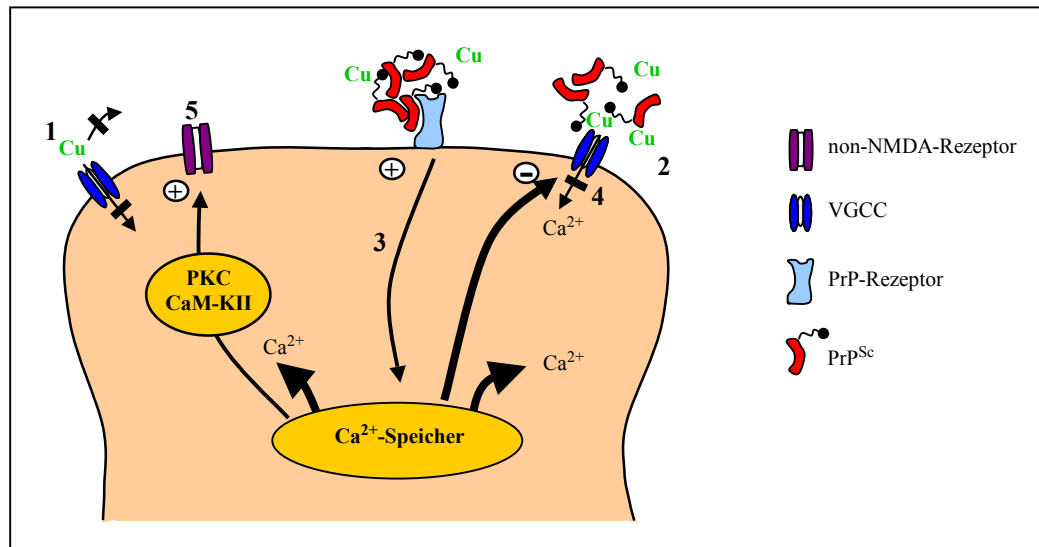


Abbildung 36: Mögliche Auswirkungen der Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc}.
Erläuterung siehe Text.

Eine permanente Herabsetzung der Leitfähigkeit der VGCCs (Abbildung 36 (4)) wäre die Folge dieses abnormal erhöhten, intrazellulären Kalziumgehalts. Gleichzeitig führt letzterer auf postsynaptischer Seite zu einer Daueraktivierung von non-NMDA-Rezeptoren (Abbildung 36 (5)) und damit verbunden zu einer veränderten Kurzzeitplastizität der exzitatorischen Synapse.

Die externe Applikation, und damit relativ unphysiologische extrazelluläre Anhäufung von rekombinanten PrP, könnte als Modell zur Darstellung des Effektes von an der Membran akkumuliertem PrP^{Sc} dienen. Ob PrP^{Sc} die vergleichbare Modulation der Kalziumströme und der intrazellulären Kalziumhomöostase, gekoppelt mit einer abnormen exzitatorischen synaptischen Übertragung, verursacht, oder die Konversion von zellulärem Prionprotein in die pathologische Isoform mit einem Funktionsverlust einhergeht, kann letztendlich nur durch *patch-clamp*-Experimente an infizierten, erkrankten Tieren untersucht werden. Alternativ stellt die Applikation von aufgereinigtem PrP^{Sc}, zum Beispiel auf Körnerzellkulturen, ein geeignetes Mittel dar. Eine endgültige Antwort zu der Rolle, die die Kupferbindung von PrP^{Sc} bei der Pathophysiologie von Prionerkrankungen einnimmt, kann nur über

entsprechende Studien an infizierten Tieren und mittels aufgereinigtem, infektiösem Agens erlangt werden.

5 Zusammenfassung

Transmissible spongiforme Enzephalopathien stellen degenerative Erkrankungen des ZNS dar, deren Erreger als Prionen bezeichnet werden. Die Funktion des Prionproteins, das ubiquitär im Gehirn lokalisiert ist, blieb bislang weitgehend ungeklärt. Für das Verständnis der TSEs ist die Aufklärung der physiologischen Funktion des zellulären Prionproteins (PrP^C) in Neuronen jedoch unabdingbar. Die Erforschung der Funktion des Prionproteins in Neuronen mit Hilfe von *patch-clamp*-Untersuchungen war zentraler Bestandteil der vorliegenden Arbeit. Es wurden Messungen an vitalen Kleinhirnschnitten zur Kurzzeitplastizität der exzitatorischen Parallelfaser-Purkinjezell-Synapse von verschiedenen prionproteintransgenen Mäusen durchgeführt. Gleichwohl waren kultivierte cerebelläre Körnerzellen Gegenstand elektrophysiologischer Messungen um den Einfluss des Prionproteins auf spannungsaktivierte Kalziumkanäle aufzuklären. Hierbei ergaben sich folgende Befunde:

I. Untersuchungen an Purkinjezellen von *Prnp*^{0/0}-Mäusen belegen, dass der Parameter der Doppelpulsverstärkung (PPF) durch das Fehlen des zellulären Prionproteins unverändert bleibt. Die Kupferbindung des Prionproteins scheint bei dieser Form der Kurzzeitplastizität keine Rolle zu spielen, da die Chelierung von Kupferionen keinen Einfluss auf die synaptische Übertragung von Wildtyp- und *knock-out*-Mäusen hat. Auch Mäuse, bei denen präsynaptisch ein um die kupferbindende Domäne deletiertes PrP reinsertiert wurde (C4-Maus, F35-Maus), zeigen sich hinsichtlich dieses Parameters unauffällig. Die bei der F35-Maus auftretende Ataxie und die Körnerzelldegeneration resultieren demnach nicht aus einer alterierten exzitatorischen synaptischen Übertragung. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen allerdings, dass im Gegensatz zur präsynaptischen Überexpression von PrP^C bei der Tg20-Maus die purkinjezellspezifische Reinsertierung von PrP in die *knock-out*-Maus (Tg82-, Tg87-Maus) zu einer signifikanten Abschwächung der *paired pulse facilitation* an der Purkinjezell-Körnerzell-Synapse führt. Die in mehreren Arbeiten postulierte Bindung von PrP an einen postsynaptischen Rezeptor könnte eine intrazelluläre Signalkaskade steuern, die eine Veränderung der somatischen freien Ca²⁺-Konzentration bewirkt. Eine Aktivierung kalziumabhängiger Proteinkinasen verstärkt die synaptische Übertragung durch direkte Interaktion mit non-NMDA-Rezeptoren und führt somit zu einer

Abschwächung der Doppelpulsverstärkung. Dies lässt den Schluss zu, dass das postsynaptisch lokalisierte Prionprotein die synaptische Übertragung moduliert.

