

Ein fehlgefaltetes Protein scheint das verursachende Agens einer Reihe seltener, degenerativer Erkrankungen des Gehirns bei Säugetieren zu sein. Am bekanntesten ist wahrscheinlich der Rinderwahnsinn (BSE, von *bovine spongiform encephalopathy*). 1985 trat die Krankheit zum ersten Mal bei einem Rind in England auf. Verwandte Erkrankungen sind Kuru, die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit beim Menschen sowie Scrapie (Traberkrankheit) bei Schafen. Die Erkrankungen werden gelegentlich als spongiforme Enzephalopathien bezeichnet, weil das erkrankte Gehirn häufig wie mit Löchern übersät aussieht (Abb. 1). Typische Symptome sind Demenz und ein Ausfall der Koordination. Die Erkrankungen verlaufen tödlich.

In den 60er Jahren entdeckten Wissenschaftler, dass Präparationen des krankheitsauslösenden Agens offensichtlich keine Nucleinsäuren enthalten. Zu dieser Zeit schlug *Tikvah Alper* ein Protein als auslösendes Agens vor. Anfangs erschien diese Idee – die *Protein-only*-Theorie – ketzerisch: Alle bis dahin bekannten Krankheitserreger – Viren, Bakterien, Pilze usw. – enthielten Nucleinsäuren, und ihre Virulenz stand in Zusammenhang mit genetischer Fortpflanzung und Ausbreitung. Forschungen über nunmehr 3 Jahrzehnten, die v. a. von *Stanley Prusiner* vorangetrieben wurden, geben allerdings Hinweise darauf, dass die spongiformen Enzephalopathien anders sind:

Als infektiöses Agens wurde ein einzelnes Protein (M_r 28.000) aufgespürt, das *Prusiner* als Prion-Protein (PrP) bezeichnete. Das Prion-Protein ist bei allen Säugetieren ein normaler Bestandteil des Hirngewebes. Seine Funktion ist nicht bekannt. Mäusestämme, denen das PrP-Gen fehlt (und damit auch das Protein selbst), scheinen nicht unter negativen Auswirkungen zu leiden. Eine Erkrankung tritt nur dann auf, wenn das normale zelluläre PrP (PrP^{C}) seine Konformation ändert; dieses veränderte Protein wird als PrP^{Sc} bezeichnet (Sc von Scrapie). Das veränderte PrP^{Sc} induziert nun wiederum eine Konformation bei PrP^{C} und wandelt dieses in PrP^{Sc} um: So entsteht ein Dominoeffekt, indem mehr und mehr des normalen Proteins in die krankheitsauslösende Form umgewandelt wird. Der Mechanismus,

über den die Anwesenheit von PrP^{Sc} zu spongiformer Enzephalopathie führt, ist noch unbekannt.

Bei erblichen Formen von Prionenerkrankungen führt eine Mutation in dem Gen, das PrP codiert, zum Austausch einer Aminosäure, von dem man annimmt, dass er die Umwandlung von PrP^{C} in PrP^{Sc} wahrscheinlicher macht. Um Prionenerkrankungen völlig zu verstehen, müssen noch neue Informationen über den Einfluss des Prion-Proteins auf die Hirnfunktion sowie genauere strukturelle Informationen über beide Formen von PrP abgewartet werden.

