

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Translokation des Prion-Proteins ins  
endoplasmatische Retikulum:  
die Rolle intrinsischer und zellulärer Faktoren**

Margit Miesbauer

aus

Schärding

2009

## Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Jörg Tatzelt betreut und von Frau PD Dr. Konstanze F. Winklhofer vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

## Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 16.01.2009

*Margit Minba*

---

Dissertation eingereicht am 20.01.2009

1. Gutachter : Prof. Dr. Jörg Tatzelt
2. Gutachter: Prof. Dr. F.-Ulrich Hartl

Mündliche Prüfung am 01.04.2009



## Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meinem Betreuer Prof. Dr. Jörg Tatzelt für die außerordentliche Unterstützung, die engagierte Betreuung sowie die vielen Diskussionen und Anregungen während der letzten Jahre herzlichst bedanken. Auch PD Dr. Konstanze F. Winklhofer möchte ich für die sehr gute Zusammenarbeit und Betreuung sowie die bereitwillige Übernahme der Fachvertretung danken.

Ein großer Dank gilt Prof. Dr. F.-Ulrich Hartl für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Dissertation.

Prof. Dr. Christian Haass danke ich für die wissenschaftliche Unterstützung und seine anregenden Fragen und Ideen.

Des Weiteren danke ich der gesamten Arbeitsgruppe der Abteilung Zelluläre Biochemie am Max-Planck-Institut und allen Kollegen am Adolf-Butenandt-Institut für ihre Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

Bedanken möchte ich mich natürlich auch bei der gesamten Arbeitsgruppe Tatzelt und Winklhofer und hierbei besonders bei Veronika für die tatkräftige Unterstützung im Labor sowie bei Julia, Lena, Kerstin, Uli, Vignesh, Natalie, Kathrin, Anna, Benjamin, Elisabeth und Vicky. Ganz besonderer Dank gilt Geli, Anita und Mareike, die abgesehen von ihren großartigen fachlichen Tipps und Tricks im Labor meine Dissertation zu einer ganz besonderen Zeit in meinem Leben gemacht haben und mir die besten Freunde geworden sind! An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Markus für seine fortwährende Hilfsbereitschaft bedanken.

Mein tiefster Dank gilt meiner Familie, die immer für mich da ist. Ihre Unterstützung und ihr Rückhalt in allen Lebenslagen haben mir meinen bisherigen Weg sehr geebnet und mir unendlich viel geholfen. Schließlich möchte ich von ganzem Herzen Jiri für seine Geduld und die manchmal notwendige Zerstreuung und Aufmunterung während der letzten Jahre danken.

„Es war sehr schön, es hat mich sehr gefreut!“

(Kaiser Franz Joseph et al., 1830-1916)

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Prion-Erkrankungen</b>	<b>1</b>
1.1.1	Einführung	1
1.1.2	Prion-Erkrankungen beim Tier	1
1.1.2.1	Scrapie	1
1.1.2.2	Bovine spongiforme Enzephalopathie	2
1.1.2.3	Chronisch zehrende Hirschkrankheit	3
1.1.3	Prion-Erkrankungen beim Mensch	4
1.1.3.1	Pathologie und Symptomatik humaner Prion-Erkrankungen	7
<b>1.2</b>	<b>Das Prion-Protein</b>	<b>9</b>
1.2.1	Identifikation des infektiösen Agens	9
1.2.2	Unterschiede zwischen PrP <sup>C</sup> und PrP <sup>Sc</sup> und Konversionsmodelle	10
1.2.3	PrP- und PrP-ähnliche Gene	11
1.2.4	Biogenese und zelluläre Lokalisierung von PrP	13
1.2.5	Struktur von PrP	14
1.2.6	PrP und verwandte Proteine im Zebraquärling ( <i>Danio rerio</i> )	16
<b>1.3</b>	<b>Funktion von PrP</b>	<b>18</b>
1.3.1	PrP <i>knockout</i> Mäuse	18
1.3.2	Neuroprotektivität von PrP	19
1.3.3	Rolle von PrP in der Signaltransduktion	20
1.3.4	Kupferbindung von PrP	21
<b>1.4</b>	<b>Missfaltung von PrP und Neurodegeneration</b>	<b>22</b>
1.4.1	PrP <sup>Sc</sup> führt nur in Anwesenheit von neuronal exprimiertem PrP <sup>C</sup> zur Neurodegeneration	23
1.4.2	PrP-Mutanten führen in Abwesenheit von PrP <sup>Sc</sup> zu Neurodegeneration	24
<b>1.5</b>	<b>Maturierung und Faltung sekretorischer Proteine</b>	<b>26</b>
1.5.1	Proteinsynthese am ER	27
1.5.2	Prozessierung der Proteine im ER und Golgi-Apparat	29
1.5.3	Proteinfaltung, Qualitätskontrollmechanismen und Proteinabbau	32
1.5.3.1	Calnexin-Zyklus	33
1.5.3.2	ER-assoziierte Degradierung	34
1.5.3.3	UPR	35
1.5.3.4	Kotranslokationale Qualitätskontrolle	36
<b>1.6</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>39</b>

<b>2</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>40</b>
<b>2.1</b>	<b>Teil 1 - Translokation von PrP ins ER: die Rolle intrinsischer und zellulärer Faktoren</b>	<b>40</b>
2.1.1	Teil 1A - Generierung eines Mausmodells für die GSS-Mutante Q160X	41
2.1.1.1	Generierung einer PrP-Q159X überexprimierenden transgenen Mauslinie	41
2.1.1.2	Analyse der Proteinexpression transgener Q159X-Mäuse	42
2.1.1.3	Analyse der mRNA-Levels transgener Q159X-Mäuse	43
2.1.1.4	Zusammenfassung	45
2.1.2	Teil 1B - Analyse der intrinsischen und zellulären Faktoren, die für eine effiziente Translokation von PrP ins ER notwendig sind	47
2.1.2.1	Die C-terminale GPI-Signalsequenz ist für den ER-Import entbehrlich, spielt aber eine Rolle bei der Umwandlung von mannosereichen Glykanen in komplexe Glykane	48
2.1.2.2	$\alpha$ -helikale Bereiche sind wichtig für einen effizienten ER-Import	51
2.1.2.3	Die Einführung einer zusätzlichen N-terminalen Konsensussequenz für N-Glykosylierung erleichtert die Analyse des ER-Imports	52
2.1.2.4	Die Effizienz des ER-Imports korreliert mit der Ausdehnung der $\alpha$ -helikalen Bereiche	54
2.1.2.5	$\alpha$ -helikale Bereiche sind für einen effizienten ER-Import ausreichend	55
2.1.2.6	A115X/31 <sup>CHO</sup> wird offensichtlich kotranslokational degradiert	56
2.1.2.7	115 $\alpha_2\alpha_3$ wird unabhängig von einer N-verknüpften Glykosylierung und der Ausbildung einer Disulfidbrücke erfolgreich ins ER importiert	57
2.1.2.8	Die Länge und möglicherweise die Lage der $\alpha$ -helikalen Domänen modulieren den ER-Import	59
2.1.2.9	Eine unglykosylierte Fraktion von 115 $\alpha_2\alpha_3$ wird nicht in das ER importiert sondern kotranslokational degradiert	60
2.1.2.10	$\alpha$ -helikale Bereiche heterologer Proteine fördern den ER-Import von PrP	62
2.1.2.11	<i>In vitro</i> Analyse des ER-Imports	64
2.1.2.12	Effiziente heterologe ER-Signalsequenzen können den ER-Import unstrukturierter Polypeptide nicht fördern	65
2.1.2.13	p58 <sup>PK</sup> fördert die kotranslokationale Degradierung von sekretorischen Proteinen mit ausgedehnten unstrukturierten Bereichen am N-Terminus	67
2.1.2.14	115 $\alpha_2\alpha_3$ wird unter ER-Stressbedingungen vermindert in das ER importiert	70
2.1.2.15	Zusammenfassung	72
<b>2.2</b>	<b>Teil 2 - Biochemische Charakterisierung von PrP-Homologen aus dem Zebrafisch (<i>Danio rerio</i>)</b>	<b>75</b>
2.2.1	Generierung von zePrP1 und zeSho2 und Expression in murinen Neuroblastomzellen	76
2.2.2	zePrP1 und zeSho2 werden ins ER importiert und N-glykosyliert	77
2.2.3	zePrP1 und zeSho2 werden mit einem GPI-Anker modifiziert und sind an der Außenseite der Plasmamembran lokalisiert	81
2.2.4	Zusammenfassung	84

---

<b>3</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>85</b>
<b>3.1</b>	<b>Teil 1 - Translokation von PrP ins ER: die Rolle intrinsischer und zellulärer Faktoren</b>	<b>85</b>
3.1.1	ER-Import von PrP: Die Rolle der N-terminalen Signalsequenz und der HD	85
3.1.2	Die Sekundärstruktur ist ein Signal für effizienten ER-Import	86
3.1.3	Wie kann die Sekundärstruktur Einfluss auf die Translokation ausüben?	88
3.1.4	Die Regulation der Translokation - ein früher Qualitätskontrollmechanismus?	89
3.1.5	Die physiologische Bedeutung der kotranslokationalen Qualitätskontrolle	92
3.1.6	Die kotranslokationale Qualitätskontrolle - Implikationen für neurodegenerative Erkrankungen	92
<b>3.2</b>	<b>Teil 2 - Biochemische Charakterisierung von PrP-Homologen aus dem Zebraquärling (<i>Danio rerio</i>)</b>	<b>94</b>
3.2.1	zePrP1 und zeSho2 zeigen konservierte ko- und posttranslationale Modifikationen sowie eine konservierte zelluläre Lokalisierung	94
3.2.2	Sho-Proteine haben möglicherweise eine PrP-ähnliche, protektive Funktion	95
<b>4</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>96</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>97</b>
<b>5.1</b>	<b>Biologisches Material</b>	<b>97</b>
5.1.1	Bakterienstämme	97
5.1.2	Vektoren	97
5.1.3	Zelllinien	97
5.1.4	Antikörper	97
5.1.5	Enzyme und Proteine	97
5.1.6	Standardgrößenmarker für Proteine und Nukleinsäuren	98
5.1.7	Synthetische Oligonukleotide	98
<b>5.2</b>	<b>Chemikalien/Reagentien</b>	<b>100</b>
<b>5.3</b>	<b>Lösungen und Puffer</b>	<b>101</b>
<b>5.4</b>	<b>Medien</b>	<b>103</b>
<b>5.5</b>	<b>Kits</b>	<b>104</b>
<b>5.6</b>	<b>Geräte</b>	<b>104</b>
<b>5.7</b>	<b>Sonstige Materialien</b>	<b>105</b>
<b>6</b>	<b>METHODEN</b>	<b>106</b>

---

<b>6.1</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>106</b>
6.1.1	Rekombinante Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	106
6.1.2	Klonierung der Konstrukte für die Analyse des ER-Imports	107
6.1.3	Generierung der transgenen Mäuse PrP-Q159X, Parkin und Parkin-W453X	110
6.1.4	Klonierung der Zebrafisch PrP-Homologen	112
6.1.5	Herstellung kompetenter Bakterien	112
6.1.6	Transformation kompetenter Bakterien	112
6.1.7	DNA-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	113
6.1.8	DNA-Präparation aus Mäuseschwanzspitzen (zur Genotypisierung)	113
6.1.9	RNA-Präparation	113
6.1.10	Sequenzierungen	113
<b>6.2</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>113</b>
6.2.1	Zellkultur	113
6.2.1.1	Kultivierung von Zellen	113
6.2.1.2	Passagierung	114
6.2.1.3	Ausplattieren	114
6.2.1.4	Transfektion	114
6.2.1.5	Zellernte	114
6.2.2	Protein- und Nukleinsäureanalytik	115
6.2.2.1	Gesamtzelllysat	115
6.2.2.2	Nachweis der Löslichkeit (Trennung des Lysats)	115
6.2.2.3	Lysat aus Mäusegehirnen	115
6.2.2.4	Proteinkonzentration nach Bradford	115
6.2.2.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	116
6.2.2.6	Proteintransfer auf Nitrozellulose (Western Blot)	116
6.2.2.7	Ponceau S – Färbung	116
6.2.2.8	Immundetektion von Proteinen	116
6.2.2.9	Immunpräzipitation (IP)	116
6.2.2.10	Radioaktive Markierung von Proteinen mit [ <sup>35</sup> S]-Methionin	117
6.2.2.11	Autoradiogramme	117
6.2.2.12	Behandlung mit proteasomalem Inhibitor MG132	117
6.2.2.13	Behandlung mit Thapsigargin	118
6.2.2.14	Nachweis der Sekretion	118
6.2.2.15	Analyse der Glykosylierung	118
6.2.2.16	Nachweis von Oberflächenproteinen	119
6.2.2.17	Northern Blotting	119
6.2.2.18	<i>In vitro</i> Transkription/Translation und <i>in vitro</i> Import in ER-Mikrosomen	120
6.2.3	Indirekte Immunfluoreszenz	120
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>121</b>



<b>8</b>	<b>GLOSSAR</b>	<b>140</b>
<b>9</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>142</b>
<b>10</b>	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN</b>	<b>143</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Prion-Erkrankungen

### 1.1.1 Einführung

Prion-Erkrankungen sind in jedem Fall tödlich verlaufende, neurodegenerative Erkrankungen, die sowohl beim Tier als auch beim Menschen auftreten (Prusiner et al., 1998; Belay, 1999; Collinge, 2001; Collins et al., 2001). Sie werden aufgrund ihrer Übertragbarkeit (Transmissibilität) und ihrer Pathologie, einer schwammartigen (spongiformen) Degeneration des Gehirns, auch „transmissible spongiforme Enzephalopathien“ (TSE) genannt. Eine spongiforme Vakuolisierung des Hirngewebes, die Bildung von missgefaltetem Prion-Protein, das teilweise in Form sogenannter Plaques im Gehirn zu finden ist, und astrozytäre Gliose sind die wichtigsten pathologischen Charakteristika der Krankheiten (siehe Abschnitt 1.1.3.1). TSE, die sich durch eine lange Inkubationszeit und einen äußerst progressiven Krankheitsverlauf auszeichnen, können nicht nur sporadischen oder hereditären, sondern auch infektiösen Ursprungs sein. Die Infektiösität von Prion-Erkrankungen ist eine einzigartige Eigenschaft und unterscheidet sie von allen anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie beispielsweise der Alzheimer-Krankheit, Huntington-Krankheit und Parkinson-Krankheit.

### 1.1.2 Prion-Erkrankungen beim Tier

#### 1.1.2.1 Scrapie

Die erste Prion-Erkrankung wurde von Hirten vor über 200 Jahren bei Schafen in Großbritannien beschrieben (McGowan, 1922). Die Krankheit wurde „Scrapie“ genannt, da ein charakteristisches Merkmal das Kratzen des Fells ist (engl. *scrape*, kratzen). Daneben zeigen die Schafe auch Verhaltensänderungen und motorische Einschränkungen wie schwankender oder trabend wirkender Gang (deshalb auch „Traberkrankheit“). Nach drei bis sechs Monaten kommt es zum Tod der Tiere. Scrapie hat sich in Großbritannien rasch ausgebreitet. 1759 wurde erstmals dokumentiert, dass es sich um eine übertragbare Krankheit handelt (Leopoldt, 1759), und in den folgenden Jahren begannen sich erste wissenschaftliche Arbeiten mit der Krankheit auseinanderzusetzen. Besnoit und Morel beschrieben 1898 neuronale Vakuolisierungen als charakteristische pathologische Veränderungen im Gehirn kranker Schafe (Besnoit, 1898). Die ersten erfolgreichen epidemiologischen Studien, bei denen gezeigt wurde, dass Scrapie übertragbar ist und die Inkubationsdauer ungewöhnlich lang dauert, wurden 1936 von Cuille und Chelle

durchgeführt (Cuillé und Chelle, 1939). Die Forschung der darauf folgenden Jahre befasste sich immer mehr mit der Suche nach dem „Krankheitserreger“, der damals jedoch noch nicht identifiziert werden konnte. Besonders von Scrapie betroffen waren im frühen 20. Jahrhundert englische Suffolk-Schafe, die intensivem internationalen Handel unterlagen, was vermutlich für die Verbreitung von Scrapie in viele andere Länder verantwortlich war (Hourrigan, 1979). Die Meldepflicht für Scrapie wurde in England schließlich erst 1993 eingeführt, was, wie im nächsten Abschnitt beschrieben, möglicherweise fatale Folgen für den Menschen hatte.

### **1.1.2.2 Bovine spongiforme Enzephalopathie**

Erste Fälle der sogenannten bovinen spongiformen Enzephalopathie (BSE), einer bis dahin unbekanntes Rinderkrankheit, wurden 1986 in Großbritannien beschrieben (Wells et al., 1987). Die von der Krankheit betroffenen Tiere konnten, ähnlich wie Scrapie-infizierte Schafe, ihre Bewegungen nicht mehr kontrollieren, waren ungewöhnlich schreckhaft und starben schließlich innerhalb von sechs bis zwölf Monaten nach Ausbruch der Krankheit. In Hirngewebeschnitten BSE erkrankter Rinder wurden zur Scrapie-Erkrankung ähnliche, lichtmikroskopisch sichtbare Durchlöcherungen festgestellt. In den Jahren nach der Entdeckung weitete sich die Krankheit in Großbritannien relativ schnell zu einer massiven Epidemie aus, deren Höhepunkt 1992 mit mehr als 37.000 Fällen erreicht wurde. Die mögliche Ursache der Epidemie wurde 1988 erstmals publik. Es wurde und wird noch immer vermutet, dass das verwendete Rinderfutter, welches aus ökonomischen Gründen damals seit geraumer Zeit nur mehr ungenügend sterilisiert wurde, die Ursache sein könnte. Dieses Rinderfutter enthielt unter anderem Tiermehl, welches zumindest teilweise vom Schaf stammte und deshalb möglicherweise mit Scrapie-Erregern kontaminiert war (Wilesmith, 1988; Wilesmith et al., 1992).

In Folge des 1988 von der britischen Regierung aufgestellten Verbots der Tiermehl-Verfütterung an Wiederkäuer ist die Zahl der BSE-Neuerkrankungen rückläufig. Während 2003 weltweit noch circa 1.600 Fälle beschrieben wurden, konnten 2005 nur noch 500 und 2008 nur mehr circa 60 Krankheitsfälle festgestellt werden ([www.oie.int](http://www.oie.int)). Einen Grund für die lange Dauer zwischen Verbot und sinkenden Zahlen der an BSE erkrankten Rinder könnte die lange Inkubationszeit von vier bis fünf Jahren darstellen. Obwohl die Epidemie ihren Höhepunkt überschritten zu haben scheint, ist das Ausmaß für die Konsumenten von möglicherweise infiziertem Rindermaterial nicht abzusehen. Es wird davon ausgegangen, dass BSE auf den Menschen oral übertragbar ist und zu einer fatalen humanen Prion-Erkrankung (nvCJK) führt (siehe Abschnitt 1.1.3; Collinge et al., 1996, Aguzzi und Weissmann, 1996; Hill et al., 1997, Bruce et al., 1997).

### 1.1.2.3 Chronisch zehrende Hirschkrankheit

Eine weitere Art der Prion-Erkrankung im Tier ist die chronisch zehrende Hirschkrankheit (engl. *chronic wasting disease*, CWD), die unter anderem den Maultierhirsch (*Odocoileus hemionus*), den Virginiahirsch (*Odocoileus virginianus*) und den nordamerikanischen Rothirsch (*Cervus elaphus nelsoni*) befallen kann (Williams, 2005; Johnson, 2005; Watts et al., 2006; Conner et al., 2008). CWD wurde erstmals 1967 in Colorado (USA) beschrieben, aber erst 1978 nach histopathologischer Analyse der Hirngewebe erkrankter Tiere als spongiforme Enzephalopathie diagnostiziert (Williams und Young, 1980; Williams und Young, 1982; Williams und Young, 1992). Die betroffenen Tiere magern stark ab, zeigen Verhaltensveränderungen, wankenden Gang und übermäßigen Speichelfluss bis sie nach einigen Wochen oder Monaten sterben. Im Gegensatz zu BSE und Scrapie tritt CWD auch in nicht domestizierten, frei lebenden Herden in ganz Nordamerika auf (Williams und Miller, 2002). Ein besonderer Risikofaktor besteht darin, dass diese Krankheit durch direkten Kontakt der Tiere, möglicherweise durch Speichel und Exkremente, horizontal übertragen werden kann und sich entsprechend schnell ausbreitet (Miller und Williams, 2003; Miller et al., 2004; Mathiason et al., 2006). Obwohl CWD intrazerebral auf Rinder, Schafe und Ziegen übertragen werden kann, konnte eine orale Übertragbarkeit auf Rinder oder den Menschen (noch) nicht nachgewiesen werden (Williams und Miller, 2002; Belay et al., 2004; Hamir et al., 2005; Hamir et al., 2006; Hamir et al., 2007).