II. Die Amplitude und Kinetik des Ioneneinstroms durch spannungsaktivierte Ca^{2+} -Kanäle wird nicht durch die PrP^{C} -Expression beeinflusst. Es ergibt sich zudem, dass der Anteil von L- und N-Typ-Strömen bei $\text{Prnp}^{0/0}$ -Körnerzellen im Vergleich zu Wildtypkontrollzellen unverändert ist. Die Applikationen von in bakteriellen Systemen gewonnenen Prionprotein auf kultivierte Körnerzellen verursacht eine signifikante Abnahme des L-Typ-VGCC-vermittelten Kalziumeinstromes sowohl bei $\text{Prnp}^{0/0}$ - als auch bei Wildtyp-Körnerzellen. Eine Beteiligung des zellulären Prionproteins als potentieller zellulärer Interaktionspartner für das recPrP konnte demnach ausgeschlossen werden. Dabei erwies sich die Inhibierung des L-Typ-VGCC als unabhängig von der artspezifischen Aminosäuresequenz des verwendeten rekombinanten PrPs . Durch die Applikation von recPrP -Fragmenten und die Chelierung von Kupferionen mittels EDTA konnte nachgewiesen werden, dass diese Inhibierung des L-Typ-Stromes auf die kupferbindenden Eigenschaften der evolutionär hochkonservierten Oktapeptidregion zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse sind ein Beleg dafür, dass die Bindung von recPrP an einen zellulären Rezeptor über die Modulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu einer Inhibierung von L-Typ-VGCCs führt. Jedoch ist eine direkte Modulation spannungsaktivierter Kalziumkanäle durch die kupferbindende Region des rekombinanten PrP nicht auszuschließen.

Insgesamt geben die Ergebnisse dieser Arbeit Evidenzen dafür, dass das zelluläre Prionprotein an der Modulation der synaptischen Übertragung beteiligt ist. Hierbei spielen sowohl die Beeinflussung spannungsaktivierter Kalziumkanäle als auch die postsynaptische Regulation der intrazellulären Kalziumhomöostase eine Rolle. Für die Pathophysiologie der TSEs könnte die Konversion von PrP^{C} zu PrP^{Sc} mit einem Funktionsverlust des zellulären PrP als Kupferpuffer am synaptischen Spalt verbunden sein, wodurch eine Störung der Kalziumhomöostase bedingt wird. Zudem kann die extrazelluläre Anreicherung von PrP^{Sc} , verbunden mit der Daueraktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, zu einer Alterierung der synaptischen Übertragung durch die Beeinflussung spannungssensitiver Kalziumkanäle und postsynaptischer Glutamatrezeptoren führen.

6 Literaturverzeichnis

ABBOTT JR & LITZINGER MJ (1994). Different omega-conotoxins mark the development of Swiss Webster mouse cortex suggesting N-type voltage sensitive calcium channel subtypes. *Int J Dev Neurosci* **12**:43-47.

ALPER T, HAIG DA & CLARKE MC (1966). The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem Biophys Res Commun* **22**:278-284.

ALPER T, CRAMP W, HAIG DA & CLARKE MC (1967). Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* **214**:764-766.

ATWOOD CS, HUANG X, MOIR RD, TANZI RE & BUSH AI (1999). Role of free radicals and metal ions in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Met Ions Biol Syst* **36**:309-364.

AUGUSTIN I, BETZ A, HERRMANN C, JO T & BROSE N (1999a). Differential expression of two novel Munc13 proteins in rat brain. *Biochem J* **337 Pt 3**:363-371.

AUGUSTIN I, KORTE S, RICKMANN M, KRETZSCHMAR HA, SÜDHOF TC, HERMS JW & BROSE N (2001). The cerebellum-specific munc13-3 regulates cerebellar synaptic transmission and motor learning in mice. *J Neurosci* **21**:10-17.

AUGUSTIN I, ROSENMUND C, SUDHOF TC & BROSE N (1999b). Munc13-1 is essential for fusion competence of glutamatergic synaptic vesicles. *Nature* **400**:457-461.

BARROW PA, HOLMGREN CD, TAPPER AJ & JEFFERYS JG (1999). Intrinsic physiological and morphological properties of principal cells of the hippocampus and neocortex in hamsters infected with scrapie. *Neurobiol Dis* **6**:406-423.

BASARSKY TA, PARPURA V & HAYDON PG (1994). Hippocampal synaptogenesis in cell culture: developmental time course of synapse formation, calcium influx, and synaptic protein distribution. *J Neurosci* **14**:6402-6411.

BERRIDGE MJ (1998). Neuronal calcium signaling. *Neuron* **21**:13-26.

BIRNBAUMER L, CAMPBELL KP, CATTERALL WA, HARPOLD MM, HOFMANN F, HORNE WA, MORI Y, SCHWARTZ A, SNUTCH TP & TANABE T (1994). The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron* **13**:505-506.

BLALOCK EM, PORTER NM & LANDFIELD PW (1999). Decreased G-protein-mediated regulation and shift in calcium channel types with age in hippocampal cultures. *J Neurosci* **19**:8674-8684.

BLUNDON JA, WRIGHT SN, BRODWICK MS & BITTNER GD (1993). Residual free calcium is not responsible for facilitation of neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:9388-9392.

BORCHELT DR, ROGERS M, STAHL N, TELLING G & PRUSINER SB (1993). Release of the cellular prion protein from cultured cells after loss of its glycoinositol phospholipid anchor. *Glycobiology* **3**:319-329.

BORCHELT DR, KOLIATSOS VE, GUARNIERI M, PARDO CA, SISODIA SS & PRICE DL (1994). Rapid anterograde axonal transport of the cellular prion glycoprotein in the peripheral and central nervous systems. *J Biol Chem* **269**:14711-14714.

BOURINET E, ZAMPONI GW, STEA A, SOONG TW, LEWIS BA, JONES LP, YUE DT & SNUTCH TP (1996). The alpha 1E calcium channel exhibits permeation properties similar to low-voltage-activated calcium channels. *J Neurosci* **16**:4983-4993.

BRADLEY R (1998). An overview of the BSE epidemic in the UK. *Dev Biol Stand* **93**:65-72.

BROWN DR, SCHMIDT B & KRETZSCHMAR HA (1996a). A neurotoxic prion protein fragment enhances proliferation of microglia but not astrocytes in culture. *Glia* **18**:59-67.

BROWN DR, SCHMIDT B & KRETZSCHMAR HA (1996b). Role of microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* **380**:345-347.