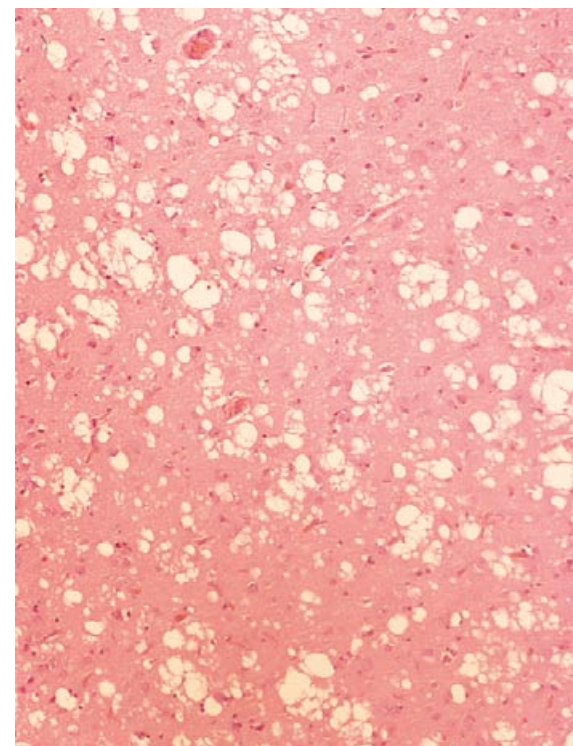


Abbildung 1

Ein gefärbter Querschnitt durch die Großhirnrinde eines Patienten mit der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit zeigt eine spongiforme (vacuoläre) Degeneration. Die Vacuolen (weiße Flecken) sind intrazellulär und treten meistens in prä- und postsynaptischen Fortsätzen von Neuronen auf. Die Vacuolen in diesem Querschnitt haben Durchmesser zwischen 20 und 100 μm

untersucht, die beide in Organismen von Bakterien bis Menschen vorkommen. Die erste Klasse – eine Proteinfamilie, die als **Hsp70** bezeichnet wird, – haben im Allgemeinen ein Molekulargewicht von ungefähr 70.000 und kommen in größerer Menge in Zellen vor, die durch hohe Temperaturen unter Stress stehen (daher *Hitzeschockproteine* mit M_r 70.000 oder kurz Hsp70). Hsp70 bindet an

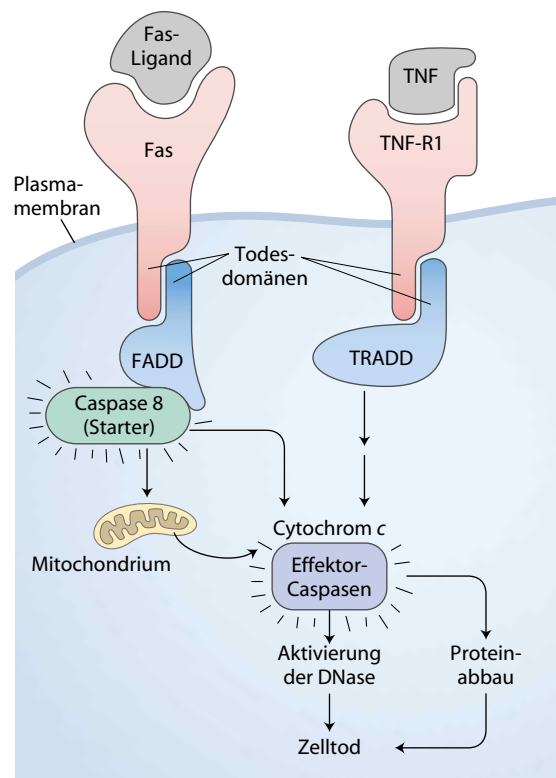


Abbildung 13-39
Ereignisse, die den programmierten Zelltod auslösen. Rezeptoren in der Plasmamembran (Fas, TNF-R1) empfangen Signale von außerhalb der Zelle (der Fas-Ligand beziehungsweise der Tumornekrosefaktor TNF). Durch die Aktivierung der Rezeptoren kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen der „Todesdomäne“ (einer Sequenz aus 80 Resten) in Fas oder TNF-R1 und einer ähnlichen Todesdomäne in den Proteinen FADD oder TRADD im Cytosol. FADD aktiviert im Cytosol eine Protease namens Caspase 8, die proteolytisch andere Zellproteasen aktiviert. TRADD aktiviert ebenfalls Proteasen. Diese Proteolyse spielt eine wesentliche Rolle beim programmierten Zelltod

Caenorhabditis elegans aus einer befruchteten Eizelle müssen genau 131 Zellen (von insgesamt 1090 somatischen Zellen des Embryos) durch programmierten Zelltod sterben, damit der ausgewachsene Tierkörper entstehen kann.