Neben den bereits beschriebenen Krankheiten gibt es noch eine Reihe anderer Prion-Erkrankungen im Tier. Eine Übersicht der bisher identifizierten Erkrankungen ist in Tabelle 1 aufgelistet.

**Tabelle 1. Überblick über die spongiformen Enzephalopathien der Tiere.**

Name der Prion-Erkrankung	Jahr und Ort der ersten Beschreibung	Referenz	Ursache	betroffene Tierarten
<b>Scrapie</b>	1732, GB	Leopoldt, 1759	nicht bekannt	Schaf, Ziege
<b>Transmissible Nerz Enzephalopathie Transmissible mink encephalopathy (TME)</b>	1974, USA	Hartsough und Burger, 1965	Infektion	Nerz
<b>Chronisch zehrende Hirschkrankheit Chronic wasting disease (CWD)</b>	1980, USA	Williams und Young, 1980	nicht bekannt	Hirsch
<b>Bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE)</b>	1986, GB	Wells et al., 1987	Infektion	Rind
<b>Exotische Huftier Enzephalopathie Exotic ungulate encephalopathy (EUE)</b>	1986, GB	Kirkwood et al., 1990	Infektion	rinderartige Wiederkäuer im Zoo (Antilope)
<b>Feline spongiforme Enzephalopathie (FSE)</b>	1990, GB	Leggett et al., 1990	Infektion	Haus- und Wildkatze

### 1.1.3 Prion-Erkrankungen beim Mensch

Auch beim Menschen treten Prion-Erkrankungen auf. Diese lassen sich in drei verschiedene ätiologische Gruppen unterteilen: sporadisch (unbekannten Ursprungs), vererbbar (hereditär) und übertragbar (infektiös). In Tabelle 2 sind alle bisher beschriebenen Prion-Erkrankungen beim Menschen, deren Jahr und Ort des ersten Auftretens sowie ihre Ätiologie zusammengefasst.

**Tabelle 2. Übersicht über die humanen Prion-Erkrankungen.**

Name der Prion-Erkrankung	Jahr und Ort der ersten Beschreibung	Referenz	Ätiologie
<b>Sporadische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (sCJK)</b>	1920, Deutschland	Creutzfeldt, 1920 Jakob, 1921	unbekannt
<b>Familiäre Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (fCJK)</b>	1924, Deutschland	Kirschbaum 1924	Mutation im PrP-Gen
<b>Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom (GSS)</b>	1928/1936, Österreich	Gerstmann et al., 1928, 1936	Mutation im PrP-Gen
<b>Kuru</b>	1957, Papua-Neuguinea	Gajdusek und Zigas, 1957	ritueller Kannibalismus
<b>Iatrogene Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (iCJK)</b>	1974, USA	Duffy et al., 1974	Infektion durch ärztliche Behandlung
<b>Fatale Familiäre Insomnie (FFI)</b>	1986, Italien	Lugaresi et al., 1986	Mutation im PrP-Gen
<b>Neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (nvCJK)</b>	1996, GB	Will et al., 1996	Infektion

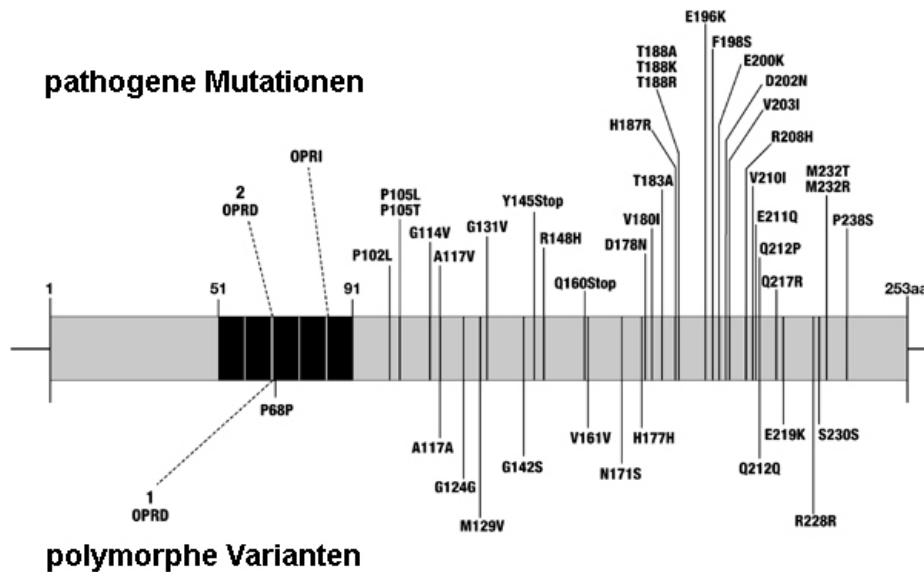
1957 wurde in den östlichen Hochländern von Papua-Neuguinea von einer bislang noch nie beschriebenen, tödlich verlaufenden Krankheit berichtet. Diese epidemisch auftretende neurologische Erkrankung unter den eingeborenen Stämmen wurde von den Einheimischen „Kuru“, was soviel heißt wie „Zittern vor Fieber“, genannt (Gajdusek und Zigas, 1957). Erkrankte litten an Tremor, starken emotionalen Veränderungen und erst später im Verlauf der Krankheit an Symptomen der Demenz. Eine Besonderheit war, dass hauptsächlich Frauen und Kinder aber kaum Männer von der Krankheit betroffen waren (Alpers und Gajdusek, 1965). Im Jahre 1965 konnte die Infektiosität der Krankheit durch Übertragungsexperimente an Schimpansen bewiesen werden (Gajdusek und Gibbs, 1964; Gajdusek et al., 1966; Beck und Daniel, 1976; Hainfellner et al., 1997). Es wird vermutet, dass Kuru durch Endo-Kannibalismus übertragen wurde (Klitzman, 1984). Aus rituellen Gründen verzehrten die Eingeborenen, unter ihnen vor allem Frauen und Kinder, die Hirne verstorbener Stammesmitglieder. Aufgrund der Rezyklisierung des Erregers innerhalb einer isolierten kleinen Gruppe nahm Kuru zeitweise epidemische Ausmaße an. Insgesamt sind seit 1957 knapp 2.700 Menschen an Kuru gestorben (Prusiner, 1995), doch nach Verbot des Kannibalismus 1959 sank die Zahl der Neuansteckungen kontinuierlich. Heute sind nur mehr

sehr wenige Fälle bekannt, wobei alle Betroffenen vor dem Verbot des Kannibalismus geboren worden sind. Im Jahre 1959 wurde erstmals durch den Veterinärmediziner Hadlow eine Ähnlichkeit mit der Schafkrankheit Scrapie aufgezeigt (Hadlow, 1959). Der Wissenschaftler Igor Klatzo, der die Gehirne mehrerer Kuru-Patienten nach deren Tod analysierte, stellte darüber hinaus fest, dass Kuru einer anderen humanen Erkrankung - der sogenannten Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK) - stark ähnelt und es einen Zusammenhang zwischen all diesen Erkrankungen geben muss (Klatzo et al., 1959).

Die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit wurde 1920/21 unabhängig voneinander von den zwei deutschen Neurologen Hans-Gerhard Creutzfeldt und Alfons Jakob erstmals beschrieben (Creutzfeldt, 1920; Jakob, 1921). Sie nannten Symptome wie Depressionen, Bewegungsstörungen, Muskelstarre, Schluckstörungen und als Hauptkennungszeichen einen sehr raschen Persönlichkeitsverfall mit Demenz. Die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit ist eine äußerst selten vorkommende Erkrankung. Pro Jahr werden nur circa 0,4-1,8 Fälle pro einer Million Menschen registriert (Prince et al., 2006). Grundsätzlich können verschiedene CJK-Varianten, darunter die sporadische CJK (sCJK), die familiäre CJK (fCJK), die iatrogene CJK (iCJK) und die neue Variante der CJK (nvCJK), unterschieden werden.

Die häufigste CJK-Form ist die sporadische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (sCJK), die circa 85% aller CJK-Fälle darstellt (Johnson, 2005; Prince et al., 2006). Die Ursache von sCJK ist nicht bekannt. Bis jetzt konnten keine exo- oder endogenen Auslöser identifiziert werden. Es existieren jedoch Hypothesen über mögliche sporadisch auftretende somatische Mutationen im Prion-Protein-Gen (*PRNP*) (siehe Abschnitt 1.2.3), seltene spontane Umfaltungen des Prion-Proteins oder aber unerkannte Infektionen, die sCJK verursachen könnten (Aguzzi et al., 2008).

Die familiäre Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (fCJK) gehört zu den vererbaren Prion-Erkrankungen, die circa 15% aller Fälle ausmachen. fCJK wird durch Keimbahnmutationen im *PRNP* hervorgerufen und autosomal dominant vererbt. In den von der Krankheit betroffenen Familien wurden eine Reihe verschiedener Punkt-, Deletions- oder Insertionsmutationen identifiziert (Abb. 1). Bemerkenswerterweise finden sich die meisten Mutationen im gut strukturierten C-Terminus von PrP (vgl. Abschnitt 1.2.5; Hsiao et al., 1989; Dlouhy et al., 1992; Petersen et al., 1992; Poulter et al., 1992; Gabizon et al., 1993). Das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) und die Fatale Familiäre Insomnie (FFI) werden ebenfalls durch Mutationen im *PRNP* ausgelöst (Hsiao et al., 1989; Medori et al., 1992).



**Abb. 1. Überblick über Mutationen im Prion-Protein-Gen (*PRNP*), die familiäre Creutzfeldt-Jakob-Krankheiten auslösen.** Schematische Darstellung des *PRNP* mit oberhalb eingezeichneten pathogenen Mutationen sowie mit unterhalb eingezeichneten polymorphen Varianten. OPRI, Oktapeptidrepeat-Insertation, OPRD, Oktapeptidrepeat-Deletion. Abbildung modifiziert aus (Mead, 2006).

Die dritte Gruppe der Prion-Erkrankungen ist die infektiöse Form, die weniger als 1% aller Fälle darstellt und die sogenannte iatrogene Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (iCJK) sowie die neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit umfasst. iCJK, seit 1974 bekannt, wird durch medizinische Unfälle ausgelöst (Duffy et al., 1974). In den 1980er Jahren wurden Hormonpräparate wie das humane Wachstumshormon aus Hypophysen von Leichen extrahiert und therapeutisch eingesetzt. Da sich unter diesen Leichen auch ein CJK-Fall befunden hat, erkrankten in Folge mehr als 100 Patienten, die damals dieser Hormontherapie unterzogen wurden, innerhalb von ein bis zwei Jahren an iCJK. Nach der Einführung der Produktion von rekombinantem Wachstumshormon nahm die Zahl der Neuinfektionen deutlich ab, doch noch immer tauchen vereinzelt iCJK-Fälle auf. Seltener gingen iCJK-Fälle auf die Verwendung kontaminierter chirurgischer Instrumente oder auf die Transplantation von infiziertem Gewebe wie der äußeren Hirnhaut oder der Cornea zurück (Duffy et al., 1974; Bernoulli et al., 1977; Kondo und Kuroiwa, 1982; Davanipour et al., 1984).

1994 tauchte eine neue Form humaner spongiformer Enzephalopathien in Großbritannien auf. Die sogenannte neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (nvCJK) wird ebenfalls durch Infektion erworben und geht höchstwahrscheinlich auf eine orale Übertragung mit BSE-infektiösem Material zurück (siehe Abschnitt 1.1.2.2; Collinge et al., 1996; Aguzzi und Weissmann, 1996; Hill et al., 1997; Bruce et al., 1997). Bisher wurden über 160 Fälle der

nvCJK in Großbritannien und einige wenige Fälle weltweit registriert ([www.eurocjd.ed.ac.uk](http://www.eurocjd.ed.ac.uk)). Obwohl die befürchtete Epidemie bisher ausblieb, kann aufgrund der langen und variablen Inkubationszeiten von Prion-Erkrankungen nicht vorhergesagt werden, welche Auswirkungen die BSE-Epidemie in den folgenden Jahren noch auf den Menschen haben könnte. Es gibt Hinweise darauf, dass Prion-Erkrankungen über das Blut übertragen werden (Houston et al., 2000; Hunter und Houston, 2002) und einzelne Fälle von vCJK wurden bereits mit kontaminierten Bluttransfusionen in Zusammenhang gebracht (Llewelyn et al., 2004; Peden et al., 2004; Aguzzi und Glatzel, 2004; Wroe et al., 2006). Dementsprechend könnte die Kontamination von Blutprodukten mit infektiösem Material das Risiko für TSE-Infektionen beim Menschen maßgeblich erhöhen.

### **1.1.3.1 Pathologie und Symptomatik humaner Prion-Erkrankungen**

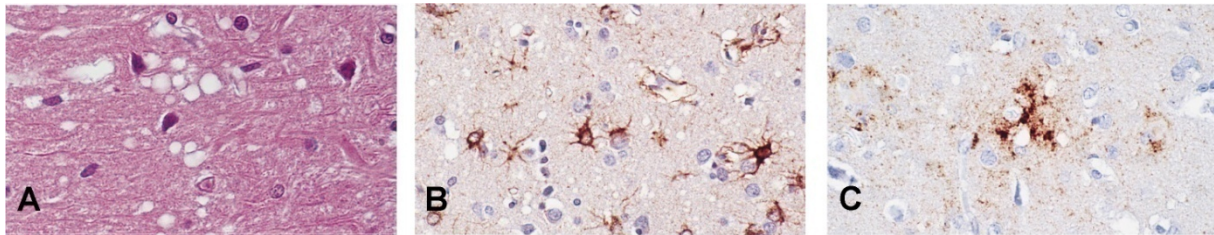
Prion-Erkrankungen sind durch lange Inkubationszeiten, einen äußerst progressiven Krankheitsverlauf und vor allem sehr komplexe Ätiologien charakterisiert. Unter den verschiedenen Formen der CJK bestehen Unterschiede in der Krankheitsdauer, der Symptomatik und dem neuropathologischen Bild. Während die sporadischen Formen der CJK im Durchschnittsalter von 60 Jahren und das zu fCJK zählende GSS mit durchschnittlich 45 Jahren ausbricht, wird nvCJK bei verhältnismäßig jungen Patienten im Durchschnittsalter von 29 Jahren festgestellt. Kuru tritt in einem Alter zwischen vier und 60 Jahren auf, was wahrscheinlich mit der Variabilität der Erregermenge, dem Zeitpunkt der Exposition und dem Infektionsweg zusammenhängt. Während die durchschnittliche Dauer zwischen dem Ausbruch der Krankheit und dem Tod bei sCJK nur zwei bis drei Monate, bei nvCJK durchschnittlich 14 und bei Kuru ungefähr 12 Monate beträgt, ist die Krankheitsdauer bei GSS mit durchschnittlich fünf Jahren außergewöhnlich lang (Johnson und Gibbs, 1998; Collinge, 2001).

Auch die Symptomatik ist sehr vielfältig. CJK ist vor allem durch Demenz und erst später durch Koordinationsstörungen charakterisiert, während dies bei Kuru zeitlich genau umgekehrt ist. Im Gegensatz dazu zeichnet sich FFI durch progressive Schlaflosigkeit und Störung des vegetativen Nervensystems aus. Vor allem Bewegungs- aber auch Sprach- oder Sehstörungen zählen zu den anfänglichen Symptomen humaner Prion-Erkrankungen, während Persönlichkeitsveränderungen und Gedächtnisstörungen erst im weiteren Verlauf festzustellen sind (Wadsworth und Collinge, 2007). Letztendlich führt der totale Ausfall des Großhirns zum Tod der Patienten.

Die neuropathologischen Veränderungen von Prion-Erkrankungen inkludieren unter anderem eine Vakuolisierung des Hirngewebes, astrozytäre Gliose und Ablagerungen von PrP,

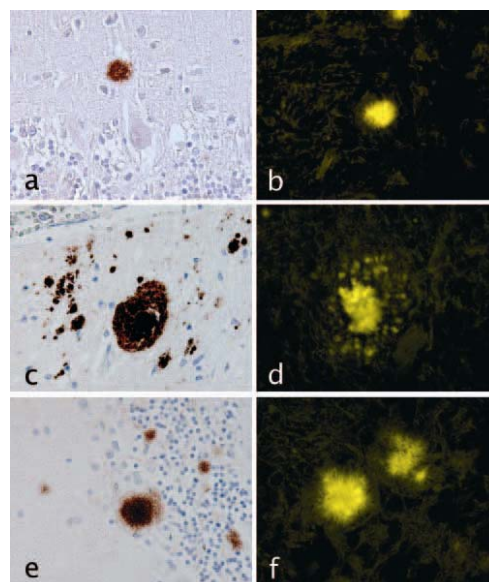


sogenannte Plaques, die sehr charakteristisch für die verschiedenen Krankheiten sein können (Abb. 2).



**Abb. 2. Neuropathologische Veränderungen bei Prion-Erkrankungen.** Charakteristische histologische Merkmale eines CJK-Patienten umfassen unter anderem **(A)** spongiforme Veränderungen, **(B)** Astrogliose und **(C)** Prion-Protein-Ablagerungen. Gezeigt sind eine Hämatoxylin-Eosin Färbung (A) und immun-histochemische Färbungen unter Verwendung eines anti-GFAP Antikörpers (B) und eines anti-Prion-Protein Antikörpers (C). Abbildung modifiziert aus (Glatzel und Aguzzi, 2001).

So gibt es die sogenannten Kuru-Plaques, die sehr homogene Ablagerungen darstellen, und ihrem Namen nach sehr oft bei Kuru-Patienten zu finden sind, während sie bei sCJK nur in 15% aller Fälle vorkommen (Klatzo et al., 1959). Des Weiteren finden sich multizentrische oder auch Korkarden-Plaques vor allem bei GSS-Patienten (Brown, 1992) und die ungewöhnlichen Florid-Plaques ausschließlich bei nvCJK-Fällen (Will et al., 1996). Namensgebend für letztere Plaque-Art ist ein Ring von spongiformen Veränderungen der die Plaques umgibt und dessen Form an eine Blüte (lat. *floridus*, blühend) erinnern soll (Abb. 3).



**Abb. 3. Immunhistochemische und fluoreszenzmarkierte Färbung verschiedener Plaque-Formen humaner Prion-Erkrankungen.** Gezeigt sind Gewebeschnitte des Kleinhirns eines sCJK-Patienten (Kuru-Plaques, **a, b**), eines GSS-Patienten (multizentrische Plaques, **c, d**) sowie eines nvCJK-Patienten (Florid-Plaques, **e, f**).

Immunhistochemische Färbung der Prion-Protein-Ablagerung mittels 3F4 Antikörper (a, c, e). Plaque-Färbung mit 2-(1-(6-[(2-Fluoroethyl)(Methyl)Amino]-2-Naphthyl) Ethyliden) Malononitril (FDDNP) (b, d, f). Abbildung aus (Bresjanac et al., 2003).

## 1.2 Das Prion-Protein

### 1.2.1 Identifikation des infektiösen Agens

Die Übertragbarkeit von Prion-Erkrankungen wurde schon früh vermutet und konnte im Laufe der Jahre experimentell bestätigt werden. Über den Erreger war man sich jedoch lange Zeit unklar. Ursprünglich hielt man Viren oder das sogenannte „*Slow Virus*“ für den Auslöser von Prion-Erkrankungen (Sigurdsson, 1954). Die beobachtete Resistenz des übertragbaren Agens gegenüber ultravioletter und ionisierender Strahlung widersprach jedoch einem Virus als Erreger (Alper et al., 1967). Schließlich gelang es Stanley Prusiner und seinen Kollegen eine ausreichend reine, infektiöse Fraktion aus Hirnextrakten experimentell infizierter Hamster zu isolieren. Sie stellten fest, dass die Infektiosität dieser Extrakte zwar nicht durch die Behandlung mit Nukleinsäure-schädigenden Verfahren, jedoch mit Substanzen, die Proteine abbauen oder deren natürliche Faltung beeinflussen, verringert werden konnte (Prusiner et al., 1981; Prusiner, 1982). Diese Ergebnisse untermauerten eine schon früher aufgestellte Hypothese eines proteinartigen Krankheitserregers ohne Nukleinsäure (Griffith, 1967). Stanley Prusiner führte den Namen „**Prion**“ [pri:on] als Abkürzung für „*proteinaceous infectious particle*“ (engl. für proteinartiges, infektiöses Partikel) ein, um diesen neuartigen Erreger von Viren oder Bakterien abzugrenzen. Wegen der leichteren Aussprache wurde die Abkürzung „Proin“ in „Prion“ abgeändert. Die damals aufgestellte Hypothese besagt, dass das Prion-Krankheiten verursachende infektiöse Agens ein missgefaltetes Protein sei, das in Abwesenheit von Nukleinsäuren propagieren könne (Prusiner, 1982). Bis heute fehlt allerdings der endgültige Nachweis dieser Hypothese.