BROWN DR, QIN K, HERMS JW, MADLUNG A, MANSON J, STROME R, FRASER PE, KRUCK T, VON BOHLEN A, SCHULZ-SCHAEFFER W, GIESE A, WESTAWAY D & KRETZSCHMAR H (1997a). The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* **390**:684-687.

BROWN DR, SCHULZ-SCHAEFFER WJ, SCHMIDT B & KRETZSCHMAR HA (1997b). Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol* **146**:104-112.

BROWN DR & BESINGER A (1998). Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem J* **334**:423-429.

BROWN DR, WONG BS, HAFIZ F, CLIVE C, HASWELL SJ & JONES IM (1999). Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem J* **344 Pt 1**:1-5.

BÜELER H, FISCHER M, LANG Y, BLUETHMANN H, LIPP HP, DEARMOND SJ, PRUSINER SB, AGUET M & WEISSMANN C (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* **356**:577-582.

BÜELER H, AGUZZI A, SAILER A, GREINER RA, AUTENRIED P, AGUET M, & WEISSMANN C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* **73**:1339-1347.

BURGER D & HARTSOUGH GR (1965). Encephalopathy of mink - II. Experimental and natural transmission. *J Infect Dis* **115**:393-399.

CALLEBAUT I, TASSO A, BRASSEUR R, BURNY A, PORTETELLE D & MORNON JP (1994). Common prevalence of alanine and glycine in mobile reactive centre loops of serpins and viral fusion peptides: do prions possess a fusion peptide? *J Comput Aided Mol Des* **8**:175-191.

CAUGHEY B & RAYMOND GJ (1991). The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J Biol Chem* **266**:18217-18223.

- CHANDLER RL (1961). Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet* **1**:1378-1379.
- CHANDLER RL & TURFREY BA (1972). Inoculation of voles, Chinese hamsters, gerbils and guinea-pigs with scrapie brain material. *Res Vet Sci* **13**:219-224.
- CHAPMAN ER, HANSON PI, AN S & JAHN R (1995). Ca²⁺ regulates the interaction between synaptotagmin and syntaxin 1. *J Biol Chem* **270**:23667-23671.
- CHEN SG, TELOW DB, PARCHI P, TELLER JK, GAMBETTI P & AUTILIO-GAMBETTI L (1995). Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases. *J Biol Chem* **270**:19173-19180.
- CLARK WW, HOURRIGAN JL & HADLOW WJ (1995). Encephalopathy in cattle experimentally infected with the scrapie agent. *Am J Vet Res* **56**:606-612.
- COHEN FE, PAN KM, HUANG Z, BALDWIN M, FLETTERICK RJ & PRUSINER SB (1994). Structural clues to prion replication. *Science* **264**:530-531.
- COLLINGE J, WHITTINGTON MA, SIDLE KC, SMITH CJ, PALMER MS, CLARKE AR & JEFFERYS JG. (1994). Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* **370**:295-297.
- COLLING SB, COLLINGE J & JEFFERYS JG (1996). Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca(2+)-activated K⁺ currents. *Neurosci Lett* **209**:49-52.
- COLLINGS MA, BREWER GJ & EVANS MS (1999). Calcium currents of embryonic and adult neurons in serum-free culture. *Brain Res Bull* **48**:73-78.
- CREUTZFELDT HG (1920). Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z Gesamte Neurol Psychiatr* **57**:1-18.
- CUILLE J & CHELLE PL (1936). Pathologie animale – La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? *C R Acad Sci (III)* **203**:1552-1554.
- DAWSON M, WELLS GA, PARKER BN & SCOTT AC (1990). Primary parenteral transmission of bovine spongiform encephalopathy to the pig. *Vet Rec* **127**:338.

DEARMOND SJ, MCKINLEY MP, BARRY RA, BRAUNFELD MB, MCCOLLOCH JR, & PRUSINER SB (1985). Identification of prion amyloid filaments in scrapie-infected brain. *Cell* **41**:221-235.

DEARMOND SJ, SANCHEZ H, YEHIELY F, QIU Y, NINCHAK-CASEY A, DAGGETT V, CAMERINO AP, CAYETANO J, ROGERS M, GROTH D, TORCHIA M, TREMBLAY P, SCOTT MR, COHEN FE & PRUSINER SB (1997). Selective neuronal targeting in prion disease. *Neuron* **19**:1337-1348.

DE GIOIA L, SELVAGGINI C, GHIBAUDI E, DIOMEDE L, BUGIANI O, FORLONI G, TAGLIAVINI F & SALMONA M (1994). Conformational polymorphism of the amyloidogenic and neurotoxic peptide homologous to residues 106-126 of the prion protein. *J Biol Chem* **269**:7859-7862.

DICKINSON AG (1976). Scrapie in sheep and goats. *Front Biol* **44**:209-241.

EDENHOFER F, RIEGER R, FAMULOK M, WENDLER W, WEISS S & WINNACKER EL (1996). Prion protein PrP^c interacts with molecular chaperones of the Hsp60 family. *J Virol* **70**:4724-4728.

ERTEL SI, ERTEL EA & CLOZEL JP (1997). T-type Ca²⁺ channels and pharmacological blockade: potential pathophysiological relevance. *Cardiovasc Drugs Ther* **11**:723-739.

FISCHER M, RÜLICHE T, RAEBER A, SAILER A, MOSER M, OESCH B, BRANDNER S, AGUZZI A & WEISSMANN C (1996). Prion protein with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J* **15**:1255-1264.

FLECHSIG E, SHMERLING D, HEGYI I, RAEBER AJ, FISCHER M, COZZIO A, VON MERING 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.

FLORIO T, GRIMALDI M, SCORZIELLO A, SALMONA M, BUGIANI O, TAGLIAVINI F, FORLONI G & SCHETTINI G (1996). Intracellular calcium rise through L-type calcium channels, as molecular mechanism for prion protein fragment 106-126-induced astroglial proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* **228**:397-405.

FLORIO T, THELLUNG S, AMICO C, ROBELLO M, SALMONA M, BUGIANI O, TAGLIAVINI F, FORLONI G & SCHETTINI G (1998). Prion protein fragment 106-126 induces apoptotic cell death and impairment of L-type voltage-sensitive calcium channel activity in the GH3 cell line. *J Neurosci Res* **54**:341-352.

FORLONI G, ANGERETTI N, CHIESA R, MONZANI E, SALMONA M, BUGIANI O & TAGLIAVINI F (1993). Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* **362**:543-546.