Apoptose spielt nicht nur bei der Entwicklung, sondern auch in anderen Prozessen eine Rolle: Wenn eine Antikörper produzierende Zelle Antikörper gegen ein Antigen macht, das jedoch auch normal im Körper vorhanden ist, dann stirbt diese Zelle im Thymus einen programmierten Zelltod; dies ist ein wichtiger Mechanismus, um Autoantikörper zu eliminieren. Ein weiterer Fall von Apoptose, die zu einem normalen Zelltod führt, ist das monatliche Abstoßen von Zellen der Gebärmutterwand bei der Menstruation. Manchmal ist der Selbstmord der Zelle nicht programmiert, sondern erfolgt auf biologische Umstände hin, die den übrigen Organismus bedrohen. So wird beispielsweise die Ausbreitung eines Virus auf die Nachbarzellen dadurch verhindert, dass die virusinfizierte Zelle noch vor Ablauf des Infektionszyklus ausgeschaltet wird. Starke Belastungen wie Hitze, Hyperosmolarität, UV-Licht und Gammastrahlung können ebenfalls den Zelltod auslösen; vermutlich ist es für den Organismus besser, diese Zellen gehen unter, als dass sie weiter existieren, aber nicht mehr normal funktionieren.

Die Mechanismen, die den programmierten Zelltod auslösen, nutzen z.T. die gleichen Proteine, die auch den Zellzyklus steuern. Das Signal für den Selbstmord stammt häufig von außen und wird über einen Oberflächenrezeptor vermittelt. Der **Tumornekrosefaktor (TNF)**, den die Zellen des Immunsystems bilden, tritt über spezifische TNF-Rezeptoren mit anderen Zellen in Kontakt. Diese Rezeptoren haben auf der Außenseite der Plasmamembran TNF-Bindungsstellen und eine „Todesdomäne“ von etwa 80 Aminosäure-Resten, die das Signal zur Selbstzerstörung über die Membran zu cytosolischen Proteinen wie TRADD (*TNF receptor-associated death domain*) weiterleitet (Abb. 13-39). Ein anderer Rezeptor, Fas, hat eine ähnliche Todesdomäne, die es ihm ermöglicht, mit dem cytosolischen Protein FADD (*Fas-associated death domain*) zu interagieren, das im Cytosol eine Protease namens Caspase 8 aktiviert. Dieses Enzym gehört zu einer Familie von Proteasen, die am programmierten Zelltod beteiligt sind; sie werden alle als inaktive Proenzyme synthetisiert, haben einen essentiellen Cys-Rest im aktiven Zentrum und hydrolysieren ihre Zielproteine auf der carboxy-terminalen Seite spezifischer Asp-Reste.

Wenn FADD ein Apoptose-Signal überbracht hat, das die „Start“-Caspase 8 aktiviert, so aktiviert sich diese später selber, indem sie ihre eigene Proenzymform spaltet. Ein Ziel der aktiven Caspase 8 sind unter anderem die Mitochondrien. Die Protease veranlasst, dass bestimmte Proteine freigesetzt werden, die zwischen den inneren und äußeren Mitochondrienmembranen vorkommen: Cytochrom *c* (Kap. 19) und einige „Effektor“-Caspasen. Cytochrom *c* bindet an die Proenzymform von Effektor-Caspasen und regt über Caspase 8 deren proteolytische Aktivierung an. Die aktivierten Effektor-Caspasen wiederum katalysieren einen umfassenden Abbau von Zellproteinen – die entscheidende Ursache für den programmierten Zelltod. Ein spezifisches Ziel der Caspase ist eine durch Caspase aktivierte DNase.

Die Abbauprodukte von Proteinen und DNA (Aminosäuren und Nucleotide) werden in einem regulierten Prozess freigesetzt, der es Nachbarzellen ermöglicht, sie aufzunehmen und erneut zu verwenden. Durch den programmierten Zelltod kann der Organismus somit eine Zelle zerstören, gleichzeitig aber ihre Bestandteile weiter für sich nutzen.