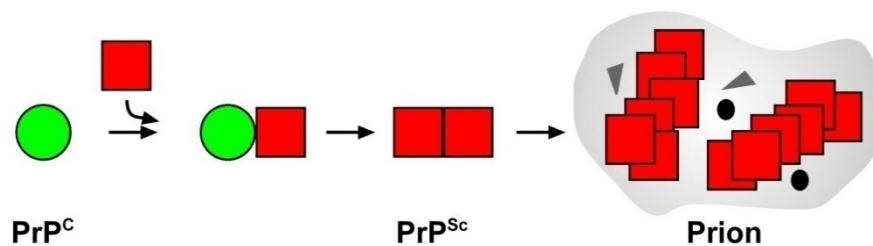
Ein Protease-resistentes, Detergens-unlösliches 27-30 kDa großes Glykoprotein wurde im Jahre 1982 in Gehirnhomogenaten von Scrapie-infizierten Hamstern gefunden (Bolton et al., 1982) und als Protease-resistenter Kern des infektiösen Agens identifiziert. Es wurde Prion-Protein (PrP) und aufgrund seiner Größe PrP<sup>27-30</sup> genannt (Prusiner et al., 1984). Schließlich gelang mit einer von diesem isolierten Protein abgeleiteten DNA-Sonde die Identifizierung des für PrP kodierenden Gens (*PRNP*) (Oesch et al., 1985). Erstaunlicherweise wurde die PrP-mRNA sowohl in Scrapie-infizierten als auch in uninfizierten, gesunden Geweben gefunden (Chesebro et al., 1985). In uninfizierten Tieren wurde jedoch nur Protease-sensitives, Detergens-lösliches PrP entdeckt, welches daraufhin zelluläres Prion-Protein (engl. *cellular PrP*, PrP<sup>C</sup>) genannt wurde (Oesch et al., 1985).

Weitere Experimente zeigten, dass dieses Protein auch im Menschen exprimiert wird (Oesch et al., 1985; Chesebro et al., 1985; Basler et al., 1986; Stahl et al., 1993). Man kam zu dem Schluss, dass zwei verschiedene Formen des Proteins existieren. Neben dem unter physiologischen Umständen vorkommenden zellulären PrP musste eine aberrante, pathogene sogenannte Scrapie-Form (PrP<sup>Sc</sup>) vorhanden sein.

Viele Versuche die Prion-Hypothese zu widerlegen und Viren als Erreger zu etablieren scheiterten, doch die genaue Zusammensetzung des infektiösen Agens ist nach wie vor nicht geklärt. Nukleinsäuren, die länger als 25 Nukleotide lang sind, konnten zwar als essentielle Komponente infektiöser Einheiten (Prionen) ausgeschlossen werden (Safar et al., 2005), doch enthalten die heute reinsten, infektiösen Prionen-Präparationen neben ihrem Hauptbestandteil PrP<sup>Sc</sup> noch signifikante Mengen an spezifischen Lipiden und Kohlehydraten (Klein et al., 1998; Appel et al., 1999; Dumpitak et al., 2005).

### 1.2.2 Unterschiede zwischen PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> und Konversionsmodelle

PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> besitzen zwar die gleiche Aminosäure (AS)-Sequenz und gleiche posttranslationelle Modifikationen, unterscheiden sich aber grundlegend in biophysikalischen und biochemischen Eigenschaften wie ihrer Löslichkeit, Stabilität und Struktur. Während PrP<sup>C</sup> hauptsächlich in  $\alpha$ -helikaler Struktur vorliegt, Proteinase K (PK)-sensitiv und in nicht-ionischen Detergentien löslich ist, weist die krankheitsassoziierte, infektiöse Form PrP<sup>Sc</sup> einen hohen Anteil an  $\beta$ -Faltblattstrukturen auf und zeigt die Tendenz unlösliche, PK-resistente Aggregate zu bilden (Caughey und Raymond, 1991; Gasset et al., 1993; Pan et al., 1993). Die Unterschiede in ihrer Sekundärstruktur geben Anlass zur Annahme, dass die pathogene Isoform PrP<sup>Sc</sup> ein posttranslationell gebildetes Konformationsisomer von PrP<sup>C</sup> darstellt und durch Konversion aus der zellulären Isoform entsteht. Es wird vermutet, dass die Konversion von PrP<sup>Sc</sup> aus PrP<sup>C</sup> an der Zelloberfläche oder in endosomalen Kompartimenten stattfindet (Caughey und Raymond, 1991; Borchelt et al., 1992; Taraboulos et al., 1995). Der exakte Mechanismus dieser Umwandlung ist bisher noch nicht bekannt, es gibt jedoch verschiedene Erklärungsmodelle. Das Heterodimer-Modell, das von einer direkten Interaktion der beiden Konformationsisomere während der Umwandlung ausgeht (Prusiner et al., 1990), besagt, dass je ein PrP<sup>Sc</sup>-Molekül ein PrP<sup>C</sup>-Molekül bindet und umformt (Abb. 4). Eine Aggregation der pathologischen Isoform ist dafür unnötig (Prusiner, 1991). Dagegen wird beim Nukleationskeim-Modell (engl. *seeding model*) ein Kristallisationskeim benötigt und es wird vermutet, dass PrP<sup>Sc</sup>-Aggregate bestimmter Mindestgröße diesen Keim darstellen und es ohne sie zu keiner Konversion kommen kann (Jarrett und Lansbury, 1993).



**Abb. 4. Hetero-Dimermodell der Konversion.** In einer autokatalytischen Reaktion mittels Bildung eines Heterodimers wird durch direkten Kontakt zwischen PrP<sup>c</sup> und PrP<sup>Sc</sup> jeweils ein PrP<sup>c</sup>-Molekül in ein PrP<sup>Sc</sup>-Molekül umgefaltet. Mehrere PrP<sup>Sc</sup>-Moleküle gemeinsam mit einem geringen Anteil an Lipiden und Polysacchariden bilden die infektiöse Einheit (Prion).

Vor einigen Jahren konnten erstmals aus rekombinantem PrP *in vitro* infektiöse Prionen hergestellt werden, die nach intrazerebraler Inokulation zu histopathologischen und neurologischen Veränderungen, zur Propagierung von PK-resistentem PrP<sup>Sc</sup> im Gehirn und schließlich zum Tod der Tiere führten. Es konnten jedoch nur transgene Mäuse mit den synthetischen Prionen infiziert werden, die eine verkürzte PrP-Form (PrP<sup>89-231</sup>) stark überexprimieren (Legname et al., 2004). Auch mit der Methode der sogenannten PMCA (engl. *protein misfolding cyclic amplification*) konnten infektiöse Prionen *in vitro* generiert werden (Saborio et al., 2001). In mehreren Zyklen wurde hierbei aus einer geringen Menge an Hamster-PrP<sup>Sc</sup>, welches als Matrize diente, PrP<sup>c</sup> aus Gehirnhomogenat in PK-resistentes PrP<sup>Sc</sup> konvertiert. Der dabei amplifizierte Aggregationskeim wurde durch Ultraschallbehandlung immer wieder aufgelöst, um PrP<sup>Sc</sup> für eine erneute Umfaltung freizusetzen. Entstandene infektiöse Prionen konnten auf Mäuse übertragen und weiter propagiert werden. Bei der PMCA mit Gehirnhomogenaten kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass für die *in vitro* Konversion zelluläre Faktoren essentiell sind, die in dem Ausgangshomogenat vorhanden sind.

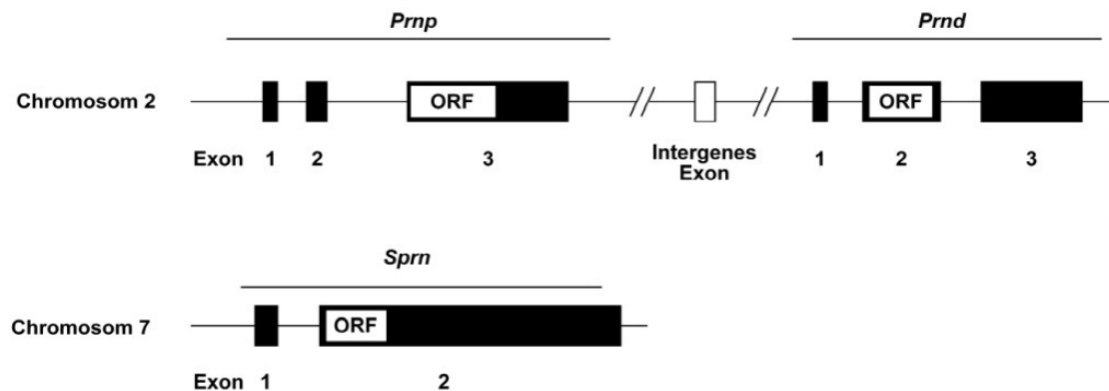
### 1.2.3 PrP- und PrP-ähnliche Gene

Die Gene, die humanes, Maus- oder Hamster-PrP kodieren, wurden 1985/86 kloniert (Oesch et al., 1985; Lochter et al., 1986; Liao et al., 1986; Kretzschmar et al., 1986; Basler et al., 1986). Das PrP-Gen wurde im Mensch auf dem Chromosom 20 (Sparkes et al., 1986) und in der Maus auf dem Chromosom 2 gefunden. Wie humanes *PRNP* besteht auch das Maus-*Prnp* aus drei Exons, wobei sich der gesamte offene Leserahmen im Exon 3 befindet. Es kodiert PrP mit 255 Aminosäuren (AS) (Abb. 5; Oesch et al., 1985; Westaway et al., 1994), das ab dem frühen Embryonalstadium in fast allen Geweben exprimiert wird. Die höchste Expression findet sich in den Neuronen des Zentralnervensystems (ZNS) (Kretzschmar et

al., 1986), aber auch im lymphatischen Gewebe und im Muskel wird PrP in größeren Mengen exprimiert (Bendheim et al., 1992).

Neben PrP wurden noch zwei Paraloge gefunden. Das erste wurde eher indirekt entdeckt, als einige Stämme der PrP *knockout* Mäuse phänotypische Anomalitäten wie späten Ausbruch von Ataxie oder Verlust der Purkinjen Zellen im Zerebellum aufwiesen, während andere dies nicht taten (Sakaguchi et al., 1996; Moore et al., 1999; Rossi et al., 2001). Nach genauer Analyse zeigte sich, dass in einigen transgenen Vektoren der *Prnp*-Lokus zufällig derart deletiert wurde, dass ein anderes Gen 16 Kilobasen abwärts von *Prnp* unter die Kontrolle des *Prnp*-Promoters gestellt und somit im ZNS exprimiert wurde, was zu dem oben genannten neurodegenerativen Phänotyp führte. Das zu diesem Gen (*Prnd*) gehörige Protein wurde Doppel (Dpl) genannt. Der offene Leserahmen liegt wie PrP auf einem Exon und kodiert ein Protein mit 179 AS (Abb. 5). Dpl wird im Gegensatz zu PrP nur in geringem Maße und hauptsächlich während der Embryonalentwicklung im ZNS exprimiert (Moore et al., 1999). Vorwiegend kommt es im Hoden vor, weshalb seine Funktion eng mit der Reproduktivität zusammenzuhängen scheint. Um die physiologische Funktion von Dpl zu untersuchen, wurden homozygote Dpl *knockout* Mäuse generiert. Das Fehlen des Proteins verursachte männliche Sterilität. Als Ursachen konnte eine verminderte Anzahl und Immobilität sowie Missbildung der Spermatozoen festgestellt werden (Behrens und Aguzzi, 2002, Paisley et al., 2004). Über welche Mechanismen die Überexpression von Dpl im ZNS Neurodegeneration induziert, ist bisher allerdings noch nicht geklärt.

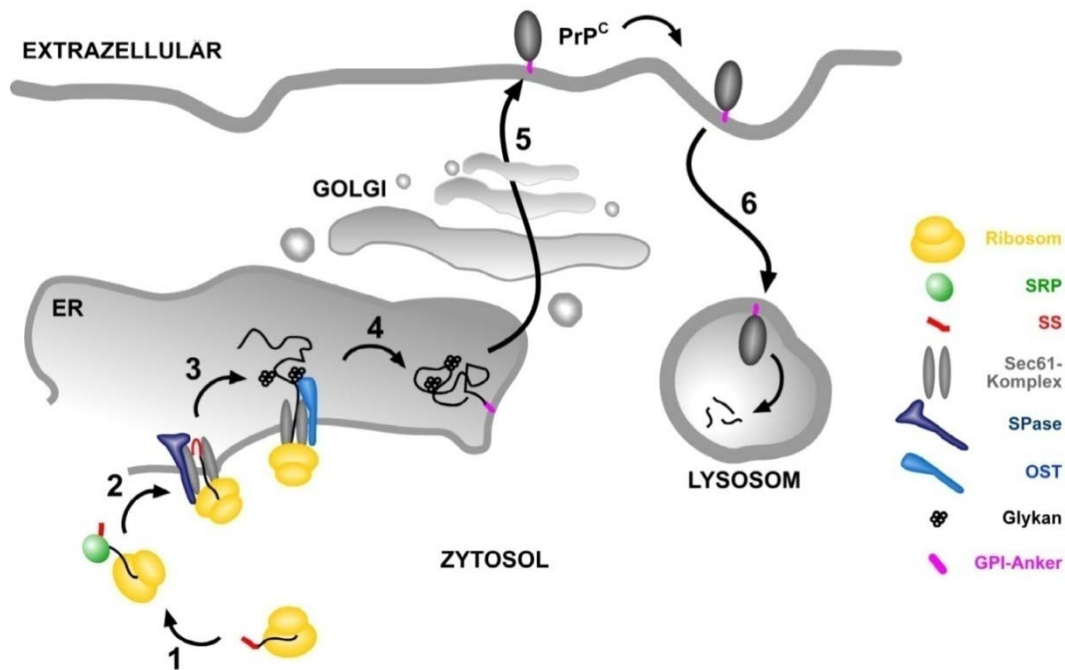
Das dritte PrP-ähnliche Gen wurde erst kürzlich durch Datenbank-Analysen über eine kurze, aber stark homologe DNA-Sequenz zu PrP entdeckt. Es handelt sich hierbei um das *Sprn*-Gen, welches auf dem Maus-Chromosom 7 lokalisiert liegt und das 148 AS lange Protein Shadoo (japanisch für Schatten) kodiert. Wie *Prnp* und *Prnd* liegt der offene Leserahmen auf einem Exon (Abb. 5) und wie PrP wird Shadoo (Sho) hauptsächlich im ZNS exprimiert (Premzl et al., 2003). Da es sich um ein erst kürzlich gefundenes Protein handelt, ist über seine physiologische Funktion noch relativ wenig bekannt. Es wird aber vermutet, dass es, ähnlich zu PrP, eine neuroprotektive Funktion in der Zelle haben könnte (vgl. Abschnitt 1.3.2). Die Expression der beiden Proteine überlappt sich, doch interessanterweise ist Sho im Gehirn genau dort am höchsten exprimiert, wo PrP die geringste oder keine Expression zeigt, in Purkinjen Zellen im Zerebellum und in den dendritischen Ausläufern der hippocampalen pyramidalen Zellen (Watts und Westaway, 2007, Watts et al., 2007).



**Abb. 5. Schematische Darstellung der murinen Gene, die die Proteine PrP, Dpl und Sho kodieren.** *Prnp* und *Prnd* sind auf Chromosom 2 der Maus lokalisiert während *Sprn* auf Chromosom 7 zu finden ist. Der offene Leserahmen aller drei Gene liegt auf einem Exon. Abbildung modifiziert aus (Watts und Westaway, 2007).

#### 1.2.4 Biogenese und zelluläre Lokalisierung von PrP

PrP zählt zu den sekretorischen Proteinen (allgemeine Beschreibung der Biogenese sekretorischer Proteine vgl. Abschnitt 1.5). Die Biogenese beginnt mit der Synthese eines 255 AS langen Vorläuferproteins, das eine hydrophobe, N-terminale Erkennungssequenz aufweist. Diese 22 AS lange ER-Signalsequenz (ER-SS) wird während des kotranslationalen Imports in das endoplasmatische Retikulum (ER) von der sogenannten Signalpeptidase (SPase) abgespalten. An den Positionen N180 und N196 werden unterdessen Kernglykane mit dem Protein verknüpft (Endo et al., 1989; Haraguchi et al., 1989; Rudd et al., 1999; Stimson et al., 1999). Nachdem PrP vollständig ins ER transloziert ist, wird die C-terminale, hydrophobe, 23 AS lange Erkennungssequenz abgespalten und durch einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker ersetzt (Stahl et al., 1987; Stimson et al., 1999). Bei dem auf diese Weise modifizierten Protein bildet sich zwischen den AS C178 und C213 eine Disulfidbrücke. In Folge wird PrP weiter in den Golgi-Apparat transportiert, wo die Kernglykane zu komplexen Glykanen umgewandelt werden. Schließlich wird PrP in Vesikeln zur Zelloberfläche transportiert, wo es, bedingt durch den GPI-Anker, in Detergens-resistenten Membranen (DRM, *lipid rafts*) zu finden ist (Harmey et al., 1995). An der Außenseite der Plasmamembran lokalisiertes PrP wird über Clathrin-vermittelte Endozytose oder über kaveoläre Strukturen internalisiert und kann dann entweder lysosomal abgebaut oder wieder an die Zelloberfläche rezykliert werden (Abb. 6; Shyng et al., 1994; Peters et al., 2003; Sunyach et al., 2003).



**Abb 6. Biogenese von PrP.** (1) PrP wird an freien Ribosomen im Zytosol gebildet. Das Signalerkennungspartikel (SRP) bindet an die N-terminale Signalsequenz (SS) und führt die naszierende Polypeptidkette zum Sec61-Komplex (Translokon). (2) PrP wird kotranslational in das endoplasmatische Retikulum (ER) importiert. Während des Imports wird die SS durch die Signalpeptidase (SPase) abgespalten. (3) Die Oligosaccharyltransferase (OST) verknüpft zwei Kernglykane mit der naszierenden Peptidkette. (4) Im ER erfolgt die Faltung von PrP unter Ausbildung einer Disulfidbrücke. Des Weiteren wird die C-terminale Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Ankersequenz durch einen GPI-Anker ersetzt und PrP damit in der Membran verankert. (5) Im Golgi-Apparat werden die Kernglykane in komplexe Glykane umgewandelt und über vesikulären Transport gelangt PrP zur Zelloberfläche, wo es in Detergens-resistenten Membranen an der Außenseite der Plasmamembran lokalisiert ist. (6) PrP kann internalisiert und entweder im Lysosom abgebaut oder wieder zurück zur Zelloberfläche transportiert werden.