FORLONI G, DEL BO R, ANGERETTI N, CHIESA R, SMIROLODO S, DONI R, GHIBAUDI E, SALMONA M, PORRO M, VERGA L, GIACCONE G, BUGIANI O & TAGLIAVINI F (1994). A neurotoxic prion protein fragment induces rat astroglial proliferation and hypertrophy. *Eur J Neurosci* **6**:1415-1422.

FOSTER JD, HOPE J, MCCONNELL I, BRUCE M & FRASER H (1994). Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep, goats, and mice. *Ann N Y Acad Sci* **724**:300-303.

FOURNIER JG, ESCAIG-HAYE F, BILLETTE DE VILLEMEUR T & ROBAIN O (1995). Ultrastructural localization of cellular prion protein (PrP_c) in synaptic boutons of normal hamster hippocampus. *C R Acad Sci III* **318**:339-344.

GABRIEL JM, OESCH B, KRETZSCHMAR H, SCOTT M & PRUSINER SB (1992). Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**:9097-9101.

GAJDUSEK DC, GIBBS CJ & ALPERS M (1966). Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* **209**:794-796.

GALLI C, MEUCCI O, SCORZIELLO A, WERGE TM, CALISSANO P & SCHETTINI G (1995). Apoptosis in cerebellar granule cells is blocked by high KCl, forskolin, and IGF-1 through distinct mechanisms of action: the involvement of intracellular calcium and RNA synthesis. *J Neurosci* **15**:1172-1179.

GAJDUSSEK DC & ZIGAS V (1959). Kuru. Clinical, pathologic and epidemiologic study of an acute progressive degenerative disease of the central nervous system among natives of the eastern highlands of New Guinea. *Am J Med* **26**:442-469.

GAJDUSSEK DC, GIBBS CJ & ALPERS M (1966). Experimental transmission of kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* **209**:794-796.

GALLO V, KINGSBURY A, BALAZS R & JORGENSEN OS (1987). The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J Neurosci* **7**:2203-2213.

GEPPERT M, BOLSHAKOV VY, SIEGELBAUM SA, TAKEI K, DE CAMILLI P, HAMMER RE & SUDHOF TC (1994). The role of Rab3A in neurotransmitter release. *Nature* **369**:493-497.

GERSTMANN J, STRÄUSSLER E & SCHEINKER I (1936). Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns. *Z Neurol* **154**:736-762.

GHUYSEN-ITARD AF, ROBERT L & JACOB MP (1992). Effect of elastin peptides on cell proliferation. *C R ACAD SCI III* **315**:473-478.

GIBBS CJ Jr, GAJDUSEK DC, ASHER DM, ALPERS MP, BECK E, DANIEL PM & MATTHEWS WB (1968). Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science* **161**:388-389.

GIBBS CJ Jr & GAJDUSEK DC (1973). Experimental subacute spongiform virus encephalopathies in primates and other laboratory animals. *Science*. **182**:67-68.

GIBBS CJ Jr, AMYX HL, BACOTE A, MASTERS CL & GAJDUSEK DC (1980). Oral transmission of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and scrapie to nonhuman primates. *J Infect Dis* **142**(2):205-208.

- GORDON WS (1946). Advances in veterinary research. Looping-ill, tick-borne fever and scrapie. *Vet Res* **58**:516-525.
- GRANT SGN, O'DELL TJ, KARL KA, STEIN PL, SORIANO P & KANDEL ER (1992). Impaired long-term potentiation, spatial learning and hippocampal development in fyn mutant mice. *Science* **258**:1903-1910.
- GRIFFITH JS (1967). Self-replication and scrapie. *Nature*, **215**:1043-1044.
- GROSCUP MH, HARMEYER S & PFAFF E (1997). Antigenic features of prion proteins of sheep and of other mammalian species. *J Immunol Methods* **207**:89-101.
- GUERRA L, CERBAI E, GESSI S, BOREA PA & MUGELLI A (1996). The effect of oxygen free radicals on calcium current and dihydropyridine binding sites in guinea-pig ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* **118**:1278-1284.
- HAGIWARA N, IRISAWA H & KAMEYAMA M (1988). Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol* **395**:233-253.
- HARRIS DA, GORODINSKY A, LEHMANN S, MOULDER K & SHYNG SL (1996). Cell biology of the prion protein. *Curr Top Microbiol Immunol* **207**:77-93.
- HARTSOUGH GR & BURGER D et al (1965). Encephalopathy of mink – I. Epizootiologic and clinical observations. *J Infect Dis* **115**:387-392.
- HARTTER DE & BARNEA A (1988). Evidence for release of copper in the brain: depolarization-induced release of newly taken-up ⁶⁷copper. *Synapse* **2**:412-415.
- HERMS J, TINGS T, GALL S, MADLUNG A, GIESE A, SIEBERT H, SCHURMANN P, WINDL O, BROSE N & KRETZSCHMAR H (1999). Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J Neurosci* **19**:8866-8875.
- HERMS JW, KORTE S, GALL S, SCHNEIDER I, DUNKER S & KRETZSCHMAR HA (2000). Altered intracellular calcium homeostasis in cerebellar granule cells of prion protein-deficient mice. *J Neurochem* **75**:1487-1492.

HERMS JW, KRETZCHMAR HA, TITZ S & KELLER BU (1995). Patch-clamp analysis of synaptic transmission to cerebellar purkinje cells of prion protein knockout mice. *Eur J Neurosci* **7**:2508-2512.

HERMS JW, MADLUNG A, BROWN DR & KRETZSCHMAR HA (1997). Increase of intracellular free Ca^{2+} in microglia activated by prion protein fragment. *Glia* **21**:253-257.

HERMS JW, TINGS T, DUNKER S & KRETZSCHMAR HA (2001). Prion protein affects Ca^{2+} -activated K^{+} currents in cerebellar purkinje cells. *Neurobiol Dis* **8**:324-330.

HORIUCHI M, YAMAZAKI N, IKEDA T, ISHIGURO N & SHINAGAWA M (1995). A cellular form of prion protein (PrPC) exists in many non-neuronal tissues of sheep. *J Gen Virol* **76**:2583-2587.

HORNSHAW MP, MCDERMOTT JR & CANDY JM (1995a). Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* **207**:621-629.

HORNSHAW MP, MCDERMOTT JR, CANDY JM & LAKEY JH (1995b). Copper binding to the N-terminal tandem repeat region of mammalian and avian prion protein: structural studies using synthetic peptides. *Biochem Biophys Res Commun* **214**:993-999.

ILANO I, MARTY A, ARMSTRONG CM & KONNERTH A (1991). Synaptic- and agonist-induced excitatory currents of Purkinje cells in rat cerebellar slices. *J Physiol* **434**:183-213.