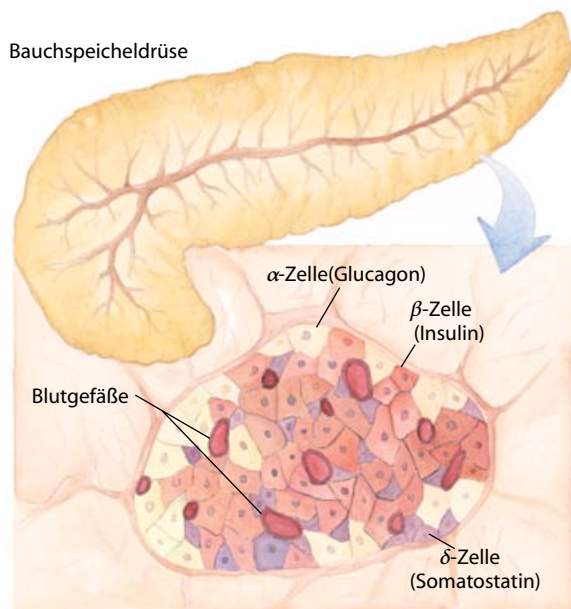


Abbildung 23-25
Das endokrine System der Bauchspeicheldrüse.
 Neben den exokrinen oder Drüsenzellen (s. Abb. 18-3b), die Verdauungsenzyme in Form von Zymogenen (Proenzymen) sezernieren, enthält die Bauchspeicheldrüse auch noch endokrines Gewebe in Form der Langerhans-Inseln. Die Inseln enthalten α -, β - und δ -Zellen (auch als A-, B- oder D-Zellen bezeichnet), die jeweils ein spezifisches Polypeptidhormon ausschütten

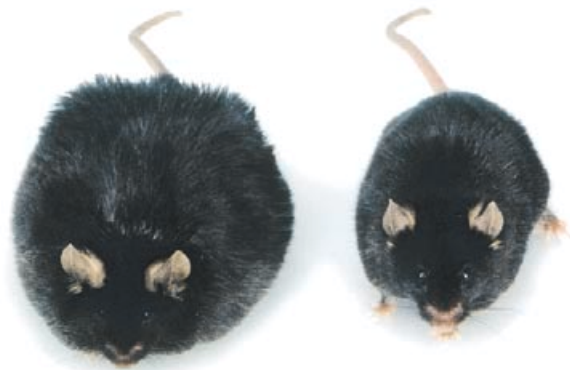


Abbildung 23-26
Ein Defekt bei der Produktion von Leptin führt zu Fettleibigkeit. Diese zwei Mäuse weisen beide Defekte des Gens für Fettleibigkeit auf und sind gleich alt. Der rechten Maus wurde täglich gereinigtes Leptin injiziert; sie wiegt 35 g. Die linke Maus erhielt kein Leptin, nahm folglich mehr Nahrung zu sich und war weniger aktiv; sie wiegt 67 g

in einem Zustand der Homöostase bleibt. Im Alter von 25–55 Jahren nimmt ein durchschnittlicher männlicher Amerikaner um etwa 9 kg zu; das entspricht der Aufnahme von einigen Zehntel Prozent überschüssiger Kalorien pro Tag in dieser Periode von 30 Jahren. Das ist eine bemerkenswert genaue Regulation! Dennoch kann das leichte Ungleichgewicht zu Gunsten der Gewichtszunahme gesundheitsschädlich sein. Wenn das Fettgewebe einen zu großen Anteil der gesamten Körpermasse ausmacht, sinkt die Lebenserwartung. Folglich besteht ein großes Interesse daran zu verstehen, wie die Körpermasse und die Speicherung von Fetten im Fettgewebe reguliert werden.