### 1.2.5 Struktur von PrP

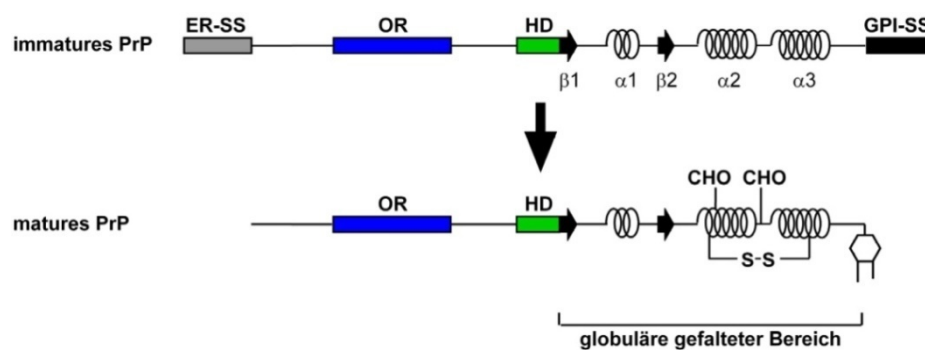
Die dreidimensionale Struktur von rekombinant in *E.coli* hergestelltem und aufgereinigtem PrP (AS 23-231) wurde von der Gruppe um Kurt Wüthrich mittels NMR aufgeklärt (Riek et al., 1996; Riek et al., 1997). Es wurde gezeigt, dass PrP eine selbstständig faltende, globuläre C-terminale Domäne (AS 121-231, Abb. 7) und eine unter den für die NMR-Analyse bestehenden Bedingungen unstrukturierte, nicht faltende N-terminale Domäne (AS 23-120) besitzt. Die globuläre Domäne umfasst zwei antiparallele  $\beta$ -Stränge, die ein kurzes  $\beta$ -Faltblatt ausbilden und drei  $\alpha$ -Helices. Helix 1 wird durch die beiden  $\beta$ -Stränge eingeschlossen, während Helix 2 und 3 durch die Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Die AS-Ketten der  $\alpha$ -Helices 2 und 3 und die des  $\beta$ -Faltblatts bilden zusammen den stabilen hydrophoben Kern von PrP (Riek et al., 1998). Im Gegensatz zu PrP<sup>c</sup> konnte bis

heute die Struktur von PrP<sup>Sc</sup>, unter anderem wegen seiner hohen Unlöslichkeit, nicht geklärt werden.



**Abb 7. NMR-Struktur von murinem PrP.** Gezeigt ist die globulär gefaltete C-terminale Domäne (AS 121-231) mit zwei antiparallelen  $\beta$ -Strängen (grün) und drei  $\alpha$ -Helices (violett). Abbildung aus (Riek et al., 1996).

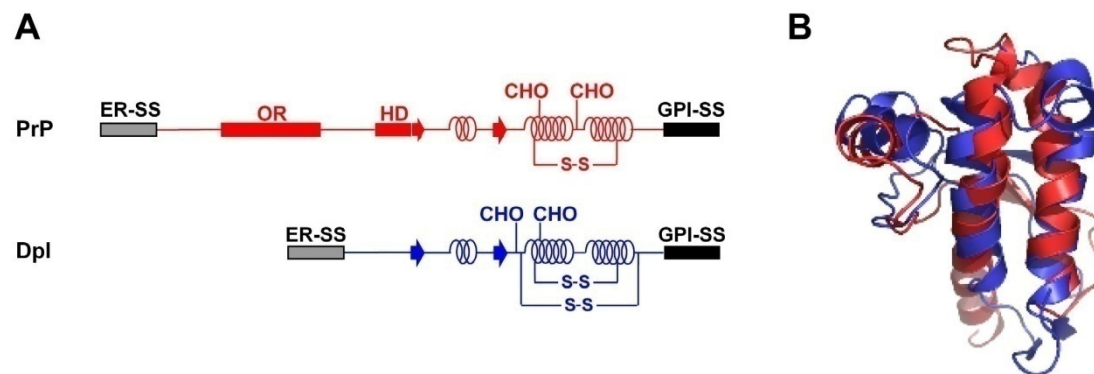
Ein weiteres strukturelles Charakteristikum ist die Oktarepeat (OR)-Region (engl. *repeat*, Wiederholung) am N-Terminus von PrP, welche die AS-Sequenz PHGGGWGQ fünfmalig wiederholt umfasst. Diese Domäne kann an den Histidin-Aminosäureresten Kupfer-Ionen binden (siehe Abschnitt 1.3.4). Daneben weist PrP noch eine hydrophobe Domäne (HD), die die AS 112-128 miteinschließt, auf (Abb. 8).



**Abb. 8. Schematische Darstellung des Vorläuferproteins und der murenen Form von PrP.** Gezeigt sind die strukturellen Domänen und posttranslationale Modifikationen von PrP. **(A)** Vorläuferprotein mit N- und C-terminaler Signalsequenzen für ER-Import (grau) und GPI-Verankerung (schwarz) sowie die Oktarepeat-Region (OR, blau) und die hydrophobe Domäne (HD, grün). **(B)** In der murenen Form von PrP findet sich ein N-terminaler ungefalteter Bereich (AS 23-120) und ein C-terminaler, globulär gefalteter Bereich (AS 121-231), der zwei  $\beta$ -Stränge ( $\beta 1$  und  $\beta 2$ ) und drei  $\alpha$ -Helices ( $\alpha 1$ -3) besitzt. PrP wird außerdem durch komplexe Glykane (CHO), eine Disulfidbrücke (S-S) und einen GPI-Anker modifiziert.



Eine Analyse des paralogen Proteins Dpl, dem verglichen mit PrP fast der gesamte N-terminale Bereich und somit die Repeat-Region und die HD fehlt, ergab, dass die allgemeine Sequenzhomologie ziemlich gering ist. Interessanterweise ist jedoch die NMR-Struktur der globulär gefalteten C-terminalen Domäne nahezu identisch mit PrP (Abb. 9) (Luhrs et al., 2003; Colacino et al., 2006).



**Abb. 9. Vergleich der Domänen und Strukturen zwischen PrP und Dpl.** (A) Schematische Darstellung der Protein-Domänen in PrP und Dpl. Gezeigt sind die strukturellen Domänen und posttranslationale Modifikationen (Beschriftungen und Abkürzungen siehe Abb. 8) (B) Dreidimensionales Modell der Strukturen von PrP (rot) und Dpl (blau). Abbildung aus (Colacino et al., 2006).

### 1.2.6 PrP und verwandte Proteine im Zebrafärbling (*Danio rerio*)

PrP ist ein hoch konserviertes Protein. Es wurde in verschiedenen Spezies, von höheren Säugetieren über Vögel und Reptilien bis hin zu Amphibien, gefunden. Ein Vergleich der AS-Sequenzen zeigt eine Homologie von über 90% zwischen Mensch (*Homo sapiens*), Maus (*Mus musculus*) und Rind (*Bos taurus*). Huhn (*Gallus gallus*), Schildkröte (*Trachemys scripta*) und Frosch (*Xenopus laevis*) teilen sich immerhin noch circa 30% ihrer AS mit humanem PrP (Schatzl et al., 1995; Wopfner et al., 1999, Gabriel et al., 1992; Harris et al., 1991; Simonic et al., 2000; Strumbo et al., 2001). Die grundsätzliche Anordnung der strukturellen Domänen und posttranslationalen Modifikationen wie der Disulfidbrücke und der N-verknüpften Glykosylierungsseiten, ist in diesen Organismen in etwa gleich. Die HD ist die am stärksten konservierte Domäne, während die N-terminale Repeat-Region bezüglich ihrer Länge und Wiederholungssequenz von Spezies zu Spezies stark variieren kann. Auch die dreidimensionale Struktur von PrP ist vom Menschen bis hin zu den Amphibien hoch konserviert (Lopez Garcia et al., 2000; Wuthrich und Riek, 2001; Lysek et al., 2005). So weist PrP aus *Xenopus laevis* zwar nur mehr eine geringe Sequenzhomologie zum

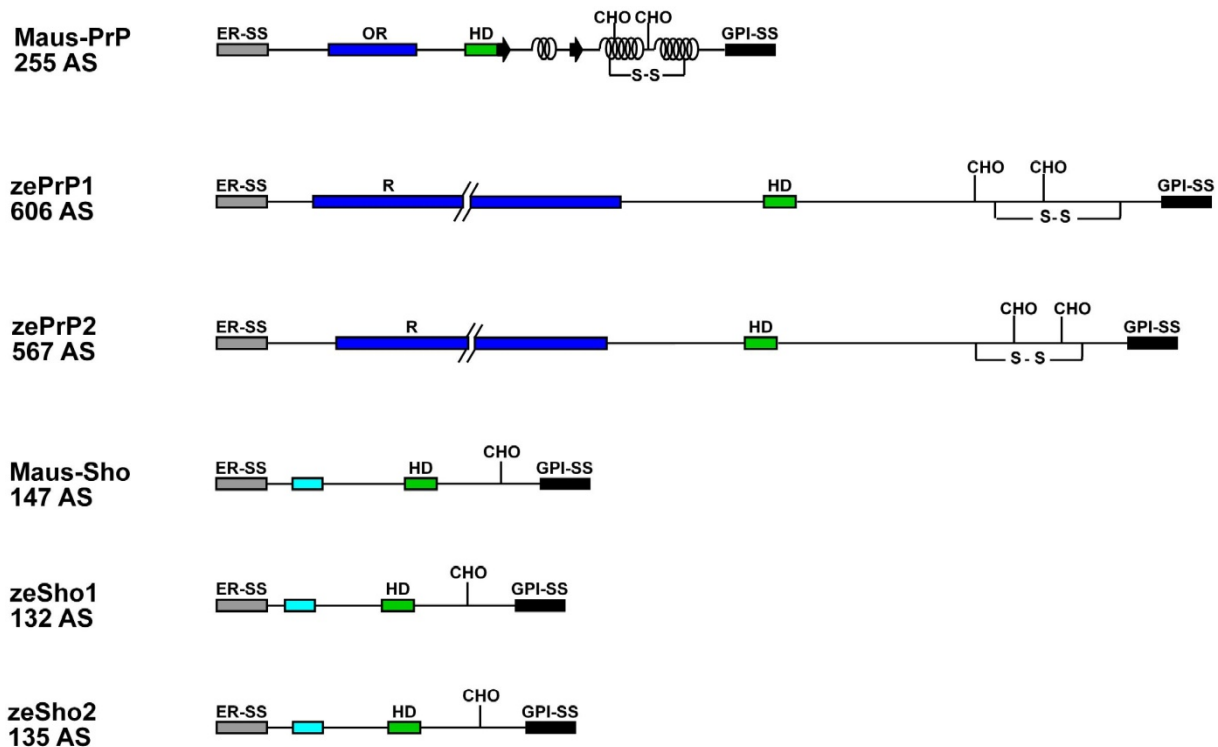
---

Säugetier-PrP auf, die NMR-Struktur ist dennoch außergewöhnlich ähnlich (Calzolari et al., 2005).

Vor einigen Jahren wurden auch in verschiedenen Fischarten homologe Proteine zu PrP gefunden (Gibbs und Bolis, 1997; Suzuki et al., 2002; Oidtmann et al., 2003; Rivera-Milla et al., 2003; Favre-Krey et al., 2007). Die Identifikation der neu entdeckten Proteine erfolgte über die hoch konservierte Sequenz der HD, die nahezu identisch zu der von humanem PrP ist. Im Zebrafisch (*Danio rerio*, engl. *zebrafish*), der zu den Knochenfischen zählt, wurde die cDNA zweier, möglicherweise duplizierter, langer Isoformen gefunden. Im Folgenden werden diese beiden Formen Zebrafisch PrP 1 und 2 (zePrP1 und zePrP2) genannt. Die AS-Sequenzhomologie zu humanem PrP beträgt weniger als 25%. Dennoch scheint eine gewisse Ähnlichkeit im Aufbau der Proteinmotive vorhanden zu sein. ZePrP1 und zePrP2 beinhalten laut Sequenzanalysen eine N-terminale Repeat-Region und eine HD. Eine putative ER- und GPI-SS, eine Disulfidbrücke und Glykosylierungsmotive wurden ebenfalls anhand bioinformatischer Programme vorhergesagt. Verglichen mit Säugetier-PrP fällt jedoch ihre Länge mit 606 beziehungsweise 567 AS auf, die unter anderem auf die deutlich längere Repeat-Region zurückzuführen ist. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass zePrP1 und zePrP2 während des Embryonalstadiums des Zebrafisches im ZNS exprimiert werden (Cotto et al., 2005, Abb. 10).

Zusätzlich wurden auch hoch konservierte Homologe zu Säugetier-Sho in verschiedenen Fischarten gefunden. Analog zu PrP ist auch bei dem Protein Sho eine Sequenzhomologie von circa 90% zwischen den Säugetier-Spezies zu finden (Uboldi et al., 2006). Wie auch bei anderen Fischarten hat der Zebrafisch durch Gen-Duplikation zwei Isoformen dieses Proteins, die im Folgenden zeSho1 und zeSho2 genannt werden. Sie haben, verglichen mit humanem PrP, eine nur sehr geringe Sequenzhomologie, sind viel kürzer (132 und 135 AS) und die Repeat-Region beinhaltet nur wenige, kurze, basische Repeats. Trotzdem wurde mittels bioinformatischer Programme eine ER- und GPI-SS und eine mögliche Glykosylierungsstelle vorhergesagt (Premzl et al., 2003; Premzl et al., 2004; Abb. 10).

Schließlich wurde noch ein drittes Protein in Fischen identifiziert, welches im Bereich der HD eine starke Sequenzhomologie zu PrP aufweist. Demzufolge wurde es PrP3 genannt, doch abgesehen von dieser Homologie und der vorhergesagten putativen ER- und GPI-SS zeigt dieses Protein keine weiteren Ähnlichkeiten zu PrP oder Sho. Im Gegensatz zu den anderen PrP- und Sho-Isoformen in Fischen, konnte überdies keine Expression im ZNS detektiert werden (Cotto et al., 2005).



**Abb. 10. Schematische Darstellung der im Zebrafisch gefundenen PrP-Formen im Vergleich zu Maus-PrP.** Eingezeichnet sind die OR-Region in Maus-PrP beziehungsweise die längeren Repeat-Regionen (R) in zePrP1 und zePrP2 (blau) sowie die davon abweichenden sehr kurzen basischen Repeat-Regionen in den Sho-Proteinen (türkis). Allen Proteinen gemeinsam ist die stark konservierte HD (grün), die ER-SS (grau), die GPI-SS (schwarz) und zumindest eine mögliche Glykosylierungsstelle (CHO).

Interessanterweise konnten für die lange PrP-Isoform aus dem Kugelfisch (*Fugu rubripes*), die große Sequenzhomologie mit den Zebrabärbling-Isoformen zePrP1 und zePrP2 aufweist, keine NMR-Daten generiert werden. Obwohl das untersuchte Fisch-PrP exprimiert werden konnte, wurde keine dreidimensionale Struktur gefunden. Da analoge Faltungsbedingungen zu den bisher aufgeklärten PrP-Strukturen verwendet wurden, kann vermutet werden, dass die langen Fisch-PrP Isoformen trotz der ähnlichen Proteinmotive keine oder eine von den anderen Spezies stark abweichende C-terminale Struktur aufweisen (Christen et al., 2008).

## 1.3 Funktion von PrP

### 1.3.1 PrP *knockout* Mäuse

Wie im vorigen Abschnitt erwähnt, zeigt PrP von Säugetieren bis hin zu Amphibien große Ähnlichkeiten in der Anordnung der Proteindomänen, der posttranslationalen Modifikationen

und in der dreidimensionalen Struktur. Aufgrund dieser Tatsache lässt sich eine konservierte physiologische Funktion von PrP vermuten. Bislang ist diese Funktion jedoch noch weitgehend unbekannt. Die Analyse von PrP-defizienten Mäusen (*Prnp*<sup>0/0</sup>- oder *knockout* Mäusen) ergab, dass sich diese normal entwickeln und keine signifikanten Verhaltensanomalitäten zeigen (Büeler et al., 1992; Manson et al., 1994). Als phänotypische Erscheinungsbilder konnten lediglich eine geringe Veränderung im Schlaf-Wach-Rhythmus, Anomalitäten in der synaptischen Physiologie und bei elektrophysiologischen Parametern sowie leichte Störungen in der Myelinisierung festgestellt werden (Collinge et al., 1994; Tobler et al., 1996; Vassallo und Herms, 2003). Eine erst kürzlich durchgeführte Studie zeigte, dass PrP-defiziente Mäuse etwas weniger mobil sind, aber ein größeres Angstverhalten aufweisen als PrP-exprimierende Kontrollmäuse. Die beobachteten Phänotypen sind aber als sehr mild anzusehen (Lobao-Soares et al., 2007; Lobao-Soares et al., 2008). Das Fehlen eines klaren Phänotyps in PrP-defizienten Mäusen könnte bedeuten, dass die Funktion von PrP entweder nicht essentiell ist oder aber von so großer Wichtigkeit, dass die Zelle kompensatorische Mechanismen entwickelt hat, um den Verlust auszugleichen.

Um auszuschließen, dass *Prnp*<sup>0/0</sup>-Mäuse bereits in der Embryogenese Kompensationsmechanismen entwickeln, um dem Mangel an PrP entgegenzuwirken, wurden sogenannte konditionale PrP *knockout* Mäuse generiert, in denen die PrP-Expression erst im postnatalen Stadium ausgeschaltet wurde. Lediglich eine Reduktion der Nachhyperpolarisationsströme in hippocampalen Zellen, die auf eine Rolle in der Regulation neuronaler Signalübertragungen hinweisen könnte, wurde gefunden. Dieses Mausmodell zeigte jedoch, dass PrP auch im adulten Tier nicht essentiell zu sein scheint, denn abgesehen von dem erwähnten Phänotyp entwickelten und verhielten sich die Mäuse normal (Mallucci et al., 2002; Mallucci et al., 2003).

### 1.3.2 Neuroprotektivität von PrP

Nachdem PrP-defiziente Mäuse unter physiologischen Bedingungen keinen oder nur einen milden Phänotyp erkennen ließen, versuchte man die äußeren Bedingungen zu verändern und setzte die Mäuse unter Stress. Überraschenderweise konnte in Ischämie-Modellen eine erhöhte Vulnerabilität von PrP *knockout* Mäusen festgestellt werden (Shyu et al., 2002; McLennan et al., 2004; Weise et al., 2004; Shyu et al., 2005; Spudich et al., 2005; Mitteregger et al., 2007). Einerseits konnten erhöhte PrP<sup>C</sup>-Levels in geschädigten Hirnarealen detektiert werden (Weise et al., 2004; Shyu et al., 2005). Andererseits war die nach Ischämie beobachtete Infarkt-Größe in den Gehirnen PrP-defizienter Mäuse signifikant größer als in Kontrollmäusen (McLennan et al., 2004; Weise et al., 2006). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die Infarkt-Größe durch Überexpression von PrP reduziert werden

konnte und dass dabei die OR-Region von PrP für die Vermittlung der Neuroprotektivität notwendig ist (Shyu et al., 2005; Mitteregger et al., 2007). Schließlich konnte auch unter anderen Stressbedingungen, beispielsweise unter exzitatorischem Stress, eine erhöhte Vulnerabilität PrP-defizienter Neuronen beobachtet werden, die durch die Überexpression von PrP wieder gesenkt werden konnte (Milhavet und Lehmann, 2002; Haigh und Brown, 2006; Rangel et al., 2007). Gemeinsam lassen diese Ergebnisse auf eine neuroprotektive Funktion von PrP schließen.

Einen weiteren Hinweis auf eine zytoprotektive Aktivität von PrP lieferten transgene Mäuse, in denen N-terminal deletierte Formen von PrP auf *Prnp*<sup>0/0</sup>-Hintergrund exprimiert wurden (Shmerling et al., 1998). Die Überexpression von PrP $\Delta$ 23-121 und PrP $\Delta$ 32-134 führte in diesen Mäusen zu einer progressiven Neurodegeneration, die jedoch durch Expression bereits einer Kopie des Wildtyp PrP-Gens wieder verhindert werden konnte. In zwei erst kürzlich publizierten Studien konnte der toxische Bereich auf die AS 105-125 beziehungsweise 94-134 eingeschränkt werden. Die Expression der Mutanten PrP $\Delta$ 105-125 und PrP $\Delta$ 94-134 führte ebenfalls zu einem starken neurodegenerativen Phänotyp. Doch auch in diesen Studien war die Expression bereits einer der beiden Kopien des Wildtyp PrP-Gens ausreichend, um den Phänotyp zu verhindern (Baumann et al., 2007; Li et al., 2007). Interessanterweise konnte auch gezeigt werden, dass die Expression von PrP die bereits erwähnte Dpl-induzierte Neurodegeneration hemmen kann (vgl. Abschnitt 1.2.3; Moore et al., 1999).