IMREDY JP & YUE DT (1994). Mechanism of Ca^{2+} -sensitive inactivation of L-type Ca^{2+} channels. *Neuron* **12**:1301-1318.

ITO M (1984). The cerebellum and neuronal control. *New York, Raven Press*.

JACKSON GS, MURRAY I, HOSSZU LL, GIBBS N, WALTHO JP, CLARKE AR & COLLINGE J (2001). Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:8531-8535.

- JAKOB A (1921). Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen Befunde (spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Z Gesamte Neurol Psychiatr* **64**:147-228
- JAYARAMAN T, ONDRIAS K, ONDRIASOVA E & MARKS AR (1996). Regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by tyrosine phosphorylation. *Science* **272**:1492-1494.
- JEFFERYS JG, EMPSON RM, WHITTINGTON MA & PRUSINER SB (1994). Scrapie infection of transgenic mice leads to network and intrinsic dysfunction of cortical and hippocampal neurones. *Neurobiol Dis* **1**:25-30.
- JIN T, GU Y, ZANUSSO G, SY M, KUMAR A, COHEN M, GAMBETTI P & SINGH N (2000). The chaperone protein BiP binds to a mutant prion protein and mediates its degradation by the proteasome. *J Biol Chem* **275**:38699-38704.
- JOHNSTON A, BLACK C, FRASER J., MANSON J, HOPE J, CLARKE A & MACLEOD N (1996). Membrane properties and synaptic plasticity in mouse CA1 hippocampal neurones infected with ME7 scrapie or lacking the prion protein, studied *in vitro*. *J Physiol* **495P**, P15-P15.
- JOHNSTON AR, BLACK C, FRASER J & MACLEOD N (1997). Scrapie infection alters the membrane and synaptic properties of mouse hippocampal CA1 pyramidal neurones. *J Physiol* **1**:1-15.
- JOHNSTON AR, FRASER JR, JEFFREY M & MACLEOD N (1998a). Synaptic plasticity in the CA1 area of the hippocampus of scrapie-infected mice. *Neurobiol Dis* **5**:188-195.
- JOHNSTON AR, FRASER JR, JEFFREY M & MACLEOD N (1998b). Alterations in potassium currents may trigger neurodegeneration in murine scrapie. *Exp Neurol* **151**:326-333.
- JONES SW (1998). Overview of voltage-dependent calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* **30**:299-312.

- KALMAN D, O'LAGUE PH, ERXLEBEN C & ARMSTRONG DL (1988). Calcium-dependent inactivation of the dihydropyridine-sensitive calcium channels in GH3 cells. *J Gen Physiol* **92**:531-548.
- KANDEL ER, SCHWARTZ JH & JESSELL TM (1995). Essentials of neural science and behavior. *Appleton & Lange, Oxford*.
- KARDOS J, KOVACS I, HAJOS F, KALMAN M & SIMONYI M (1989). Nerve endings from rat brain tissue release copper upon depolarization. A possible role in regulating neuronal excitability. *Neurosci Lett* **103**:139-144.
- KATZ B & MILEDI R (1968). The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J Physiol* **195**:481-492.
- KONNERTH A, LLANO I & ARMSTRONG CM (1990). Synaptic currents in cerebellar Purkinje cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:2662-2665.
- KOSTYUK PG (1989). Diversity of calcium ion channels in cellular membranes. *Neuroscience* **28**:253-261.
- KRAMER ML, KRATZIN HD, SCHMIDT B, ROMER A, WINDL O, LIEMANN S, HORNEMANN S & KRETZSCHMAR H (2001). Prion protein binds copper within the physiological concentration range. *J Biol Chem* **276**:16711-16719.
- KRETZSCHMAR HA (1993). Human prion diseases (spongiform encephalopathies). *Arch Virol Suppl* **7**:261-293.
- KRETZSCHMAR HA, IRONSIDE JW, DEARMOND SJ & TATEISHI J (1996). Diagnostic criteria for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol* **53**:913-920.
- KRETZSCHMAR HA, PRUSINER SB, STOWRING LE & DEARMOND SJ (1986a). Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am J Pathol* **122**:1-5.
- KRETZSCHMAR HA, STOWRING LE, WESTAWAY D, STUBBLEBINE WH, PRUSINER SB & DEARMOND SJ (1986b). Molecular cloning of a human prion protein cDNA. *DNA* **5**:315-324.

KRETZSCHMAR HA, TINGS T, MADLUNG A, GIESE A & HERMS J (2000). Function of PrP^C as a copper-binding protein at the synapse. *Arch Virol* [Suppl] **16**:239-249.

KURSCHNER C, MORGAN JI (1995). The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system. *Brain Res Mol Brain Res* **30**:165-168.

KURSCHNER C, MORGAN JI (1996). Analysis of interaction sites in homo- and heteromeric complexes containing Bcl-2 family members and the cellular prion protein. *Brain Res Mol Brain Res* **37**:249-258.

LAINE J, MARC ME, SY MS & AXELRAD H (2001). Cellular and subcellular morphological localization of normal prion protein in rodent cerebellum. *Eur J Neurosci* **14**:47-56.

LEVITAN IB (1999). It is calmodulin after all! Mediator of the calcium modulation of multiple ion channels. *Neuron* **22**:645-648.

LIESI P, SEPPALA I & TRENKNER E (1992). Neuronal migration in cerebellar microcultures is inhibited by antibodies against a neurite outgrowth domain of laminin. *J Neurosci Res* **33**:170-176.

LLEDO PM, TREMBLAY P, DEARMOND SJ, PRUSINER SB & NICOLL RA (1996). Mice deficient for prion protein exhibit normal neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:2403-2407.

LLINÀS RR (1981). Electrophysiology of the cerebellar networks. In V.B. Brooks (Hrsg.) *Handbook of physiology, Section I: The nervous system, Vol. II: Motor Control, Part 2. Bethesda, Md.: American Physiological Society.* 831-876.

MACDONALD JF & WOJTOWICZ JM (1980). Two conductance mechanisms activated by applications of L-glutamic, L-aspartic, DL-homocysteic, N-methyl-D-aspartic, and DL-kainic acids to cultured mammalian central neurones. *Can J Physiol Pharmacol* **58**:1393-1397.

MAGLEBY KL (1987). Short term changes in synaptic efficiency. *New York : Wiley.*

MALLART A & MARTIN AR (1968). The relation between quantum content and facilitation at the neuromuscular junction of the frog. *J Physiol* **196**:593-604.

MALLUCCI GR, RATTE S, ASANTE EA, LINEHAN J, GOWLAND I, JEFFERYS JG & COLLINGE J (2002). Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *EMBO J* **21**:202-210.