23.4.1 Die Existenz von Leptin wurde in der lipostatischen Hypothese vorhergesagt

Nach der lipostatischen Hypothese – mit der man die relative Konstanz des Körpergewichts erklären wollte – hemmt ein Feedback-Mechanismus das Essverhalten und erhöht den Energieverbrauch, wann immer das Körpergewicht einen bestimmten Wert (den Sollwert) überschreitet; die Hemmung wird wieder aufgehoben, wenn das Körpergewicht unter den Sollwert fällt. Dieser Hypothese zufolge sollte ein Feedback-Signal aus dem Fettgewebe jene Gehirnzentren beeinflussen, die das Essverhalten und die Aktivität steuern (das Stoffwechselzentrum und das motorische Zentrum). Ein solcher Faktor wurde 1994 entdeckt. **Leptin** (gr. *leptos* = „dünn“) wird in den Adipocytin (Fettzellen) produziert und ist ein kleines Protein (aus 167 Aminosäureresten), das über das Blut in das Gehirn gelangt und dort auf die Rezeptoren im Hypothalamus so einwirkt, dass es den Appetit zügelt.

Man identifizierte Leptin als Produkt eines Gens, das bei Labormäusen die Bezeichnung *OB* (für *obese* = fettleibig) erhielt. Mäuse mit zwei defekten Allelen dieses Gens (Genotyp *ob/ob*; die kleinen Buchstaben stehen für eine mutante Form des Gens) zeigen das Verhalten und die Physiologie von Tieren in ständigem Hungerzustand: Ihre Corticosteron-Konzentration im Serum ist erhöht und sie können ihre Körperwärme nicht aufrechterhalten, sich nicht normal fortpflanzen, nicht normal wachsen oder ihren Appetit unterdrücken. Als Folge der letzten Eigenschaft werden sie ausgesprochen fettleibig und wiegen bis zu dreimal mehr als normale Mäuse (Abb. 23-26). Außerdem haben sie Stoffwechselstörungen, die denen von Tieren mit Diabetes sehr ähnlich sind, und sind resistent gegen Insulin. Injiziert man *ob/ob*-Mäusen Leptin, so verlieren sie an Gewicht und erhöhen ihre lokomotorische Aktivität sowie die Wärmeproduktion. Wie man feststellte, spielt ein zweites, als *DB* (für Diabetes) bezeichnetes Maus-Gen ebenfalls eine Rolle für die Regulation des Appetits. Mäuse mit zwei defekten Allelen (*db/db*) leiden unter Fettleibigkeit und Diabetes. Es ließ sich nachweisen, dass das *DB*-Gen für den **Leptinrezeptor** codiert. Ist der Leptinrezeptor defekt, geht die Signalfunktion von Leptin verloren.

Leptin wird ausschließlich in den Adipocytin sowie in weitaus geringerer Menge im Darmepithel und in der Placenta gebildet. Der Leptinrezeptor wird hauptsächlich in Regionen des Gehirns exprimiert, die das Essverhalten regulieren, Neuronen des Nucleus arcuatus, Nucleus ventromedialis und Nucleus paraventricularis des Hypothalamus (Abb. 23-27a). Weiterhin wird der Rezeptor in Zellen der Nebennierenrinde und in den β -Zellen des Pankreas exprimiert, aber in weit geringerem Ausmaß.

Leptin übermittelt die Botschaft, dass die Fettreserven ausreichen, und fördert eine verminderte Zufuhr von Brennstoffen sowie einen zunehmenden Energieverbrauch. Durch die Wechselwirkungen von Leptin mit seinem Rezeptor im Hypothalamus verändert sich die Freisetzung des Signals, das den Appetit beeinflusst. Darüber hinaus stimuliert Leptin auch das sympathische Nervensystem, erhöht den Blutdruck, die Herzfrequenz und die Thermogenese (die

drien und Chloroplasten erst beginnen, nachdem das Vorläuferprotein vollständig synthetisiert und vom Ribosom freigesetzt wurde. Dennoch haben alle drei Transportwege eine Reihe von Ähnlichkeiten.

Vorläuferproteine, die für Mitochondrien oder Chloroplasten bestimmt sind, tragen amino-terminale Signalsequenzen, die im Cytosol von Chaperonen (Abschn. 6.4.4) gebunden werden. Die Vorläufer werden zu Rezeptoren an der Außenseite des jeweiligen Organells befördert und dann zu einem Proteinkanal dirigiert, der sich in der Regel durch die innere und äußere Membran des Organells erstreckt. Die Verschiebung durch den Kanal wird durch die Hydrolyse von ATP oder GTP und in manchen Fällen auch durch ein elektrochemisches Potential an der Membran erleichtert. Im Inneren des Organells wird die Signalsequenz des Vorläufers entfernt, und das reife Protein faltet sich wieder zusammen (Abb. 27-39).