### 1.3.3 Rolle von PrP in der Signaltransduktion

Da PrP ein GPI-verankertes Zelloberflächenprotein und in Detergens-resistenten Membrandomänen (DRM) zu finden ist, wurde weiter vermutet, dass es eine Rolle in der Signaltransduktion spielt. So konnte eine Aktivierung der Tyrosin-Kinase Fyn und in Folge eine Phosphorylierung der Kinase Erk1/2 nach induzierter Dimerisierung von PrP beobachtet werden (Mouillet-Richard et al., 2000; Schneider et al., 2003; Toni et al., 2006). Um Signale ins Zellinnere zu leiten, würde extrazellulär lokalisiertes PrP einen transmembranären Interaktionspartner benötigen. Nach diesem Partner wird noch immer intensiv gesucht. Bisher wurden unter anderem der 37 kDa/67 kDa Laminin-Rezeptor (Rieger et al., 1997; Graner et al., 2000; Gauczynski et al., 2001), ein unbekanntes 66 kDa Membranprotein (Martins et al., 1997) und das transmembran vorliegende Stress-induzierbare Protein 1 (STI 1) als Interaktionspartner von PrP vorgeschlagen (Zanata et al., 2002). Für STI 1 konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass eine Wechselwirkung mit PrP Neuronen vor Anisomycin-induziertem Zelltod schützt. Die physiologische Relevanz der hier genannten Interaktionen sowie vieler weiterer gefundenen Wechselbeziehungen muss in Zukunft jedoch noch geklärt werden. In erst kürzlich publizierten Studien konnte gezeigt werden, dass PrP

seine neuroprotektive Funktion über die Modulation des *N*-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptors (NMDAR), einem ionotropen Glutamaterezeptor (Villmann und Becker, 2007) ausübt. Die erhöhte Anfälligkeit gegenüber neuronaler Schädigung durch exzitatorischen Stress in PrP-defizienten Mäusen konnte durch die Verwendung von NMDAR-Blockern reduziert werden (Rangel et al., 2007). In PrP<sup>0/0</sup>-Neuronen wurden darüber hinaus eine gesteigerte Aktivität der NMDAR sowie erhöhte Apoptoseraten nach transientser Inkubation mit NMDA beobachtet, die durch Überexpression von PrP verhindert werden konnten (Khosravani et al., 2008).

#### 1.3.4 Kupferbindung von PrP

PrP besitzt in der N-terminalen OR-Region mehrere Histidin-Reste. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte gezeigt werden, dass diese Histidin-Reste selektiv und kooperativ vier Kupferionen komplexieren können (Brown et al., 1997a; Stöckel et al., 1998; Viles et al., 1999). Des Weiteren ergaben Studien, dass eine Bindung von Kupfer eine Konformationsänderung in der OR-Region auslöst und dadurch Endozytose von PrP induzieren kann (Pauly und Harris, 1998; Quaglio et al., 2001; Sumudhu et al., 2001). Diese Daten führten zu der Vermutung, dass PrP eine Funktion in der Kupferhomöostase spielen könnte. Es wurde gezeigt, dass PrP an präsynaptischen Membranen lokalisiert ist (Fournier et al., 1995, Herms et al., 1999) und dass in PrP-defizienten Mäusen eine signifikante Reduktion der synaptosomalen Kupferkonzentration auftritt (Collinge et al., 1994; Manson et al., 1995). Dies könnte darauf hindeuten, dass PrP eine Funktion in der Wiederaufnahme der freigesetzten Kupferionen in die präsynaptische Zelle hat und damit die Kupferkonzentration des synaptischen Spalts reguliert. Kupfer wurde auch als Kofaktor für eine putative enzymatische Aktivität von PrP, möglicherweise als Superoxid-Dismutase (SOD), diskutiert (Brown et al., 1999; Hutter et al., 2003). In *Prnp*<sup>0/0</sup>-Mäusen wurde eine verminderte SOD-Aktivität gefunden (Brown et al., 1997b). Ebenfalls wird vermutet, dass PrP eine Rolle in der Kupferbeladung der SOD spielen könnte (Brown et al., 1997b; Waggoner et al., 2000; Hutter et al., 2003). Gegen diese Annahmen spricht jedoch, dass PrP im Vergleich zu anderen kupferabhängigen Enzymen eine relativ geringe Affinität zu Kupfer aufweist (Garnett und Viles, 2003).

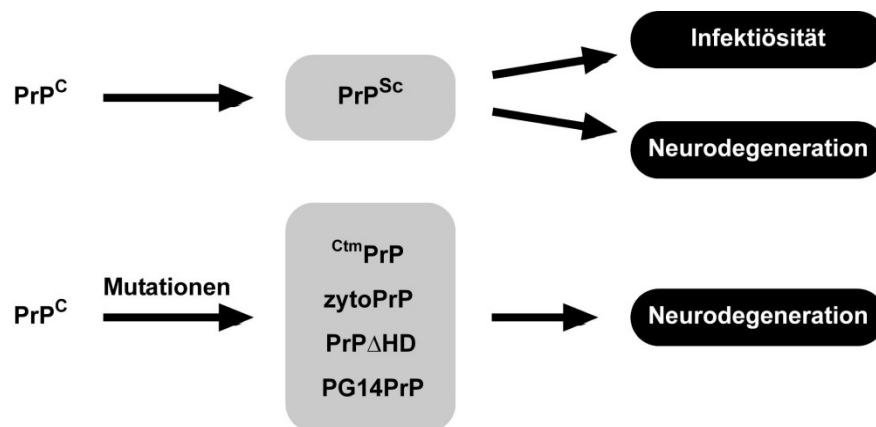
## 1.4 Missfaltung von PrP und Neurodegeneration

Anhand verschiedener Mausmodelle konnte gezeigt werden, dass die Expression von zellulärem PrP ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) notwendig für die Entstehung von Prion-Erkrankungen ist. PrP-defiziente Mäuse können keine infektiösen Prionen replizieren und zeigen keine Neurodegeneration (Büeler et al., 1993). Der genaue Mechanismus, der zur Neurodegeneration führt, ist noch weitgehend unbekannt. Wie bereits erwähnt wurde, gibt es sporadische, infektiöse und vererbare Prion-Erkrankungen. Ein gemeinsames Charakteristikum dieser verschiedenen Krankheiten ist das Auftreten einer aberrant gefalteten Form von PrP, weshalb vermutet wird, dass die Missfaltung von PrP eine zentrale Rolle in der Pathogenese einnimmt (Abb. 11).



**Abb. 11. Prion-Erkrankungen zeichnen sich durch missgefaltete PrP-Konformere aus.** Den drei Formen von Prion-Erkrankungen (sporadisch, vererbbar und infektiös) liegt eine fehlgefaltete PrP-Konformation zugrunde. Diese kann entweder spontan, durch Mutation im *Prnp* oder durch Infektion mit  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  entstehen. In Folge führt die Missfaltung von PrP zu Infektiösität und/oder Neurodegeneration.

Die Mehrheit der Prion-Erkrankungen zeichnet sich neben einer äußerst progressiven Neurodegeneration durch die Bildung von PK-resistentem  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ , das sich in Form von Plaques im Gehirn ablagert, und durch infektiöse Prionen aus (vgl. Abschnitt 1.2.1). Über einen langen Zeitraum wurde angenommen, dass das missgefaltete Konformer  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  sowohl für die Infektiösität als auch die Neurodegeneration verantwortlich ist. Mittlerweile geht man aber davon aus, dass es sich bei  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  zwar um das infektiöse Agens, nicht aber um das toxische handelt. Diese Annahme beruht auf den im folgenden Abschnitt näher beschriebenen Beobachtungen, dass einerseits  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  in Abwesenheit von neuronalem  $\text{PrP}^{\text{C}}$  nicht toxisch ist und andererseits neben  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  andere aberrant gefaltete PrP-Formen, die zu Neurodegeneration in Abwesenheit infektiöser Prionen führen, existieren (Abb. 12).



**Abb. 12. Neurodegeneration und Infektiösität sind voneinander trennbare Prozesse.** PrP<sup>Sc</sup>, das durch Konversion von PrP<sup>C</sup> entsteht, führt zur Neurodegeneration und Infektiösität. Durch Mutation entstehen aus PrP<sup>C</sup> verschiedene fehlgefaltete PrP-Mutanten, die ebenfalls Neurodegeneration auslösen, ohne jedoch dabei infektiöse Prionen zu bilden. Abbildung modifiziert aus (Winklhofer et al., 2008).

#### 1.4.1 PrP<sup>Sc</sup> führt nur in Anwesenheit von neuronal exprimiertem PrP<sup>C</sup> zur Neurodegeneration

Im Konsens mit der Prion-Theorie zeigen PrP *knockout* Mäuse vollständige Resistenz gegenüber Prion-Erkrankungen und können keine infektiösen Prionen replizieren (Büeler et al., 1993; Sailer et al., 1994). Dies konnte von zwei eleganten Studien gestützt werden. Brandner und Kollegen transplantierten Gehirnbereiche aus Wildtyp-Mäusen in die Gehirne PrP-defizienter Mäuse. Nach Infektion dieser Mäuse mit Prionen konnte eine deutliche räumliche Restriktion der neuropathologischen Veränderungen auf die transplantierten, PrP<sup>C</sup>-exprimierenden Regionen beobachtet werden (Brandner et al., 1996). Interessanterweise wurde die Viabilität PrP-defizienter Neuronen durch eine voranschreitende PrP<sup>Sc</sup>-Akkumulation nicht beeinträchtigt. Die zweite Studie zeigte, dass die Neurotoxizität nach Inokulation mit infektiösen Prionen von der neuronalen Expression von PrP<sup>C</sup> abhängig ist. Die Expression von PrP<sup>C</sup> in Gliazellen führte zu fortlaufender Replikation von PrP<sup>Sc</sup> und zur Bildung von infektiösen Prionen. Trotzdem konnte die Replikation von PrP<sup>Sc</sup> in Gliazellen keine Degeneration von PrP-defizienten Neuronen induzieren (Mallucci et al., 2003). Schließlich konnte demonstriert werden, dass transgene Mäuse, die PrP mit deletierter GPI-SS (PrP $\Delta$ GPI) überexprimieren, zwar infektiöse Prionen propagieren, wenn sie mit Prionen infiziert wurden, dies aber keine pathogenen Auswirkungen zu haben scheint (Chesebro et al., 2005). Gemeinsam deuten diese Studien darauf hin, dass PrP<sup>Sc</sup> *per se* nicht toxisch ist.

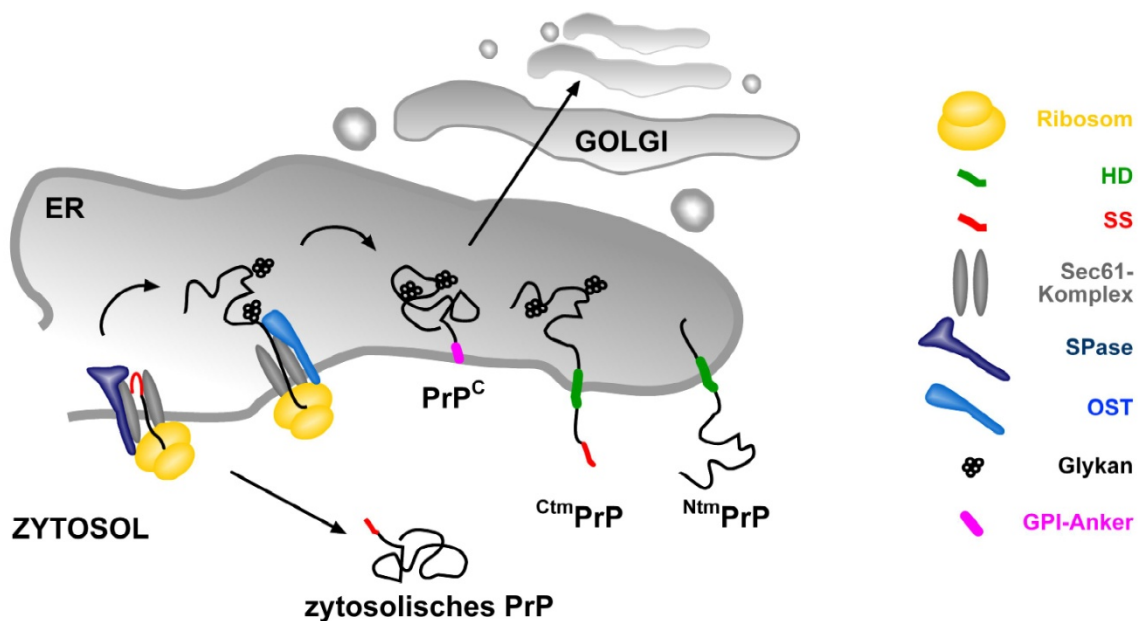


### 1.4.2 PrP-Mutanten führen in Abwesenheit von PrP<sup>Sc</sup> zu Neurodegeneration

Interessanterweise fand man bei einigen vererbaren Prion-Erkrankungen zwar Neurodegeneration, aber keine infektiösen Prionen (Hsiao und Prusiner, 1990; Hsiao et al., 1990; Medori et al., 1992; Budka, 1997). Verschiedene Arbeiten zeigten, dass neben PrP<sup>Sc</sup> noch andere fehlgefaltete PrP-Spezies existieren, die in Abwesenheit von PrP<sup>Sc</sup> zu Neurodegeneration führen (Muramoto et al., 1997; Chiesa et al., 1998; Hegde et al., 1998a; Shmerling et al., 1998; Ma et al., 2002; Flechsig et al., 2003; Baumann et al., 2007; Li et al., 2007). Daraus lässt sich schließen, dass fehlgefaltete PrP-Konformere vorkommen können, die zwar neurotoxisch, aber nicht infektiös sind (Abb. 12).

Eines dieser Konformere stellt die pathogene Mutante PG14 dar, welche durch eine neunfache OR-Insertion gekennzeichnet ist. Die Überexpression dieser PrP-Mutante in Mäusen führte zu fataler Neurodegeneration. Versuche, Wildtyp-Mäuse mittels intrazerebraler Inokulation von Hirnhomogenat aus transgenen PG14-Mäusen zu infizieren, schlugen jedoch fehl (Chiesa et al., 1998; Chiesa et al., 2003). Anhand von Mausmodellen und in Zellkulturstudien konnte beobachtet werden, dass PrP auch neurotoxisches Potential gewinnt, wenn die hydrophobe Domäne (HD) im N-Terminus des Proteins deletiert wird (Shmerling et al., 1998; Baumann et al., 2007; Li et al., 2007; Rambold et al., 2008). Transgene Mäuse, die diese PrP-Mutanten auf *Prnp*<sup>0/0</sup>-Hintergrund überexprimieren, zeigten schwere Ataxie und neuronalen Zelltod, aber keine Infektiösität (Shmerling et al., 1998; Baumann et al., 2007; Li et al., 2007).

Des Weiteren ergaben mehrere Studien, dass PrP toxisches Potential erwerben kann, wenn der Import ins ER teilweise oder vollständig verhindert wird. Wie bereits in Abschnitt 1.2.5 beschrieben wurde, besitzt PrP eine hochkonservierte, hydrophobe Domäne (AS 112-135). In *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass PrP aufgrund dieser Domäne neben seiner GPI-verankerten, vollständig ins ER importierten Form auch zwei unterschiedliche transmembranäre Topologien annehmen kann (Abb. 13). Während sich bei der als <sup>Ntm</sup>PrP bezeichneten Form der N-Terminus im ER-Lumen befindet, ist bei der <sup>Ctm</sup>PrP-Form der C-Terminus im ER-Lumen (Lopez et al., 1990; Yost et al., 1990). Tatsächlich können verschiedene Mutationen in der HD und in der N-terminalen Signalsequenz die relativen Anteile dieser drei PrP-Topologien modulieren (Hegde et al., 1998b; Kim et al., 2001). Eine Studie mit transgenen Mäusen ergab, dass die Dreifach-Mutation AV3 (A112V/A114V/A117V) in der HD, die zur vermehrten Biosynthese von <sup>Ctm</sup>PrP führt, progressive Neurodegeneration zur Folge hat. Beachtenswerterweise konnte auch bei GSS-Patienten mit der Mutation A117V ein erhöhter Anteil an <sup>Ctm</sup>PrP gefunden werden (Hegde et al., 1998a; Hegde et al., 1999; Stewart et al., 2005).



**Abb. 13. Schematische Darstellung der Lokalisierungsmöglichkeiten und Topologien von PrP in der Zelle.** Neben der physiologisch vorwiegend auftretenden GPI-verankerten Form von PrP liegen in geringerem Ausmaß auch transmembrane Formen ( $C^{tm}PrP$  und  $N^{tm}PrP$ ) sowie zytosolisch lokalisiertes PrP vor.

Ein weiteres Mausmodell zeigte schließlich, dass die vollständige Hemmung des ER-Imports von PrP ebenfalls zur Bildung einer neurotoxischen Spezies führt. Die Expression von PrP mit deletierter ER-Signalsequenz (zytoPrP) führt zur ausschließlichen Lokalisierung des Proteins im Zytosol. Transgene Mäuse, die diese PrP-Mutante überexprimierten, zeigten schwere Ataxie, zerebrale Degeneration und Gliose, was ein Indiz dafür war, dass PrP im Zytosol toxisch ist (Ma et al., 2002). Das neurotoxische Potential von zytosolischem PrP konnte auch in mehreren Zellkulturstudien beobachtet werden (Ma und Lindquist, 2001; Ma et al., 2002; Yedidia et al., 2001; Drisaldi et al., 2003; Rane et al., 2004; Orsi et al., 2006; Rambold et al., 2006). In einem erst kürzlich publizierten Zellkulturmodell aus unserer Arbeitsgruppe wurde PrP in verschiedene zelluläre Kompartimente geleitet und der Einfluss auf die Viabilität der neuronalen Zellen untersucht. Obwohl PrP in allen analysierten Kompartimenten (ER, Zytosol, Mitochondrien und Nukleus) eine Detergens-unlösliche, partiell PK-resistente Konformation einnahm, induzierte nur zytosolisch lokalisiertes PrP Apoptose. Das apoptotische Potential von zytoPrP konnte mit der HD und Helix1 (AS 115-156) assoziiert werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Toxizität von zytoPrP mit der Bindung an den anti-apoptotischen Faktor Bcl-2 korreliert (Rambold et al., 2006). Interessanterweise konnte im Gegensatz zu den eben dargestellten Ergebnissen in anderen Studien keine Beeinträchtigung der zellulären Lebensfähigkeit durch Expression von zytoPrP

beobachtet werden (Roucou et al., 2003; Fioriti et al., 2005). Eine Analyse ergab sogar, dass die Expression von zytoPrP in primären Neuronen protektiv ist und gegen BAX-vermittelten Zelltod schützen kann (Roucou et al., 2003). Eine mögliche Erklärung für diese kontroversen Befunde liefert die Annahme, dass die Toxizität von zytoPrP durch zelluläre Faktoren moduliert werden kann. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass das toxische Potential von zytoPrP durch die Überexpression von Hsp70 und Hsp40 oder Bcl-2 reduziert, jedoch durch die Inhibition des Proteasoms verstärkt wird (Ma und Lindquist, 2001; Ma et al., 2002; Yedidia et al., 2001; Drisaldi et al., 2003; Rane et al., 2004; Orsi et al., 2006; Rambold et al., 2006;). Dies deutet darauf hin, dass die Toxizität, abhängig von der zellulären Homöostase, durch die Bildung und den Abbau von zytoPrP beeinflusst werden kann.

Bis jetzt wurden in Patienten keine pathogenen Mutationen in der N-terminalen Signalsequenz von PrP gefunden, die die Effizienz des ER Imports beeinträchtigen und zu einer zytosolischen Lokalisierung führen würden. Die Analyse der pathogenen Stop-Mutante W145X („X“ bezeichnet ein Stopcodon), die in einem GSS-Patienten gefunden wurde, ergab aber überraschenderweise eine zytosolische und nukleäre Lokalisation dieses Proteins (Kitamoto et al., 1993; Zanusso et al., 1999). Die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Studien in neuronalen Zellen konnten zeigen, dass neben W145X auch eine zweite pathogene Stop-Mutante Q160X teilweise im Zytosol lokalisiert ist (Heske et al., 2004) und Apoptose induziert (Rambold et al., 2006). Mechanistische Analysen ergaben schließlich, dass der deletierte C-Terminus von PrP Informationen beinhaltet, die notwendig für den Import in das ER sind. Ohne diese Information ist die Translokation ins ER beeinträchtigt und die Mutanten liegen mit ungeschnittener Signalsequenz im Zytosol vor (Heske et al., 2004). In einer anderen Studie wurde vermutet, dass PrP aufgrund seiner ineffizienten ER-SS nicht vollständig ins ER transportiert wird, sondern eine kleine Fraktion im Zytosol lokalisiert vorliegt, wo sie toxisch wirken kann (Rane et al., 2004). Im Gegensatz zu der gerade dargestellten Vermutung, dass der ER-Import von PrP beziehungsweise der PrP-Mutanten beeinträchtigt sein könnte, wurde in vorangegangenen Arbeiten angenommen, dass PrP im ER-Lumen missfaltet und mittels ER-assoziiierter Degradierung (siehe Abschnitt 1.5.3.2) wieder zurück ins Zytosol transportiert werden kann (Ma und Lindquist, 2001; Yedidia et al., 2001).