MANETTO V, MEDORI R., CORTELLI P, MONTAGNA P, TINUPER P, BARUZZI A, RANCUREL G, HAUW JJ, VADERHAEGHEN JJ, MAILLEUX P, BUGIANI O, TAGLIAVINI F, BOURAS C, RIZZUTO N, LUGARESI E & GAMBETTI P (1992). Fatal familial insomnia: clinical and pathologic study of five new cases. *Neurology* **42**: 312-319.

MANSON JC, CLARKE AR, HOOPER ML, AITCHISON L, MCCONNELL I, & HOPE J (1994). 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol* **8**:121-127.

MANSON JC, HOPE J, CLARKE AR, JOHNSTON A, BLACK C & MACLEOD N (1995). PrP gene dosage and long term potentiation. *Neurodegeneration*. **4**:113-114.

MANSON J, WEST JD, THOMSON V, MCBRIDE P, KAUFMAN MH & HOPE J (1992). The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development*. **115**:117-122.

MARSH RF, BESSEN RA, LEHMANN S & HARTSOUGH GR (1991). Epidemiological and experimental studies on a new incident of transmissible mink encephalopathy. *J Gen Virol* **72**:589-594.

MARTINS VR, GRANER E, GARCIA-ABREU J, DE SOUZA SJ, MERCADANTE AF, VEIGA SS, ZANATA SM, NETO VM & BRENTANI RR (1997). Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor. *Nat Med* **3**:1376-1382.

MATTSON MP & KATER SB (1987). Calcium regulation of neurite elongation and growth cone motility. *J Neurosci* **7**:4034-4043.

- MCGOWAN JP (1922). Scrapie in sheep. *Scottish J Agric* **5**:365-375.
- MCKENZIE D, BARTZ J, MIRWALD J, OLANDER D, MARSH R & AIKEN J (1998). Reversibility of Scrapie inactivation is enhanced by copper. *J Biol Chem* **273**:25545-25547.
- MEDORI R, TRITSCHLER HJ, LEBLANC A, VILLARE F, MANETTO V, CHEN HY, XUE R, LEAL S, MONTAGNA P, CORTELLI P, TINUPER P, AVONI P, MOGHI M, BARRUZI A, HAUW JJ, OTT J, LUGARESI E, AUTILIO GL & GAMBETTI P (1992). Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene. *N Engl J Med* **326**:444-449.
- MINTZ IM, ADAMS ME & BEAN BP (1992). P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons. *Neuron* **9**:85-95.
- MIURA T, HORI-I A & TAKEUCHI H (1996). Metal-dependent alpha-helix formation promoted by the glycine-rich octapeptide region of prion protein. *FEBS Lett* **396**:248-252.
- MOORE RC, LEE IY, SILVERMAN GL, HARRISON PM, STROME R, HEINRICH C, KARUNARATNE A, PASTERNAK SH, CHISHTI MA, LIANG Y, MASTRANGELO P, WANG K, SMIT AF, KATAMINE S, CARLSON GA, COHEN FE, PRUSINER SB, MELTON DW, TREMBLAY P, HOOD LE & 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.
- MORI Y, MIKALA G, VARADI G, KOBAYASHI T, KOCH S, WAKAMORI M & SCHWARTZ A (1996). Molecular pharmacology of voltage-dependent calcium channels. *Jpn J Pharmacol* **72**: 83-109.
- MOUILLET-RICHARD S, ERMONVAL M, CHEBASSIER C, LAPLANCHE JL, LEHMANN S, LAUNAY JM & KELLERMANN O (2000). Signal transduction through prion protein. *Science* **289**:1925-1928.
- MULLIS KB & FALOONA FA (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* - a polymerase chain reaction. *Meth Enzymol* **155**: 335-350.

NAM SC & HOCKBERGER PE (1992). Divalent ions released from stainless steel hypodermic needles reduce neuronal calcium currents. *Pflügers Arch* **420**:106-108.

NEHER E & SAKMANN B (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260**:799-802.

NEWCOMB R, SZOKE B, PALMA A, WANG G, CHEN XH, HOPKINS W, CONG R, MILLER J, URGE L, TARCZY-HORNOCH K, LOO JA, DOOLEY DJ, NADASDI L, TSIEN RW, LEMOS J & MILJANICH G (1998). Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the *tarantula* *Hysterocrates gigas*. *Biochemistry* **37**:15353-15362.

NICOLL RA, MALENKA RC & KAUER JA (1990). Functional comparison of neurotransmitter receptor subtypes in mammalian central nervous system. *Physiol Rev* **70**:513-565.

NISHIDA N, TREMBLAY P, SUGIMOTO T, SHIGEMATSU K, SHIRABE S, PETROMILLI C, ERPEL SP, NAKAOKE R, ATARASHI R, HOUTANI T, TORCHIA M, SAKAGUCHI S, DEARMOND SJ, PRUSINER SB & KATAMINE S (1999). A mouse prion protein transgene rescues mice deficient for the prion protein gene from purkinje cell degeneration and demyelination. *Lab Invest* **79**:689-697.

NOWAK L, BREGESTOVSKI P, ASCHER P, HERBET A & PROCHIANTZ A (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* **307**:462-465.

NUMBERGER M & DRAGUHN A (1996). Patch-Clamp-Technik *Spectrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg*.

OESCH B, TELOW TB, STAHL N, SERBAN D, HOOD LE & PRUSINER SB (1990). Identification of cellular prion proteins binding to the scrapie prion protein. *Biochemistry* **29**:5848-5855.

OESCH B, WESTAWAY D, WALCHLI M, MCKINLEY MP, KENT SB, AEBERSOLD R, BARRY RA, TEMPST P, TEPLow DB, HOOD LE, PRUSINER SB & WEISSMANN C (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* **40**:735-746.

PAN KM, STAHL N & PRUSINER SB (1992). Purification and properties of the cellular prion protein from Syrian hamster brain. *Protein Sci* **1**:1343-1352.

PAULY PC & HARRIS DA (1998). Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J Biol Chem* **273**:33107-33110.

PLUMMER MR, LOGOTHETIS DE & HESS P (1989). Elementary properties and pharmacological sensitivities of calcium channels in mammalian peripheral neurons. *Neuron* **2**:1453-1463.

PRUSINER SB (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**:136-144.

PRUSINER SB (1991). Molecular biology of prion diseases. *Science* **252**:1515-1522.

PRUSINER SB (1993). Prion encephalopathies of animals and humans. *Dev Biol Stand* **80**:31-44.