Signalsequenzen für Mitochondrien sind in der Regel 20 bis 35 Aminosäuren lang und enthalten besonders viele Ser-, Thr- und basische Reste. Die Vorläufer der Mitochondrienproteine werden entweder von Hsp70 (*heat shock protein 70*) oder MSF (*mitochondrial import stimulation factor*) gebunden. Diese Chaperone stabilisieren die nicht-gefaltete Konformation der Proteinvorläufer. MSF ist für Mitochondrien spezifisch; Hsp70 gehört zu einer verbreiteten Klasse von Chaperonen, die sowohl in Bakterien als auch in Eukaryotenzellen vorkommen (s. Abb. 6-30).

Der gebundene Vorläufer des Mitochondrienproteins wird zu einem Proteinkomplex namens Tom (*transport across the outer membrane*), dem Mitochondrienrezeptor und dann zu einem weiteren Tom-Komplex befördert, der einen Kanal durch die äußere Membran herstellt (Abb. 27-39a). Ein weiterer Proteinkomplex, Tim (*transport across the inner membrane*) genannt, verschiebt

Abbildung 27-39

Zielgerichteter Proteintransport in Mitochondrien und Chloroplasten. **a** Transport in die Mitochondrienmatrix. Der Vorläufer eines Mitochondrienproteins wird im Cytosol an ein Chaperon (Hsp70 oder MSF) gebunden und zu einem Tom-Rezeptorkomplex dirigiert. Von dort wandert es durch einen Membrankanal, der aus spezialisierten Kanalkomplexen der Proteine Tom und Tim besteht. Angetrieben wird die Translokation sowohl durch die ATPase des Mitochondrienproteins Hsp70 (mHsp70) auf der Matrixseite der inneren Mitochondrienmembran als auch durch das elektrochemische Potential an der Innenmembran. In der Mitochondrienmatrix wird die Signalsequenz abgespalten, und das Protein faltet sich zu seiner funktionsfähigen Konformation. **b** Proteine, die für die Thylakoide in den Chloroplasten bestimmt sind, tragen eine zweiteilige Signalsequenz. Der erste Teil (rot) sorgt für den Transport ins Stroma des Chloroplasten und wird dort entfernt; anschließend vermittelt der zweite Teil (blau) die Translokation ins Thylakoidlumen, wo er dann ebenfalls abgespalten wird