## **1.5 Maturierung und Faltung sekretorischer Proteine**

PrP ist ein sekretorisches Protein. Dennoch konnten sowohl PrP als auch zwei pathogene Stop-Mutanten (Q160X und W145X) teilweise im Zytosol beobachtet werden, wo sie Apoptose auslösen. Die Untersuchung der genauen Vorgänge, weshalb und auf welchem Weg PrP ins Zytosol gelangt, ist ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit. Für ein besseres

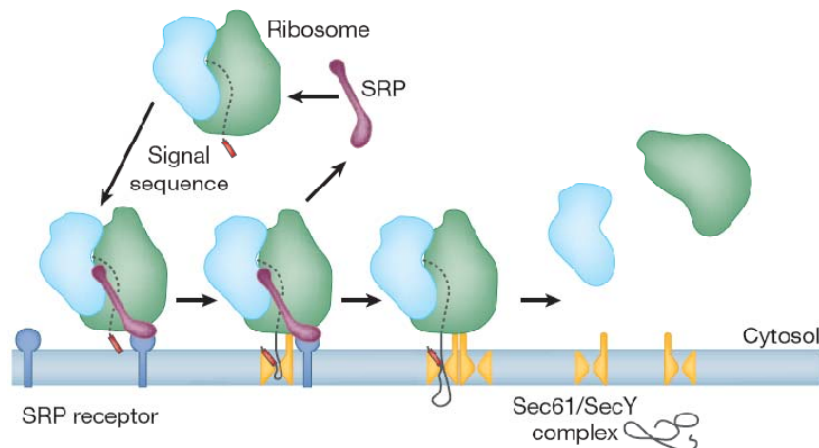
Verständnis wird deshalb im folgenden Abschnitt genauer auf die allgemeine Biosynthese sekretorischer Proteine eingegangen. Außerdem werden verschiedene Qualitätskontroll- und Abbaumechanismen der Zelle vorgestellt, welche dazu dienen, die Akkumulation missgefalteter Proteine zu verhindern.

### 1.5.1 Proteinsynthese am ER

Die Synthese sekretorischer Proteine beginnt an freien Ribosomen im Zytosol. Die naszierende Polypeptidkette wird im Peptidyl-Transferase-Zentrum in der Spalte zwischen der kleinen und großen Untereinheit des Ribosoms gebildet. Während die Kette elongiert wird, erstreckt sie sich entlang der circa 100 Å langen und etwa 20 Å breiten ribosomalen Austrittspore (engl. *exit tunnel*) (Ban et al., 2000; Menetret et al., 2000; Beckmann et al., 2001). Die aus dem Ribosom austretende naszierende Polypeptidkette enthält eine N-terminale SS, welche das entstehende Protein an die ER-Membran dirigiert (Blobel und Dobberstein, 1975a). Signalpeptide variieren sehr stark in ihrer Länge und AS-Sequenz. Grundsätzlich können sie aber in drei Regionen, bestehend aus einer kurzen, positiv geladenen N-terminalen, einer zentralen hydrophoben und einer C-terminalen polaren Region, die die Schnittstelle für die Signalpeptidase enthält, eingeteilt werden (von Heijne, 1985). Lange Zeit wurde vermutet, dass ER-SS frei austauschbar sind. Einzig und allein ihre Hydrophobizität schien von Bedeutung zu sein. So muss ein bestimmtes Maß an Hydrophobizität vorhanden sein, um einen kotranslationalen Import ins ER zu ermöglichen (Valent et al., 1995). Mehrere kürzlich durchgeführte Studien ergaben jedoch, dass Signalpeptide Informationen beinhalten, die eine Rolle für die Wahl des Translokationsweges, die Effizienz der Translokation, die zeitliche Regulierung der Abspaltung durch die Signalpeptidase und interessanterweise auch für spätere Funktionen der abgespaltenen ER-SS spielen (Hegde und Bernstein, 2006). In einer Studie konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Diversität der ER-SS wichtig für die Substratspezifische Modulation der Proteintranslokation sein kann (siehe Abschnitt 1.5.3.4; Kang et al., 2006).

In Säugetierzellen werden sekretorische Proteine in der Regel kotranslational in das ER importiert (Abb. 14). An die ER-SS der naszierenden Polypeptidkette bindet das sogenannte Signalerkennungspartikel (engl. *signal recognition particle*, SRP) (Walter und Blobel, 1980; Walter und Blobel, 1982). Die Elongation der Polypeptidkette wird daraufhin verlangsamt und der Ribosom-Peptid-Komplex zum ER geleitet. Dort bindet das SRP in einer GTP-anhängigen Reaktion an den SRP-Rezeptor (SR), der wiederum mit der Translokationsmaschinerie interagiert (Meyer und Dobberstein, 1980; Gilmore et al., 1982a; Gilmore et al., 1982b). Der SRP-SR-Komplex wird von dem Ribosomen-Polypeptidketten-Komplex gelöst (Connolly und Gilmore, 1989) womit die Elongation am Ribosom fortgesetzt

werden kann (Pohlschroder et al., 1997; Matlack et al., 1998; Johnson und van Waes, 1999). Schließlich dissoziiert der SRP-SR-Komplex durch GTP-Hydrolyse (Miller und Walter, 1993) und der SRP-Zyklus kann von neuem beginnen.



**Abb. 14. Modell der kotranslationalen Proteintranslokation eines sekretorischen Proteins.** Das Schema zeigt die Schritte des SRP-Zyklus. Das Signalerkennungspartikel (SRP) bindet an die hydrophobe ER-SS (rot) der wachsenden Polypeptidkette. Die Translation wird verlangsamt und der Ribosom-Peptid-Komplex zur ER Membran geleitet. Dort bindet SRP an seinen Rezeptor. Sobald SRP wieder freigesetzt wird, bindet das Ribosom an den Translokationskanal (Sec61-Komplex) und die Translation wird fortgesetzt. Die Signalsequenz wird geschnitten während das naszierende Polypeptid in die Translokationspore inseriert. Abbildung aus (Rapoport, 2007).

Der Translokationstunnel (Sec61-Komplex in Eukaryonten, SecY in Bakterien und Archaeen) besteht aus den drei transmembranen Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ , wobei die  $\alpha$ -Untereinheit die Pore ausbildet (Gorlich et al., 1992, Mothes et al., 1994). Das eukaryontische Translokation beinhaltet mehrere Kopien des heterotrimeren Sec61-Komplexes und verschiedene assoziierte Komponenten wie den TRAP (*translocon-associated protein*)-Komplex, das TRAM (*translocating chain associating membrane*)-Protein, die Oligosaccharyltransferase (OST) und den Signalpeptidase-Komplex (Hanein et al., 1996, Van den Berg et al., 2004, Menetret et al., 2005). Da die Aufklärung der Kristallstruktur von SecY aus dem Archaeobakterium *Methanococcus jannaschii* eine statische Porengröße von nur 8 Å ergab, wurde angenommen, dass die Pore dynamisch während der Translokation geweitet wird.

Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass die Pore groß genug ist, um einer Polypeptidkette in  $\alpha$ -helikaler Konformation Platz zu bieten (Van den Berg et al., 2004; Cannon et al., 2005; Gumbart und Schulten, 2006; Tian und Andricioaei, 2006; Haider et al., 2006; Saporov et al., 2007). Inwieweit das SecY-Modell mit dem eukaryontischen

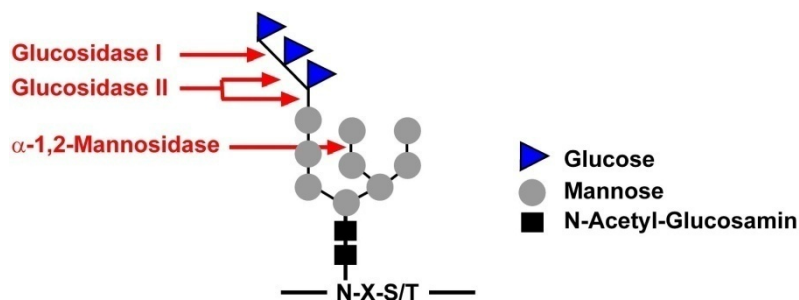
übereinstimmt, ist bisher noch unklar. Obwohl man vermutet, dass die Pore in Eukaryonten nur von einem Sec61-Komplex geformt wird, konnte mittels Elektronenmikroskopie gezeigt werden, dass vier Sec61-Komplexe assoziiert vorliegen (Menetret et al., 2005). Des Weiteren bleibt herauszufinden, wie während der Translokation eine Permeabilitätsbarriere für Ionen aufrecht erhalten wird. Anhand des SecY-Modells wird vermutet, dass neben einer kurzen helikalen Domäne des Translokons auf der lumenalen Seite, die als Pfropfen die Pore verschließt, ein zentraler Ring hydrophober AS in der Pore (engl. *pore ring*) die Ionen-Barriere aufrechterhält (Van den Berg et al., 2004). Alternative Modelle schlagen hingegen vor, dass der Verschluss der Pore im ER-Lumen durch das Chaperon BiP und auf der zytosolischen Seite durch das Ribosom gebildet wird (Crowley et al., 1994; Hamman et al., 1998).

Nachdem der Ribosom-Peptid-Komplex mit dem Sec61-Komplex in Kontakt getreten ist, wird unter Kontrolle des Signalpeptids der Kanal geöffnet und die ER-SS assoziiert zuerst mit dem integralen TRAM-Protein (Görlich et al., 1992; Voigt et al., 1996). Die wachsende Polypeptidkette wird Richtung ER-Lumen vorwärtsgeschoben. Schließlich schneidet die Signalpeptidase, welche an der lumenalen Seite der ER-Membran lokalisiert ist, die N-terminale SS ab (Johnson und van Waes, 1999) und die Synthese des Proteins kann vollendet werden. *In vitro* Experimente haben gezeigt, dass für die Translokation der meisten Proteine nur die drei Komponenten Sec61-Komplex, TRAM und SRP-Rezeptor ausreichend sind (Görlich und Rapoport, 1993; Voigt et al., 1996). Für einen erfolgreichen ER-Import von PrP und einiger anderer Proteine wird allerdings ein weiterer Faktor, der sogenannte TRAP-Komplex, benötigt (Fons et al., 2003). Die genaue Funktion dieses Proteinkomplexes ist jedoch noch nicht geklärt.

### 1.5.2 Prozessierung der Proteine im ER und Golgi-Apparat

Eine wichtige Proteinmodifikation sekretorischer Proteine ist die Glykosylierung. Man unterscheidet zwischen der N- und der O-Glykosylierung. Die N-Glykosylierung erfolgt auch bei PrP und ist die meistverbreitete Glykosylierungsart. Sie findet an Asparaginresten (N), die durch das Motiv N-X-S/T (X beliebige AS außer Prolin) charakterisiert sind, statt. *In vitro*-Analysen ergaben, dass das Motiv N-X-T eine vierzigmal effizientere Glykosylierung der Proteine ermöglicht als N-X-S (Bause, 1983). Die N-Glykosylierung beginnt kotranslational im ER mit dem Transfer der Kernglykane auf die naszierende Polypeptidkette. Die Synthese der Kernglykane ist äußerst komplex. Sie beginnt auf der zytosolischen Seite des ERs. Oligosaccharide bestehend aus fünf Mannose- und zwei N-Acetyl-Glucosaminresten (Man5GlucNAc2) werden dort mit dem lipophilen Polyprenol Dolichol-Phosphat verknüpft. Dieses hydrophobe Polyprenol transferiert anschließend die Zuckereinheit durch „Umkappen“ auf die lumenale Seite der Membran. Dort wird die Glykankette durch

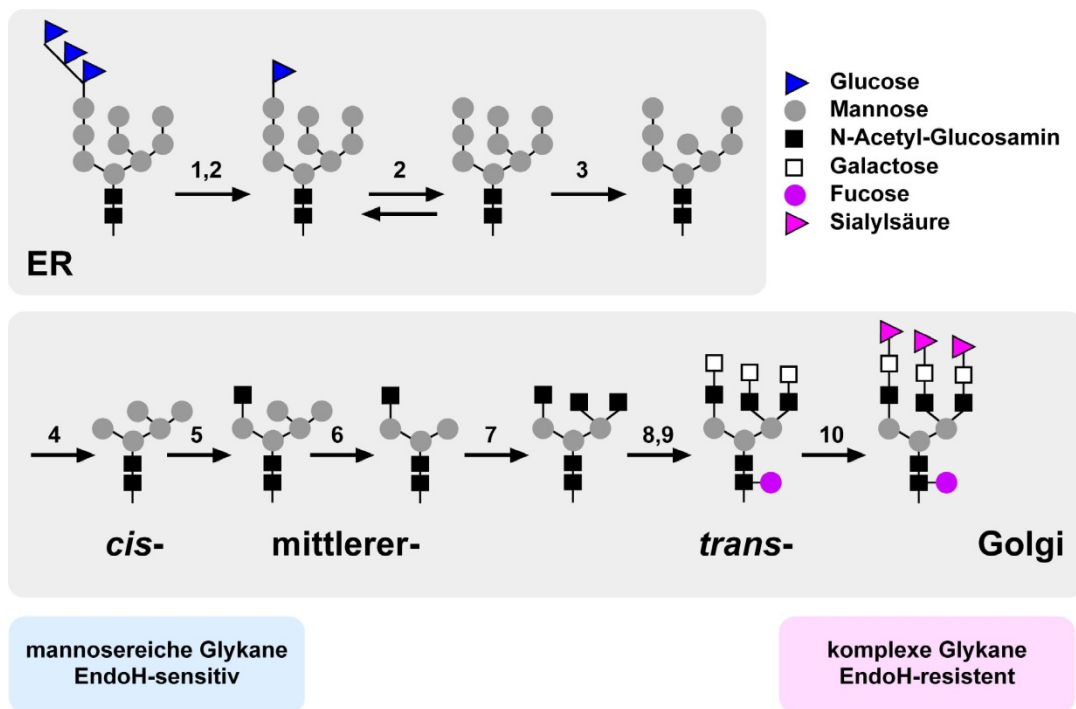
aufeinanderfolgende Additionen von Monosacchariden verlängert (Kornfeld und Kornfeld, 1985, Gahmberg und Tolvanen, 1996; Burda und Aebi, 1999). Sobald dieses Grundgerüst bestehend aus drei Glucose-, neun Mannose- und zwei N-Acetyl-Glucosaminresten (Glc3Man9GlucNAc2) fertiggestellt ist, wird es als Ganzes mit Hilfe der OST auf einen Asparaginrest der wachsenden Polypeptidkette übertragen (Silberstein und Gilmore, 1996) (Abb. 15).



**Abb. 15. Schematische Darstellung des Kernglykangerüsts, welches im ER kotranslational an die naszierende Polypeptidkette mit dem Erkennungsmotiv N-X-S/T geknüpft wird.** Das Kernglykangerüst besteht insgesamt zwei N-Acetyl-Glucosamin-, neun Mannose- und drei Glucoseresten. Die drei Glucosereste und ein Mannoserest werden im ER mit Hilfe der Glucosidase I und II und der α-1,2-Mannosidase wieder entfernt.

Im ER werden mit Hilfe der Glucosidase I und II und der α-1,2-Mannosidase die drei Glucose- und einer der Mannosereste wieder entfernt (Kornfeld und Kornfeld, 1985; Moremen et al., 1994). Die Abspaltung des Mannoserestes ist von Bedeutung, da es das Signal für den Export des richtig gefalteten Proteins in den Golgi-Apparat darstellt. Missgefaltete oder ungefaltete Proteine werden hingegen mittels der Glucosyl-Transferase reglucosyliert und somit erneut in den sogenannten Calnexin-Zyklus (vgl. Abschnitt 1.5.3.1) überführt. Nativ gefaltete Proteine gelangen letztendlich vom ER über vesikulären Transport in den Golgi-Apparat, wo die Prozessierung der Kernglykane fortgesetzt werden kann. Zuerst werden im *cis*-Golgi weitere drei Mannosereste entfernt woraufhin im mittleren Golgi ein N-Acetyl-Glucosaminrest addiert und danach weitere zwei Mannoseeinheiten abgespalten werden. Danach erfolgt im *trans*-Golgi die Addition der terminalen Zuckerreste bestehend aus N-Acetyl-Glucosamin-, Galactose-, Sialylsäure- und Fucoseresten was zur komplexen Glykosylierung des Proteins führt (Abb. 16). Während die Kernglykane aller Proteine eine einheitliche Struktur und Zusammensetzung besitzen und unter anderem eine Rolle in der Proteinfaltung und Qualitätskontrolle einnehmen, haben die Glykane im Golgi-Apparat

komplexe Strukturen mit heterogener Oligosaccharid-Zusammensetzung. Diese Diversität der terminalen Glykosylierung ist Zelltyp- und Spezies-spezifisch und vermittelt verschiedene Funktionen wie Zellerkennung oder Signalwirkung (Kornfeld und Kornfeld, 1985; Paulson und Colley, 1989; Varki, 1993).



**Abb. 16. Modell der Prozessierung von Kernglykanen in komplexe Strukturen.** Folgende Enzyme sind an der Prozessierung beteiligt: (1) Glucosidase I, (2) Glucosidase II, (3)  $\alpha$ -1,2-Mannosidase des ERs, (4) Mannosidase I des Golgi-Apparats, (5) GlcNAc-Transferase I, (6) Mannosidase II des Golgi-Apparats, (7) GlcNAc-Transferase II und IV, (8) Fucosyl-Transferase, (9) Galactosyl-Transferase, (10) Sialyl-Transferase. Der rückwärtige Pfeil im Schritt (2) symbolisiert die Reglucosylierung, welche den erneuten Eintritt in den Calnexin-Zyklus ermöglicht.

Für die Untersuchung des Glykosylierungsstatus eines Proteins stehen verschiedene Enzyme und Inhibitoren zur Verfügung. Ein wichtiger antibiotischer Inhibitor der N-Glykosylierung ist Tunicamycin (TM). Es hemmt die Addition von N-Acetyl-Glucosamin an Dolicholphosphat, also den ersten Schritt der Bildung des Kernglykans. Durch den Einsatz von dem Alkaloides Swainsonin wird die Mannosidase II im Golgi-Apparat gehemmt. Hierdurch wird die Prozessierung der Zucker im ER gestoppt wodurch keine Umwandlung in komplexe Glykane erfolgen kann. Komplexe Glykane können durch Verwendung der N-Glykosidase F (PNGase F) abgespalten werden, während das Enzym Endoglykosidase H



(EndoH) spezifisch zwischen zwei N-Acetyl-Glucosamin-Resten, an denen mindestens fünf Mannoseeinheiten hängen, schneidet (Abb. 16). Der Einsatz dieses Enzyms ermöglicht daher eine Unterscheidung zwischen dem mannosereichen Glykan-Typ (EndoH-sensitiv) oder komplex glykosylierten Strukturen (EndoH-resistent) (Robbins et al., 1984; Maley et al., 1989).

Neben der Glykosylierung stellt die Membranverankerung über den GPI-Anker eine weitere mögliche Modifizierung sekretorischer Proteine dar. Der GPI-Anker wird im ER separat synthetisiert und besteht aus einem Distearat, das über eine Oligosaccharid-Einheit mit Ethanolaminphosphat verknüpft wird. Proteine, die GPI-verankert werden sollen, benötigen eine C-terminale, hydrophobe GPI-Anker-Präsequenz, welche im ER durch den kompletten, vorgefertigten GPI-Anker ersetzt wird. Dabei wird der GPI-Anker über die NH<sub>2</sub>-Gruppe des endständigen Ethanolaminphosphats mittels einer Transamidase-Reaktion an die carboxyterminale Akzeptor-AS des Proteins, die sogenannte  $\omega$ -site, übertragen (Englund, 1993). Ähnlich wie die N-terminalen ER-SS weisen die C-terminalen GPI-SS keine konservierten Sequenzhomologien auf. Die GPI-Signalpeptide sind charakterisiert durch die  $\omega$ -site sowie die Positionen  $\omega+1$  und  $\omega+2$ , an denen sich nur einfache AS mit kurzen Seitenketten befinden dürfen, gefolgt von einer durch einen Linker getrennten 10-12 AS langen hydrophoben Domäne (Ferguson und Williams, 1988; Moran et al., 1991; Kodukula et al., 1993).