PRUSINER SB (1996). Molecular biology and pathogenesis of prion diseases. *Trends Biochem Sci* **21**:482-487.

QUAGLIO E, CHIESA R & HARRIS DA (2001). Copper converts the cellular prion protein into a protease-resistant species that is distinct from the scrapie isoform. *J Biol Chem* **276**:11432-11438.

RASCH G & DIRINGER H (1993). Creutzfeldt-Jakob-Krankheit. *Dtsch Arztebl* **90**: 2228-2230.

RIEGER R, EDENHOFER F, LASMEZAS CI & WEISS S (1997). The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *Nat Med* **3**:1383-1388.

RIVAS RJ & HATTEN ME (1995). Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons. *J Neurosci* **15**:981-989.

ROESLER R, WALZ R, QUEVEDO J, DE-PARIS F, ZANATA SM, GRANER E, IZQUIERDO I, MARTINS VR & BRENTANI RR (1999). Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrP(C). *Brain Res Mol Brain Res* **71**:349-353.

ROSAHL TW, GEPPERT M, SPILLANE D, HERZ J, HAMMER RE, MALENKA RC & SUDHOF TC (1993). Short-term synaptic plasticity is altered in mice lacking synapsin I. *Cell* **75**:661-670.

RUSANESCU G, QI H, THOMAS SM, BRUGGE JS & HALEGOUA S (1995). Calcium influx induces neurite growth through a Src-Ras signaling cassette. *Neuron* **15**:1415-1425.

SACHS L (1997). *Angewandte Statistik. Anwendung statistischer Methoden.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. 351-360.

SAIKI RK, GELFLAND DH, STOFFEL S, SCHARF SJ, HIGUCHI R, HORN GT, MULLIS KB & ERLICH HA (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-491.

SALONEN V, PELTONEN J, ROYTTA M & VIRTANEN I (1997). Laminin in traumatized peripheral nerve: basement membrane changes during degeneration and regeneration. *J Neurocytol.* **16**:713-720.

SAYRE LM, PERRY G, ATWOOD CS & SMITH MA (2000). The role of metals in neurodegenerative diseases. *Cell Mol Biol* **46**:731-741.

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.

SCHETTINI G (2000). Apoptotic cell death and impairment of L-type voltage-sensitive calcium channel activity in rat cerebellar granule cells treated with the prion protein fragment 106-126. *Neurobiol Dis* **7**:299-309.

SELVAGGINI C, DE GIOIA L, CANTU L, GHIBAUDI E, DIOMEDE L, PASSERINI F, FORLONI G, BUGIANI O, TAGLIAVINI F & SALMONA M (1993). Molecular characteristics of a protease-resistant, amyloidogenic and neurotoxic peptide homologous to residues 106-126 of the prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* **194**:1380-1386.

SHMERLING D, HEGYI I, FISCHER M, BLATTLER T, BRANDNER S, GOTZ J, RULICKE T, FLECHSIG E, COZZIO A, VON MERING C, HANGARTNER C, AGUZZI A & WEISSMANN C (1998). Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell* **93**:203-214.

SHYNG SL, HEUSER JE & HARRIS DA (1994). A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. *J Cell Biol* **125**:1239-1250.

SHYNG SL, MOULDER KL, LESKO A & HARRIS DA (1995). The N-terminal domain of a glycolipid-anchored prion protein is essential for its endocytosis via clathrin-coated pits. *J Biol Chem* **270**:14793-14800.

SILEI V, FABRIZI C, VENTURINI G, SALMONA M, BUGIANI O, TAGLIAVINI F & LAURO GM (1999). Activation of microglial cells by PrP and beta-amyloid fragments raises intracellular calcium through L-type voltage sensitive calcium channels. *Brain Res* **818**:168-170.

SILVA AJ, ROSAHL TW, CHAPMAN PF, MAROWITZ Z, FRIEDMAN E, FRANKLAND PW, CESTARI V, CIOFFI D, SUDHOF TC & BOURTCHULADZE R (1996). Impaired learning in mice with abnormal short-lived plasticity. *Curr Biol* **6**:1509-1518.

SLESINGER PA & LANSMAN JB (1991). Inactivation of calcium currents in granule cells cultured from mouse cerebellum. *J Physiol* **435**:101-121.

SPITZER NC, GU X & OLSON E (1994). Action potentials, calcium transients and the control of differentiation of excitable cells. *Curr Opin Neurobiol* **4**:70-77.

STAHL N, BALDWIN MA, TELOW DB, HOOD L, GIBSON BW, BURLINGAME AL & PRUSINER SB (1993). Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry* **32**:1991-2002.

STAHL N, BORCHELT DR, HSIAO K & PRUSINER SB (1987). Scrapie prion proteins contain a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* **51**:229-240.

STEIN PL, LEE HM, RICH S & SORIANO P (1992). pp59^{lyn} mutant mice display different signaling in thymocytes and peripheral T cells. *Cell* **70**:741-750.

STRAUSAK D, MERCER JF, DIETER HH, STREMMEL W & MULTHAUP G (2001). Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases. *Brain Res Bull* **55**:175-185.

TAGLIAVINI F, PRELLI F, VERGA L, GIACCONE G, SARMA R, GOREVIC P, GHETTI B, PASSERINI F, GHIBAUDI E, FORLONI G, SALMONA M, BUGIANI O & FRANGIONE B (1993). Synthetic peptides homologous to prion protein residues 106-147 form amyloid-like fibrils in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:9678-9682.

TARABOULOS A, RAEBER AJ, BORCHELT DR, SERBAN D & PRUSINER SB (1992). Synthesis and trafficking of prion proteins in cultured cells. *Mol Biol Cell* **3**:851-63.

TERAMOTO T, KUWADA M, NIIDOME T, SAWADA K, NISHIZAWA Y & KATAYAMA K (1993). A novel peptide from funnel web spider venom, omega-Aga-TK, selectively blocks P-type calcium channels. *Biochem Biophys Res Commun* **196**:134-140.

TELLING GC, SCOTT M, MASTRIANNI J, GABIZON R, TORCHIA M, COHEN FE, DEARMOND SJ & PRUSINER SB (1995). Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* **83**:79-90.

THELLUNG S, FLORIO T, CORSARO A, ARENA S, MERLINO M, SALMONA M, TAGLIAVINI F, BUGIANI O, FORLONI G & SCHETTINI G (2000a). Intracellular mechanisms mediating the neuronal death and astrogliosis induced by the prion protein fragment 106-126. *Int J Dev Neurosci* **18**:481-492.