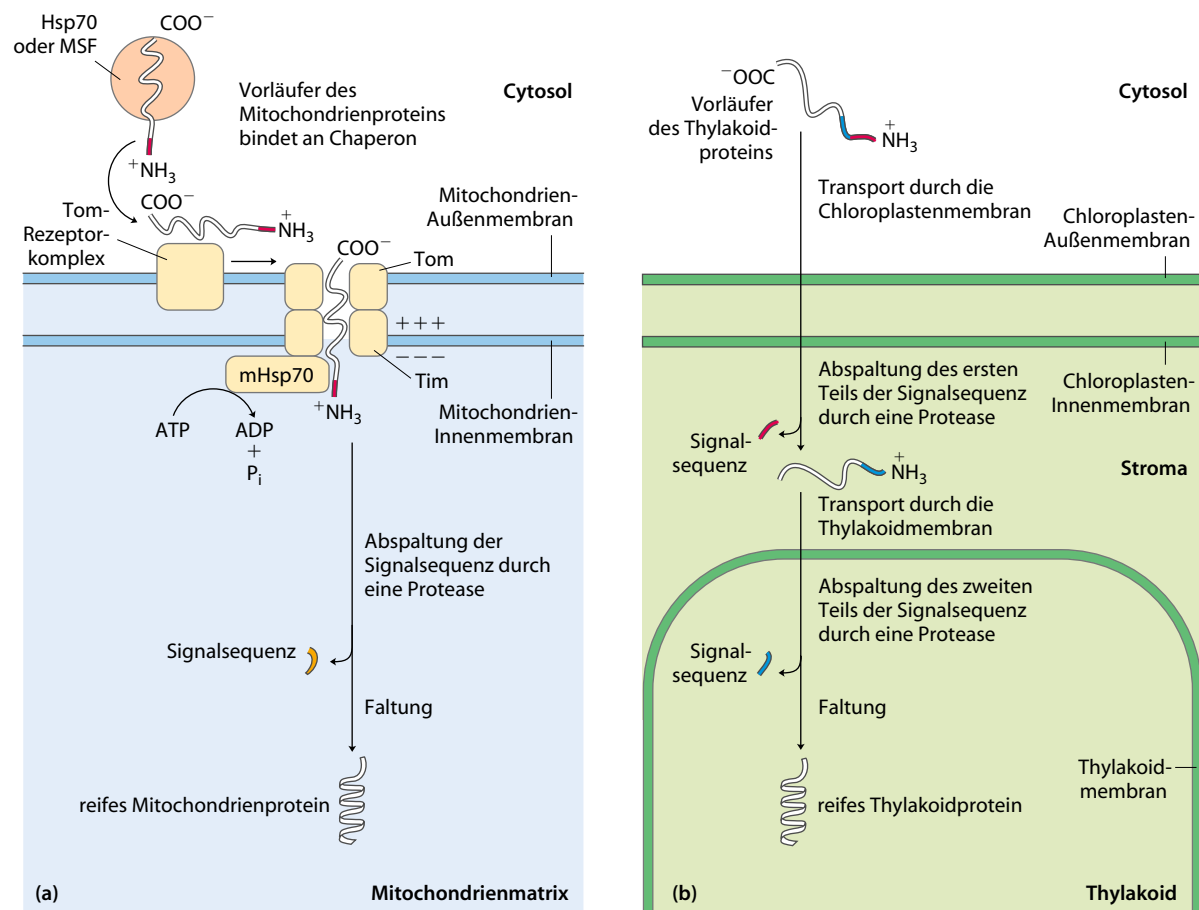
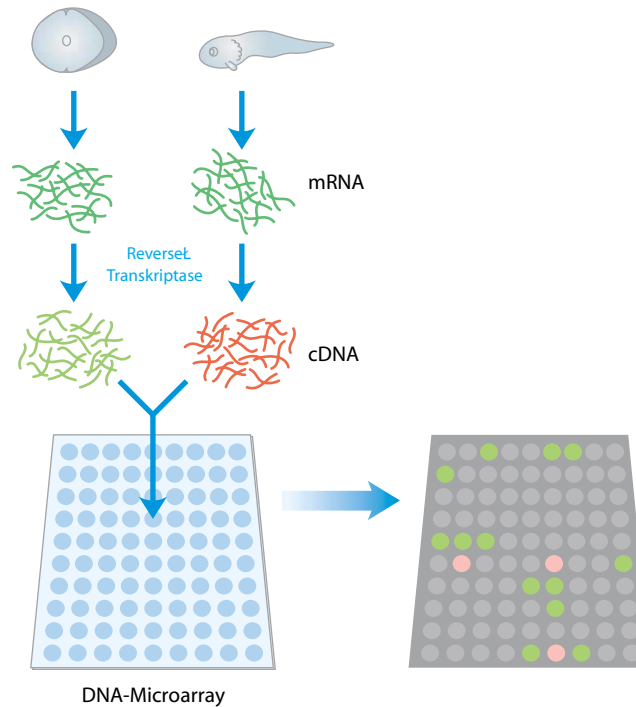