### 1.5.3 Proteinfaltung, Qualitätskontrollmechanismen und Proteinabbau

Wie in Abschnitt 1.4 bereits erläutert, kann die Missfaltung von PrP zu Neurodegeneration führen. Da die Zelle verschiedene Mechanismen hat, um die Fehlfaltung von Proteinen zu vermeiden oder bereits missgefaltete Proteine zu erkennen und gegebenenfalls zu eliminieren, ist es von Interesse, diese hier genauer zu beleuchten. Die sogenannte Qualitätskontrolle der Zelle besteht aus einem komplexen Netzwerk molekularer Mechanismen, die für die Balance von Protein-Biosynthese, Translokation, Faltung und Abbau sorgen (Morimoto, 2008). Zu den wichtigsten Mechanismen der Qualitätskontrolle von ER-Proteinen gehören der Calnexin-Zyklus, die „Antwort auf ungefaltete Proteine“ (engl. *unfolded protein response*, UPR) und die ER-assoziierte Degradierung (engl. *ER-associated degradation*, ERAD). In den letzten Jahren fand man schließlich Hinweise auf einen weiteren Qualitätskontrollmechanismus, die sogenannte präventive (engl. *pre-emptive quality control*, pQC) oder kotranslokationale (engl. *cotranslocational quality control*, cQC) Qualitätskontrolle.

Um die Proteinfaltung, die ein äußerst komplexer und oft ineffizienter Vorgang ist, zu erleichtern, besitzt die Zelle eine hohe Zahl an zusätzlichen Faktoren. Dazu gehören unter

anderem die Chaperone (französisch für Anstandsdamen) und andere Faltungsenzyme. Chaperone assistieren bei der Faltung, indem sie un- oder fehlgefaltete Proteine an exponierten hydrophoben Bereichen reversibel binden und somit entweder passiv einer Proteinaggregation vorbeugen oder aktiv eine korrekte Faltung vermitteln (Hartl, 1996; Netzer und Hartl, 1998; Ellis und Hartl, 1999; Agashe und Hartl, 2000; Hartl und Hayer-Hartl, 2002; Walter und Buchner, 2002). Zu den wichtigsten Chaperonen gehören die Mitglieder der sogenannten Hitzeschockproteine (Hsp), die ubiquitär vorkommen und hoch konserviert sind. Während Hsp70-Mitglieder, wie das konstitutiv exprimierte Hsc70 oder das stressinduzierte Hsp70 im Zytosol vorliegen, ist das 78kDa große BiP (Immunglobulin schwere Kette-bindendes Protein) der Hauptvertreter dieser Proteine im ER-Lumen. Weitere wichtige Chaperone sind Grp94 (Glucose-reguliertes Protein 94), ein Hsp90-Mitglied im ER, die zytosolisch und lumenal vorkommenden Kochaperone der Hsp40-Familie sowie die Lektine Calretikulin und Calnexin. Zusätzlich findet man im ER-Lumen unter anderem die Protein-Disulfid-Isomerase, die die Faltung beschleunigt, indem sie die Ausbildung korrekter Disulfidbrücken katalysiert, und Peptidyl-Prolyl-Isomerasen, die wichtig für die *cis/trans*-Isomerisierung nicht frei drehbarer Peptidyl-Prolyl-Bindungen in Proteinen sind (Anelli und Sitia, 2008).

### 1.5.3.1 Calnexin-Zyklus

Sollten Proteine im ER trotz eines ausgeklügelten Systems an Helferproteinen nicht korrekt falten oder missfalten, so besitzt die Zelle Mechanismen um diese Proteine zu erkennen und gegebenenfalls zu eliminieren. Bei Eukaryonten findet man im ER den sogenannten Calnexin-Zyklus (Helenius, 1994; Zapun et al., 1999; Parodi, 2000), dessen Hauptaufgabe darin besteht, Proteine zu falten und zu verhindern, dass missgefaltete Glykoproteine aus dem ER exportiert und weiter durch den sekretorischen Weg transportiert werden. Nachdem die Glucosidase I und II im ER zunächst zwei der drei Glucosereste der Kernglykane von neu synthetisierten Proteinen abspaltet (Abb. 16, Schritt 1), werden die Proteine, die nur noch einen Glucoserest besitzen (Glc1Man9GlucNAc2), von den ER-Chaperonen Calnexin und Calretikulin erkannt und gebunden (Ou et al., 1993; Hammond und Helenius, 1994). Membrangebundenes Calnexin und lumenales Calretikulin bilden jeweils einen Komplex mit ERp57, einer Thiooxidoreduktase, die den faltenden Proteinen bei der Ausbildung von Disulfidbrücken assistiert (Oliver et al., 1997; Molinari und Helenius, 1999). Die Interaktion mit den beiden Lektinen und ERp57 verlangsamt die Faltung vieler Proteine und erhöht damit deren Effizienz. Die Abspaltung des letzten Glucoserestes des neu synthetisierten Proteins durch die Glucosidase II (Abb. 16, Schritt 2) führt zur Dissoziation der Komplexe und zur Entlassung des Proteins aus dem Calnexin-Zyklus. Korrekt gefaltete Proteine können das ER verlassen und Richtung Golgi transportiert werden. Im Gegensatz dazu sind

nicht korrekt gefaltete Glykoproteine Substrate für die UDP-Glucose-Glucosyl-Transferase und werden durch sie reglucosiliert. Dies hat eine erneute Bindung an die ER-Chaperone zur Folge (Suh et al., 1989; Sousa et al., 1992; Trombetta et al., 1996). Der Zyklus wird so oft durchlaufen bis das Protein entweder richtig gefaltet oder zur ER-assoziierten Degradierung freigegeben wird (Hebert et al., 1996).

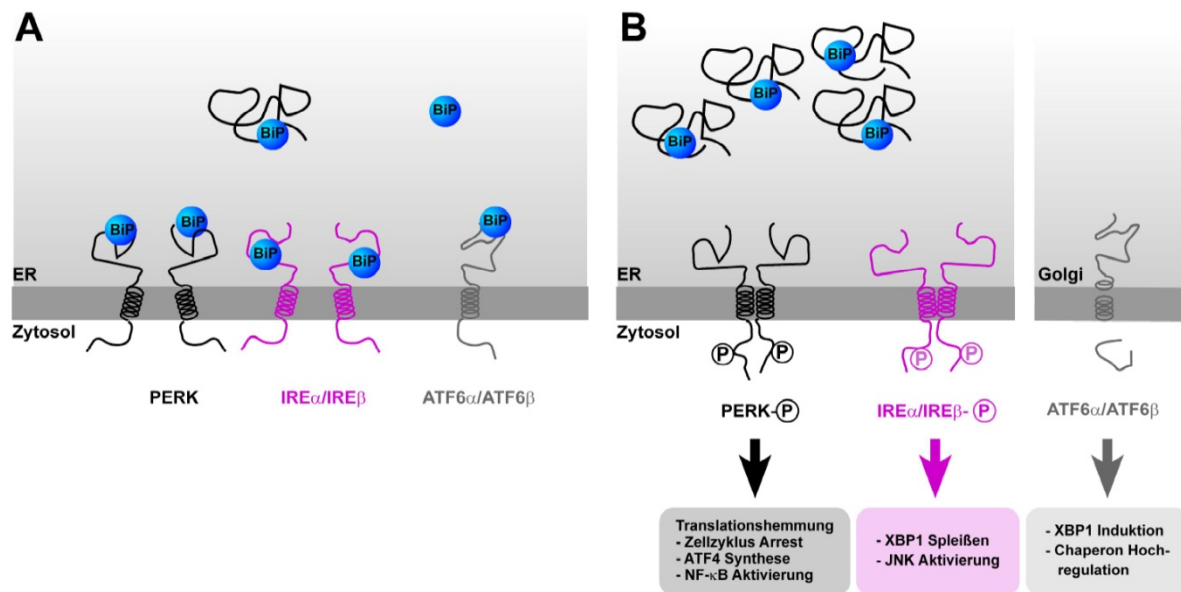
### 1.5.3.2 ER-assoziierte Degradierung

Die ER-assoziierte Degradierung (ERAD) ist ein Mechanismus zur selektiven Entfernung missgefalteter Proteine aus dem ER für die anschließende Degradierung durch das 26S-Proteasom im Zytosol (Finley et al., 1984; Jentsch et al., 1987; Hurtley und Helenius, 1989; Klausner und Sitia, 1990; Sommer und Jentsch, 1993; Jensen et al., 1995). Wie bereits erläutert wurde, unterliegen ER-Proteine der Qualitätskontrolle durch den Calnexin-Zyklus. Permanent missgefaltete Proteine werden schließlich mit Hilfe von Chaperonen sowie der Glykosylierungsmaschinerie erkannt (McCracken und Brodsky, 1996; Plemper et al., 1997; Jakob et al., 1998) und retrograd ins Zytosol zurücktransportiert (Wiertz et al., 1996; Plemper et al., 1997; Zhou und Schekman, 1999). Ein wichtiges Signal für Fehlfaltung ist der Mannose-Status der Glykoproteine. Während die Abspaltung der terminalen Glucosereste als Zeichen für korrekte Faltung und Weitertransport in den Golgi dient, ist das Abspalten von Mannoseresten durch ER-Mannosidasen ein Signal für ERAD (Cabral et al., 2001). Die so modifizierten, terminal fehlgefalteten Proteine sind Substrate für die sogenannte *ER degradation-enhancing-1,2-mannosidase-like* (EDEM)-Familie (Hosokawa et al., 2001, Mast et al., 2005, Olivari et al., 2005). Die Identität der Oligosaccharid-Zusammensetzung, die zur Erkennung der fehlgefalteten Glykoproteine durch EDEM-Proteine führt, wird momentan noch kontrovers diskutiert. Es wird jedoch vermutet, dass in Säugetieren fünf bis sechs Mannosereste dafür nötig sind (Frenkel et al., 2003). An EDEM gebundene missgefaltete, lumenal lokalisierte Proteine werden retrograd durch eine bisher noch nicht identifizierte Translokationspore ins Zytosol transloziert. Möglicherweise handelt es sich dabei um Sec61, das auch am Import beteiligt ist (Wiertz et al., 1996; Plemper et al., 1997; Zhou und Schekman, 1999). Alternativ oder zusätzlich könnte auch das Transmembranprotein Derlin-1 an der Retrotranslokation beteiligt sein (Lilley und Ploegh, 2004, Ye et al., 2004). Obwohl der genaue Mechanismus des Rücktransports noch nicht geklärt ist, wird davon ausgegangen, dass die ERAD-Substrate im Zytosol schließlich deglykosyliert und polyubiquitiniert werden, was als Signal für den Abbau durch das 26S-Proteasom dient (Schlesinger et al., 1975; Chau et al., 1989). Das sogenannte Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist der Hauptmechanismus des regulierten Proteinabbaus im Zytosol und gekoppelt mit der ERAD-Maschinerie auch für die kontrollierte Degradierung terminal fehlgefalteter ER-Proteine zuständig (Ciechanover und Brundin, 2003).

### 1.5.3.3 UPR

Sollten missgefaltete Proteine im ER akkumulieren und die Faltungs- und Prozessierungsmaschinerie überlasten, wird eine Stressantwort, die sogenannte „Antwort auf ungefaltete Proteine“ (engl. *unfolded protein response*, UPR), ausgelöst (Kozutsumi et al., 1988; Gething und Sambrook, 1992; Malhotra und Kaufman, 2007). Die UPR verfolgt verschiedene Ziele. Erstens wird versucht, die normale zelluläre Funktionalität aufrecht zu erhalten, indem die Proteintranslation gestoppt und eine komplexe Signaltransduktionskaskade aktiviert wird, um die Produktion verschiedener Chaperone zu induzieren (Mori et al., 1992). So bewirkt die UPR unter anderem die gesteigerte Transkription der ER-Chaperone BiP und Grp94 sowie der Protein-Disulfid-Isomerase (Dorner et al., 1990; Little und Lee, 1995). Des Weiteren wird die Bildung der Proteasomuntereinheiten hochreguliert, was einen verstärkten proteasomalen Abbau der missgefalteten Proteine im Zytosol ermöglicht (Ng et al., 2000). Sollte dieses Ziel von der Zelle nicht erreicht werden und die Überlastung Überhand nehmen, so wird über die UPR als letzter Ausweg Apoptose induziert (Breckenridge et al., 2003).

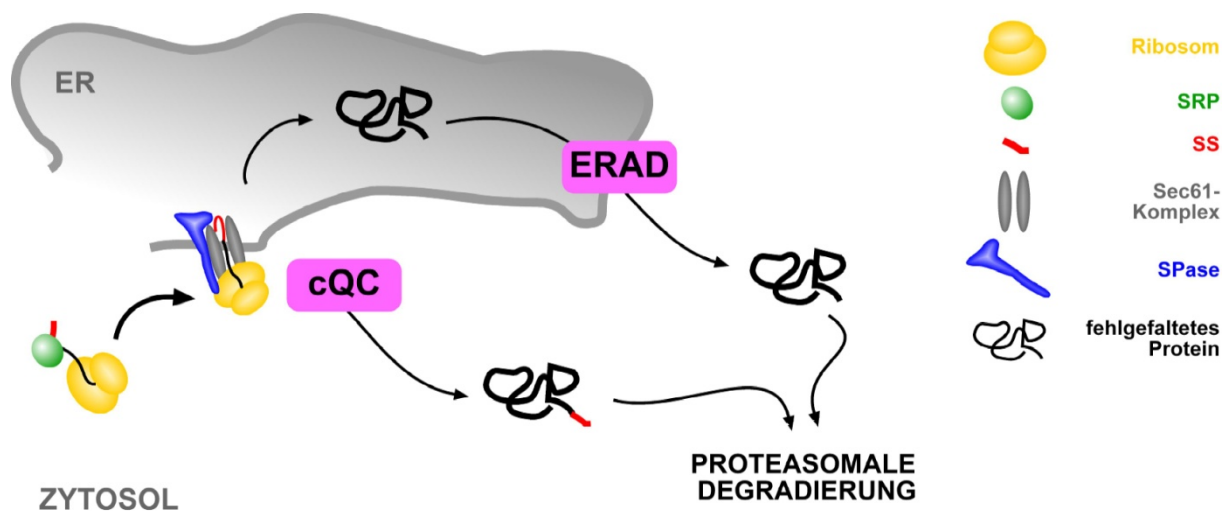
Mehrere Studien haben gezeigt, dass BiP in der UPR als Stresssensor dienen kann. Unter physiologischen Bedingungen (Abb. 17, A) liegt genügend BiP im ER-Lumen vor, um einerseits seine Funktion als Chaperon auszuüben, andererseits aber auch als Stresssensor an die Rezeptoren PERK (*protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase*), IRE1 (*Inositol-requiring protein-1*) und ATF6 (*activating transcription factor-6*) zu binden. Unter Stressbedingungen (Abb 17, B) steigt die Anzahl fehlgefalteter Proteine im Lumen. In seiner Funktion als Chaperon bindet BiP vermehrt an nicht-native ER-Proteine und folglich vermindert an die Stressrezeptoren. Diese unterliegen dadurch einer Konformationsänderung oder Relokalisierung innerhalb der Zelle und induzieren daraufhin verschiedene UPR-Signalwege (Shamu und Walter, 1996; Harding et al., 1999; Haze et al., 1999; Urano et al., 2000; Bertolotti et al., 2000; Okamura et al., 2000; Yoneda et al., 2001). Alternativ zu diesem BiP-vermittelten Mechanismus, besteht auch die Vermutung, dass fehlgefaltete Proteine selbst lumenal an die Rezeptoren binden und sie so aktivieren (Credle et al., 2005).



**Abb. 17. Vereinfachte schematische Darstellung der Induktion der UPR.** Ob BiP und/oder fehlgefaltete Proteine als Stresssensoren der UPR agieren, ist noch nicht geklärt. Vereinfacht ist hier nur BiP dargestellt, welches unter physiologischen Zuständen an die Rezeptoren PERK, IRE und ATF bindet (**A**). Unter ER-Stressbedingungen wird BiP vermehrt für die Faltung sekretorischer Proteine benötigt (**B**). In Folge der verminderten Bindung an BiP oligomerisieren die Rezeptoren PERK und IRE, werden autophosphoryliert und induzieren verschiedene Wege, um die Zelle vor der Überlastung durch missgefaltete Proteine zu schützen. ATF6 wird nach Aktivierung auf bisher noch nicht geklärte Weise in den Golgi-Apparat transportiert wo es proteolytisch prozessiert wird und so zur UPR-Antwort beiträgt. Die verschiedenen Arme der UPR umfassen die Induktion der Chaperonsynthese, vermehrten Proteinabbau im Zytosol und gegebenenfalls auch Apoptose. Abbildung modifiziert aus (Ma und Hendershot, 2004).

#### 1.5.3.4 Kotranslokationale Qualitätskontrolle

Erst kürzlich wurde ein alternativer Mechanismus zur ER-assoziierten Degradierung von sekretorischen Proteinen beschrieben (Abb. 18). Die sogenannte kotranslokationale Qualitätskontrolle (cQC) stellt einen Mechanismus zur Regulation der Translokation von Polypeptiden ins ER dar (Kang et al., 2006; Oyadomari et al., 2006; Hegde und Kang, 2008). Die Beobachtung, dass sekretorische Proteine teilweise nicht von der Signalpeptidase prozessiert wurden und daher noch eine ungeschnittene ER-SS aufweisen, diente als Hinweis dafür, dass sie nicht vollständig ins ER importiert wurden (Rutkowski et al., 2007; Oyadomari et al., 2006). So wurde vermutet, dass die cQC bereits vor oder während der Proteintranslokation stattfindet, um das ER frühestmöglich vor einer Überlastung durch fehlgefaltete Proteine zu schützen. Substrate der cQC werden nicht in das ER importiert, sondern kotranslokational ins Zytosol geleitet, wo sie proteasomal degradiert werden.



**Abb. 18. Ko- und posttranslokationale Qualitätskontrolle von ER-Proteinen.** Während die ER-assoziierte Degradation (ERAD) einen posttranslokationalen QC-Mechanismus darstellt, um fehlgefaltete Proteine zu erkennen, aus dem ER zu translozieren und im Zytosol über das Proteasom abzubauen, greift der alternative Mechanismus der sogenannten präventiven oder kotranslokationalen Qualitätskontrolle (cQC) bereits ein, bevor die Proteintranslokation abgeschlossen ist und verhindert somit einen Import der Proteine in das ER. Stattdessen werden die Proteine direkt ins Zytosol geleitet, wo sie vom Proteasom abgebaut werden.

Vor allem unter ER-Stressbedingungen kann es für die Zelle von Vorteil sein, sekretorische Proteine nicht konstitutiv ins ER zu importieren, da dies die Faltungsmaschinerie überlasten würde und in Folge zur zellulären Dysfunktion führen könnte. Eine Studie zeigte, dass verschiedene sekretorische Proteine, darunter PrP, unter ER-Stress vermindert ins ER transloziert wurden. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die Regulation der Translokation abhängig von den Eigenschaften des Signalpeptids ist (Kang et al., 2006). Auch für das Kochaperon  $p58^{\text{IPK}}$ , das bisher allein für seine Funktion als UPR-induzierter Inhibitor der  $eIF2\alpha$ -Kinase PERK bekannt war (Lee et al., 2003, Yan et al., 20022, van Huizen et al., 2003), wurde eine Funktion in der kotranslokationalen Degradierung von Proteinen vermutet. Einer Studie zufolge liegt  $p58^{\text{IPK}}$  mit dem Sec61-Komplex assoziiert vor und vermittelt durch Rekrutierung von Hsp70 an die zytosolische Seite des Translokons die kotranslokationale Degradierung von Proteinen unter ER-Stressbedingungen (Oyadomari et al., 2006). Alternativ wurde in einer darauf folgenden Studie postuliert, dass  $p58^{\text{IPK}}$  mit BiP assoziiert im ER-Lumen lokalisiert ist und dort indirekt Einfluss auf die Translokation und Maturierung der naszierenden Polypeptidkette ausübt. Da die Translokation ins ER unter anderem von lumenalen Chaperonen gefördert wird, könnte diesem Modell zufolge die

reduzierte Menge an frei vorliegendem BiP aufgrund verstärkter Assoziation mit p58<sup>IPK</sup> dafür verantwortlich sein, dass die Translokationseffizienz vermindert wird (Rutkowski et al., 2007).