THELLUNG S, FLORIO T, VILLA V, CORSARO A, ARENA S, AMICO C, ROBELLO M, SALMONA M, FORLONI G, BUGIANI O, TAGLIAVINI F, TOMASELLI KJ & REICHARDT LF (1988). Peripheral motoneuron interactions with laminin and Schwann cell-derived neurite-promoting molecules: developmental regulation of laminin receptor function. *J Neurosci Res* **21**:275-285.

THELLUNG S, FLORIO T, VILLA V, CORSARO A, ARENA S, AMICO C, ROBELLO M, SALMONA M, FORLONI G, BUGIANI O, TAGLIAVINI F & SCHETTINI G (2000b). Apoptotic cell death and impairment of L-type voltage-sensitive calcium channel activity in rat cerebellar granule cells treated with the prion protein fragment 106-126. *Neurobiol Dis* **7**:299-309.

THOMPSON RF (1985). The brain. *W.H.Freemann &Company, New York und Oxford*.

TOBLER I, GAUS SE, DEBOER T, ACHERMANN P, FISCHER M, RULICKE T, MOSER M, OESCH B, MCBRIDE PA & MANSON JC (1996). Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* **380**:639-642.

VILES JH, COHEN FE, PRUSINER SB, GOODIN DB, WRIGHT PE & DYSON HJ (1999). Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:2042-2047.

VINCENT P, ARMSTRONG CM & MARTY A (1992). Inhibitory synaptic currents in rat cerebellar Purkinje cells: modulation by postsynaptic depolarization. *J Physiol.* **456**:453-471.

WAGGONER DJ, BARTNIKAS TB & GITLIN JD (1999). The role of copper in neurodegenerative disease. *Neurobiol Dis* **6**:221-230.

WAGGONER DJ, DRISALDI B, BARTNIKAS TB, CASARENO RL, PROHASKA JR, GITLIN JD & HARRIS DA (2000). Brain copper content and cuproenzyme activity do not vary with prion protein expression level. *J Biol Chem* **275**:7455-7458.

WALZ R, AMARAL OB, ROCKENBACH IC, ROESLER R, IZQUIERDO I, CAVALHEIRO EA, MARTINS VR & BRENTANI RR (1999). Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. *Epilepsia* **40**:1679-1682.

WANG JH & KELLY PT (1996). Regulation of synaptic facilitation by postsynaptic Ca²⁺/CaM pathways in hippocampal CA1 neurons. *J Neurophysiol* **76**:276-286.

WANG JH & KELLY PT (1997a). Postsynaptic calcineurin activity downregulates synaptic transmission by weakening intracellular Ca²⁺ signaling mechanisms in hippocampal CA1 neurons. *J Neurosci* **17**:4600-4611.

WANG JH & KELLY PT (1997b). Attenuation of paired-pulse facilitation associated with synaptic potentiation mediated by postsynaptic mechanisms. *J Neurophysiol* **78**:2707-2716.

WEISSMANN C (1996). PrP effects clarified. *Curr Biol* **6**:1359.

WHATLEY SA, POWELL JF, POLITOPOULOU G, CAMPBELL IC, BRAMMER MJ & PERCY NS (1995). Regulation of intracellular free calcium levels by the cellular prion protein. *Neuroreport* **6**:2333-2337.

WHITTINGTON MA, SIDLE KC, GOWLAND I, MEADS J, HILL AF, PALMER MS, JEFFERYS JG & COLLINGE J (1995). Rescue of neurophysiological phenotype seen in PrP null mice by transgene encoding human prion protein. *Nat Genet* **9**:197-201.

WILLIAMS ES & YOUNG S (1980). Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J Wildl Dis* **16**:89-98.

WINSLOW JL, DUFFY SN & CHARLTON MP (1994). Homosynaptic facilitation of transmitter release in crayfish is not affected by mobile calcium chelators: implications for the residual ionised calcium hypothesis from electrophysiological and computational analyses. *J Neurophysiol* **72**:1769-1793.

YEHIELY F, BAMBOROUGH P, DA COSTA M, PERRY BJ, THINAKARAN G, COHEN FE, CARLSON GA & PRUSINER SB (1997). Identification of candidate proteins binding to prion protein. *Neurobiol Dis* **3**:339-355.

ZHANG JF, RANDALL AD, ELLINOR PT, HORNE WA, SATHER WA, TANABE T, SCHWARZ TL & TSIEN RW (1993). Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca²⁺ channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology* **32**:1075-1088.

ZUCKER RS (1989). Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* **12**:13-31.

ZUHLKE RD & REUTER H (1998). Ca²⁺-sensitive inactivation of L-type Ca²⁺ channels depends on multiple cytoplasmic amino acid sequences of the alpha1C subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:3287-3294.

7 Publikationen

AUGUSTIN I, KORTE S, RICKMANN M, KRETZSCHMAR HA, SÜDHOF TC, HERMS JW & BROSE N (2001). The cerebellum-specific munc13-3 regulates cerebellar synaptic transmission and motor learning in mice. *J Neurosci* **21**:10-17.

HERMS JW, KORTE S, GALL S, SCHNEIDER I, DUNKER S & KRETZSCHMAR HA (2000). Altered intracellular calcium homeostasis in cerebellar granule cells of prion protein-deficient mice. *J Neurochem* **75**:1487-1492.

KORTE S, HERMS JW & KRETZSCHMAR HA (2000). Short term synaptic plasticity in prion protein-transgenic mice. *Eur J Neurosci* **12** Supp 11:8.06.

Danksagung

Als Erstes möchte ich Herrn Professor Dr. Jochen W. Herms danken, der diese Arbeit betreut hat, für dessen Unterstützung und ständige Diskussionsbereitschaft.

Ich danke Herrn Professor Dr. Hans A. Kretschmar für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, diese Arbeit unter den hervorragenden Bedingungen am Institut für Neuropathologie in Göttingen und München durchführen zu können.

Herrn Professor Dr. Hans-Joachim Bischof danke ich ausdrücklich für die Bereitschaft, diese Promotion extern zu betreuen.

Danken möchte ich auch meinen Kollegen für die angenehme Arbeitsatmosphäre, wobei ich besonders Ilka Schneider und Stephanie Dunker großen Dank für die fruchtbaren Diskussionen und die ausgesprochen gute und kollegiale Stimmung im Elektrophysiologielabor schulde.

Ein Dankeschön auch an Angie Beutner fürs Korrekturlesen.

Nicht zuletzt schulde ich meiner Frau Beate und meiner Tochter Nella unendlichen Dank für ihre Geduld, ihr Verständnis und ihre Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Verfahren, Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

München, 26.04.2002

Stefan Korte