Abbildung 29-13

Konstruktion eines DNA-Mikroarrays. Für einen Mikroarray kann man jede bekannte DNA-Sequenz aus jeder beliebigen Quelle verwenden. Die DNA kann durch chemische Synthese oder PCR entstanden sein. Sie wird mithilfe eines Apparates, der sehr kleine Tropfen (Nanoliter) in einem genauen Muster aufbringen kann, auf eine feste Unterlage (meist ein speziell beschichtetes Glasplättchen) gebracht. Anschließend wird die DNA durch UV-Licht an das Glasplättchen gekoppelt. Nachdem sie an der Oberfläche befestigt ist, kann man andere, fluoreszenzmarkierte Nucleinsäuren auf den Mikroarray bringen. So kann man beispielsweise die aus einer Zelle isolierte mRNA (die alle in dieser Zelle exprimierten Gene repräsentiert) mit Reverser Transkriptase und fluoreszenzmarkierten dNTPs in cDNA-Sonden umwandeln. Die fluoreszierende cDNA verbindet sich dann mit komplementären Sequenzen auf dem Mikroarray. Nachdem man die nicht-hybridisierte Sonde entfernt hat, repräsentiert jeder fluoreszierende Fleck ein Gen, das in dem Gemisch vertreten war. In diesem Beispiel wurde die mRNA aus Zellen in zwei verschiedenen Entwicklungsstadien eines Frosches gewonnen. Die cDNA wurde in den beiden Ansätzen mit Nucleotiden markiert, die in unterschiedlichen Farben fluoreszieren; das Gemisch der cDNAs wurde dann auf den Mikroarray gebracht. Grün aufleuchtende Flecken repräsentieren mRNAs, die im Einzellstadium in größerer Menge vorhanden waren, rot fluoreszieren dagegen diejenigen Sequenzen, die vor allem später in der Entwicklung vertreten sind



29.3.1 Klonierte Gene kann man exprimieren

Häufig interessiert man sich in erster Linie nicht für das Gen selbst, sondern für sein Produkt – insbesondere wenn dieses Protein wirtschaftlichen, therapeutischen oder wissenschaftlichen Nutzen verspricht. Nachdem man grundlegende Kenntnisse über den DNA-, RNA- und Proteinstoffwechsel sowie über seine Regulation bei *E. coli* besaß, konnte man klonierte Gene exprimieren und dann ihre Proteinprodukte untersuchen.

Den meisten Eukaryotengen fehlen die DNA-Sequenz-Elemente (Promotoren usw.), die für ihre Expression in *E. coli*-Zellen notwendig wären. Deshalb muss man an den richtigen Stellen in der Nähe des in die Vektor-DNA eingebauten Eukaryotengens bakterielle Regulationssequenzen für Transkription und Translation einbauen. In manchen Fällen werden klonierte Gene so wirksam exprimiert, dass ihr Proteinprodukt 10% oder mehr der gesamten Proteinmenge in den Zellen ausmacht. Manche fremden Proteine können in derart hoher Konzentration eine *E. coli*-Zelle töten, sodass man die Genexpression auf wenige Stunden vor der geplanten Ernte der Zellen beschränken muss.

Klonierungsvektoren, die bereits die für Transkription und Translation des klonierten Gens erforderlichen Signale enthalten, bezeichnet man häufig als **Expressionsvektoren**. Die Expression des klonierten Gens wird beeinflusst, indem man den eigenen Promotor und die Regulationssequenzen des Gens durch die wirksameren, besser zu handhabenden Elemente des Vektors ersetzt. Im Allgemeinen liegen in einem solchen Vektor ein gut charakterisierter Promotor und seine Regulationselemente in der Nähe mehrerer, nur einmal vorhandener Restriktionsschnittstellen, sodass die dort eingebauten Gene unter der Kontrolle dieses Promotors exprimiert werden (Abb. 29-14). Manche derartigen Vektoren enthalten noch andere Merkmale, beispielsweise eine Bindungsstelle für Bakterienribosomen, die eine stärkere Translation der an dem Gen gewonnenen mRNA ermöglicht, oder eine Sequenz für die Termination der Transkription. Durch Überexpression klonierter Gene in Bakterien und anderen Zellen kann man ganz bestimmte Proteine in großen Mengen gewinnen, was die wissenschaftliche Arbeit häufig erleichtert oder der Industrie hohe Erträge ermöglicht.