Die cQC beruht wahrscheinlich auf dem Zusammenspiel zwischen intrinsischen Eigenschaften der Polypeptide und extrinsischen Faktoren wie p58<sup>IPK</sup>, die die Modulation der Translokation ermöglichen und somit versuchen, die zelluläre Homöostase aufrechtzuerhalten. Die genauen molekularen Mechanismen der Substrat-spezifischen Regulation der Translokation sind bisher aber unbekannt.

## 1.6 Zielsetzung

Die vorliegende Doktorarbeit umfasst zwei verschiedene Themenbereiche:

### **Teil 1 - Translokation von PrP ins ER: die Rolle intrinsischer und zellulärer Faktoren**

Für einige Prion-Erkrankungen konnte gezeigt werden, dass die Missfaltung und Fehllokalisierung von PrP Neurodegeneration in Abwesenheit von PrP<sup>Sc</sup> induzieren kann. Zwei pathogene, mit dem GSS-Syndrom in Zusammenhang stehende, Mutanten sind partiell im Zytosol lokalisiert und induzieren dort Apoptose. Der erste Teil der Doktorarbeit sollte sich daher mit der Entstehung toxischer, zytosolischer PrP-Mutanten und allgemeiner mit der Regulation des kotranslationalen Imports in das ER befassen. Es sollte ein Mausmodell für die GSS-Mutante Q160X generiert werden, um die Biogenese und die toxischen Mechanismen dieser Mutante im Tiermodell zu studieren. Des Weiteren sollten im Zellkulturmodell generell die intrinsischen und zellulären Faktoren, die für eine effiziente Translokation von PrP ins ER notwendig sind, analysiert werden.

### **Teil 2 - Biochemische Charakterisierung von PrP-Homologen aus dem Zebrafisch (*Danio rerio*)**

PrP ist ein hoch konserviertes Protein, das in vielen verschiedenen Spezies gefunden werden konnte. Dennoch ist über die evolutionäre Entstehung und Funktion von PrP noch sehr wenig bekannt. Um festzustellen, ob PrP-Homologe aus dem Zebrafisch (*Danio rerio*), wie mittels bioinformatischer Programme vorhergesagt, in das ER importiert, ko- und posttranslational modifiziert und ähnlich zu Säugetier-PrP an der Außenseite der Zellmembran GPI-verankert werden, sollte im Zellkulturmodell eine biochemische Analyse von zwei verschiedenen mit PrP verwandten Proteinen aus dem Zebrafisch durchgeführt werden. Dies sollte zeigen, ob die vorhergesagte evolutionäre Konservierung der Biogenese der Proteine zwischen Fisch und Säugetieren zutrifft und Aufschluss über die funktionellen Verhältnisse der einzelnen konservierten Domänen und Proteinmodifikationen geben.



## 2 Ergebnisse

### 2.1 Teil 1 - Translokation von PrP ins ER: die Rolle intrinsischer und zellulärer Faktoren

Wie bereits in Abschnitt 1.4.2 erwähnt, kann PrP - auch in Abwesenheit von PrP<sup>Sc</sup> - toxisches Potential erwerben, wenn es nicht oder nicht vollständig ins ER importiert wird. Die Expression von PrP mit deletierter ER-Signalsequenz führt zur Lokalisierung des Proteins im Zytosol. Transgene Mäuse, die diese zytosolische Form von PrP überexprimierten, wiesen einen schweren neurodegenerativen Phänotyp auf (Ma et al., 2002). Des Weiteren konnte auch Wildtyp PrP in Neuronen teilweise im Zytosol lokalisiert gefunden werden (Mironov et al., 2003). Die zwei humanpathogenen, C-terminalen Deletionsmutanten Q160X und W145X („X“ bezeichnet ein Stop-Codon) führen im Menschen zum Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom (GSS), einer familiären Form von Prion-Erkrankungen (Kitamoto et al., 1993; Finckh et al., 2000). Interessanterweise konnte im Zellkulturmodell gezeigt werden, dass Q160X und Q145X nur partiell ins ER importiert wurden (Heske et al., 2004, Zanusso et al., 1999) und Apoptose induzierten (Rambold et al., 2006). Diese Daten zeigen, dass eine Veränderung des ER-Imports zur Generierung einer neurotoxischen PrP-Spezies führen kann.

Im ersten Teil der Arbeit wurden deshalb zwei Aspekte bearbeitet:

A) Generierung eines Mausmodells für die GSS-Mutante Q160X

B) Analyse der intrinsischen und zellulären Faktoren, die für eine effiziente Translokation von PrP ins ER notwendig sind

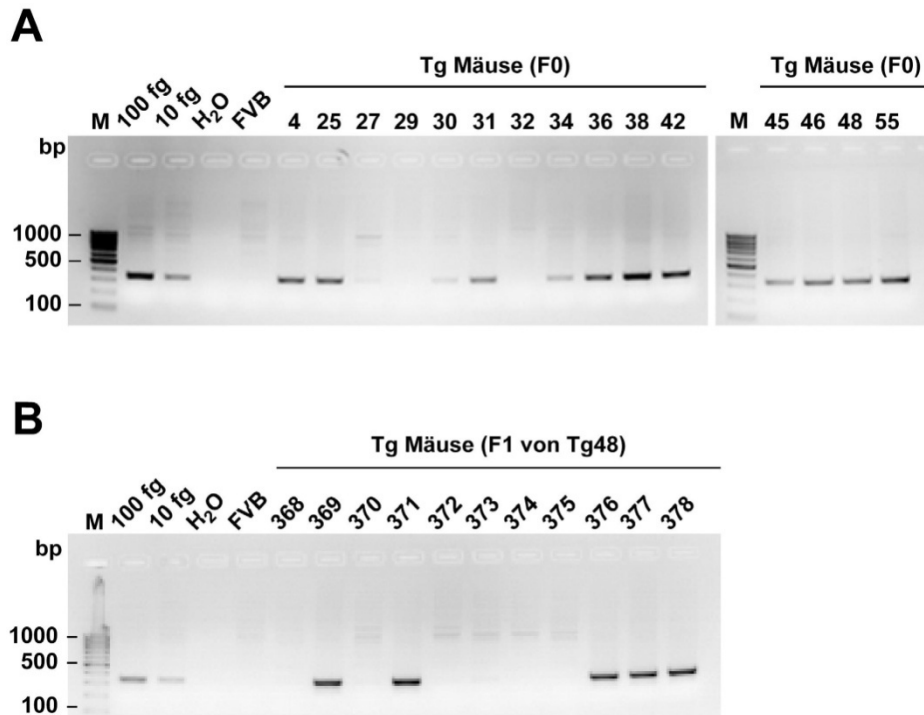
### **2.1.1 Teil 1A - Generierung eines Mausmodells für die GSS-Mutante Q160X**

Im Zellkulturmodell durchgeführte Studien zeigten, dass die pathogene, mit GSS assoziierte C-terminale Deletionsmutante Q160X nur partiell ins ER importiert wird, während eine Fraktion des Proteins im Zytosol vorliegt und Apoptose induziert (Heske et al., 2004, Rambold et al., 2006). Um diese Daten anhand eines Mausmodells *in vivo* zu verifizieren, sollte die PrP-Mutante Q160X transgen in Mäusen überexprimiert werden. Darüber hinaus sollte mit diesem Tiermodell der Mechanismus, der zur Neurodegeneration von zytosolisch lokalisierten Formen von PrP führen könnte, genauer geklärt werden. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass Q160X im Mensch einen dominanten Erbgang aufweist, was bedeutet, dass die Expression von Q160X offensichtlich einen toxischen Effekt hat.

Für die Generierung des GSS-Mausmodells wurde das der murinen AS-Sequenz von PrP entsprechende Äquivalent Q159X verwendet. Parallel zur PrP-Q159X Maus wurden auch zwei transgene Mauslinien generiert, die humanes Parkin (hP) und eine Stop-Mutante von Parkin (W453X) überexprimieren sollten.

#### **2.1.1.1 Generierung einer PrP-Q159X überexprimierenden transgenen Mauslinie**

Für die Expression in transgenen Mäusen musste das DNA-Konstrukt für murines PrP-Q159X zuerst in den sogenannten halb genomischen phgMmPrP Vektor kloniert werden (Fischer et al., 1996, siehe Abschnitt 6.1.3, Abb. 49). Dieser enthält mit Ausnahme des Introns 2 nahezu das komplette murine *Prnp* mit dem endogenen murinen PrP-Promoter, der zu einer hohen Expression im Gehirn führt. Nach erfolgter Mikroinjektion des aufgereinigten phgMm-Q159X Konstrukts in Zygoten aus FVB Mäusen (durchgeführt von Michael Bösl vom Max-Planck-Institut für Biochemie) konnten 62 Foundertiere (27 Weibchen und 35 Männchen) der F0-Generation erhalten werden. Diese mussten einer Genotypisierung unterzogen werden, um jene Mäuse zu identifizieren, die das Transgen per Injektion ins Genom integriert haben. Die Analyse mittels sequenzspezifischer PCR ergab 13 positive Mäuse (8 Weibchen und 5 Männchen) (Abb.19A).



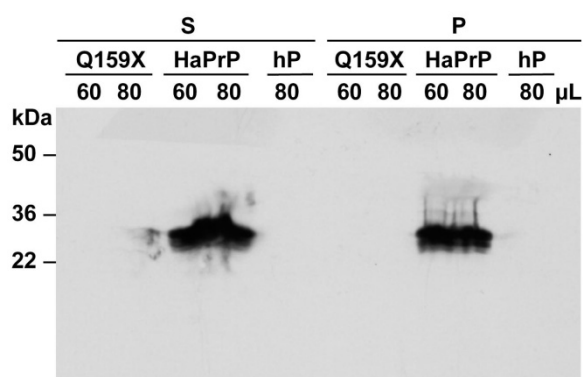
**Abb. 19. Mäuse haben die transgene DNA per Mikroinjektion aufgenommen und in die Keimbahn integriert.** Agarosegelfoto der Genotypisierung ausgewählter Mäuse der F0 Generation (**A**) sowie der Genotypisierung der Nachkommen (F1) der positiv getesteten Linie 48 (**B**). Nach Entnahme einer Schwanzbiopsie und Präparation genomischer DNA wurde mittels sequenzspezifischer PCR das Transgen (Tg) amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel geladen und analysiert. Als Positivkontrolle wurden direkt 10 fg und 100 fg des phgMm-Q159X Plasmids im Gemisch mit genomischer DNA aus Wildtyp FVB-Mäusen aufgetragen. Als Negativkontrolle diente H<sub>2</sub>O beziehungsweise genomische DNA von Wildtyp FVB-Mäusen (FVB). M, 100-Basenpaar (bp)-Marker.

Ausgehend von den positiv für das Transgen Q159X getesteten Tieren der F0 Generation wurden mehrere Mauslinien gezüchtet. Bei den daraus entstandenen positiv getesteten Mäusen der F1-Generation (Abb. 19B) geht man davon aus, dass die DNA in die Keimbahn integriert wurde, da das Transgen auf die Nachkommen weitervererbt werden konnte. Schließlich fanden mit diesen F1-Mäusen die ersten Untersuchungen zur Expression von Q159X statt.

#### 2.1.1.2 Analyse der Proteinexpression transgener Q159X-Mäuse

Für die Expressionsanalyse auf Proteinebene wurde Hirngewebe analysiert. Nach Lyse in 0,5% Triton X-100/0,5% Deoxycholat (DOC) wurden die daraus gewonnenen Proteinextrakte mittels Western Blot unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers (mAb) 3F4 analysiert. Als Positivkontrolle diente eine Hamster-PrP überexprimierende Maus (HaPrP), die

freundlicherweise von Herrn Prof. Kretzschmar zur Verfügung gestellt wurde. Hamster-PrP weist das gleiche Epitop auf, das auch im transgenen Konstrukt artifiziell vorhanden ist und welches mittels mAb 3F4 detektiert werden kann (Kacsak et al., 1987). Im Gegensatz dazu kann endogen vorhandenes Maus-PrP von diesem Antikörper nicht erkannt werden. Als Negativkontrolle wurde ein Proteinextrakt aus Parkin überexprimierenden Mäusen inkludiert (hP). Die Western Blot Analyse ergab, dass nur HaPrP detektiert werden konnte, während bei der Q159X-Maus Tg377 keine Expression von Q159X beobachtet werden konnte (Abb. 20). Alle weiteren getesteten transgenen Linien zeigten ebenfalls keine Proteinexpression (Daten nicht gezeigt).

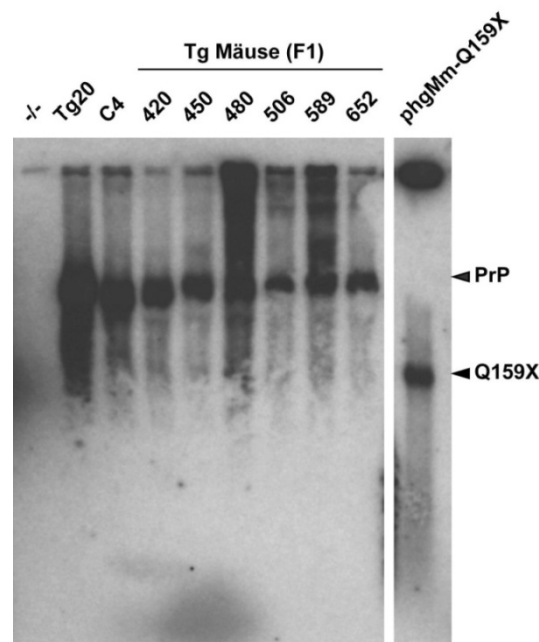


**Abb. 20. Q159X-Mäuse zeigen keine Überexpression des Transgens.** Hirngewebe aus Mäusen wurde in 0,5% Triton X-100/0,5% DOC lysiert und die gewonnenen Proteinextrakte mittels Immunblotting analysiert. Repräsentativ für die analysierten transgenen Q159X Mäuse der F1 Generation ist die Maus Tg377, ein Nachkomme der Maus Tg48, im Western Blot gezeigt (Q159X). Als Positivkontrolle wurde eine Hamster-PrP überexprimierende Maus analysiert (HaPrP). Als Negativkontrolle diente Hirngewebe aus transgenen Mäusen, die humanes Parkin überexprimieren (hP). Sowohl die Detergens-lösliche (S) als auch die Detergens-unlösliche (P) Fraktion der Proben wurde in zwei unterschiedlichen Mengen (60 und 80  $\mu$ L) aufgetragen. PrP wurde unter Verwendung des mAb 3F4 detektiert.

### 2.1.1.3 Analyse der mRNA-Levels transgener Q159X-Mäuse

Zellkulturstudien zeigten, dass Q159X nur teilweise ins ER importiert wird und eine Fraktion des Proteins im Zytosol vorliegt, wo sie proteasomal abgebaut wird (Heske et al., 2004). Das Transgen Q159X konnte zwar auf DNA- nicht aber auf Proteinebene detektiert werden. Eine Erklärung dafür könnte die schnelle Degradierung des Proteins oder die verhinderte Transkription der DNA sein. Um dies zu analysieren, wurde die Q159X-mRNA mittels Northern Blotting untersucht.

Die für die Northern Blot Analyse benötigte RNA wurde aus Hirngewebe isoliert und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Nach erfolgtem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde sie mit einer radioaktiv markierten, sequenzspezifischen Sonde, die neben der Stop-Mutante Q159X auch endogenes PrP erkennt, detektiert. Als Positivkontrollen wurden eine PrP überexprimierende Maus (Tg20) sowie eine transgene PrP $\Delta$ 32-94-Maus verwendet (C4). Letztere zeigt eine Überexpression von PrP, bei dem die Repeat-Region (AS 32-94) deletiert wurde. Als Negativkontrolle diente eine PrP *knockout* Maus (-/-). Diese drei Mäuse wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Kretzschmar zur Verfügung gestellt. Des Weiteren wurde das Plasmid phgMm-Q159X direkt auf das RNA-Gel aufgetragen. Abbildung 21 zeigt einen repräsentativen Northern Blot. Die mRNA von PrP konnte bei der PrP überexprimierenden Maus (Tg20) und den analysierten transgenen Mäuse detektiert werden. Wie erwartet wies die PrP *knockout* Maus (-/-) keine endogene PrP-mRNA auf. Die Analyse der transgenen PrP $\Delta$ 32-94-Maus (C4) ergab eine mRNA-Bande, die eine leicht erhöhte Mobilität auf dem Agarosegel zeigte, was darauf zurückzuführen ist, dass in diesem Konstrukt die Oktarepeat-Region fehlt. Das Plasmid phgMm-Q159X wurde erwartungsgemäß ebenfalls von der radioaktiv markierten Sonde erkannt. Im Gegensatz dazu konnte bei allen getesteten transgenen Mäusen der F1-Generation jedoch zusätzlich zur endogenen PrP-mRNA keine mRNA des Transgens gefunden werden. Diese Resultate deuten darauf hin, dass in den generierten Mäusen aus der integrierten Q159X-DNA keine mRNA gebildet wurde und die fehlende Proteinexpression darauf zurückzuführen ist.



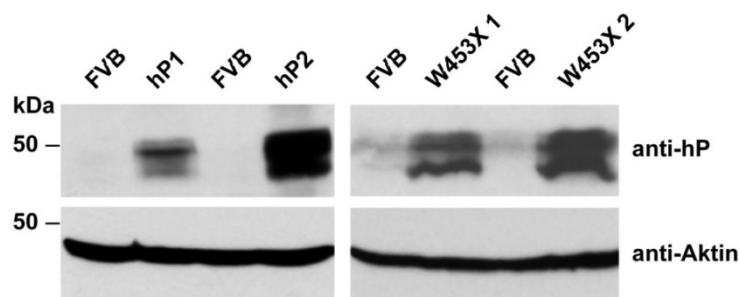
**Abb. 21. Transgene Mäuse bilden keine Q159X-mRNA.** Repräsentative Northern Blot Analyse verschiedener Mauslinien der F1-Generation. Die benötigte RNA wurde aus Hirngewebe isoliert und auf ein Agarosegel geladen. Nach erfolgreichem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde die RNA mit einer radioaktiv markierten, sequenzspezifischen Sonde inkubiert, die neben der Stop-Mutante Q159X auch PrP detektieren kann. Als Kontrollen dienten eine PrP *knockout* Maus (-/-), sowie eine PrP überexprimierende Maus (Tg20) und eine Maus, die PrP ohne die Oktarepeat-Region (AS 32-94) überexprimiert (C4). Zusätzlich wurde als Positivkontrolle das für die Mikroinjektion der Mäuse verwendete Plasmid phgMm-Q159X direkt auf das RNA-Gel aufgetragen.

#### 2.1.1.4 Zusammenfassung

Zusammenfassend ergaben die gezeigten Daten, dass die generierten Mäuse das Transgen Q159X auf DNA-Ebene in ihre Keimbahn integrieren und auf ihre Nachkommen weitergeben konnten. Es konnte jedoch weder mRNA noch überexprimiertes Protein detektiert werden. Eine Erklärung hierfür könnte die zufällige Integration der DNA ins Heterochromatin, einem transkriptionell inaktiven Bereich des Chromatins, in dem die DNA dicht gepackt vorliegt, sein. Dies hätte zur Folge, dass die DNA zwar ins Genom integriert, dort aber nicht transkribiert wird. Des Weiteren könnte die Toxizität des Transgens ein Problem dargestellt haben. Wie bereits in Zellkulturstudien gezeigt werden konnte, führt die Expression des Proteins Q159X zu Apoptose neuronaler Zellen (Rambold et al., 2006). Es könnte also auch

eine negative Selektion stattgefunden haben, sodass nur jene transgene Mausembryonen überlebt haben, die das Protein nicht exprimieren.

Dass die fehlende Expression von Q159X vermutlich nicht auf technische Probleme zurückzuführen ist, zeigen die Ergebnisse der parallel generierten transgenen Parkin-Mäuse. Die Mäuse, die humanes Parkin (hp) und eine Stop-Mutante (W453X) überexprimieren, wurden analog zu den PrP-Q159X Mäusen unter Verwendung des gleichen Expressionsvektors und identischer Bedingungen generiert. Der in Abbildung 22 dargestellte Western Blot zeigt deutlich, dass diese Mäuse das Transgen im Gehirn exprimieren. Darüberhinaus konnten erfolgreich jeweils mehrere Mauslinien mit unterschiedlichen Expressionslevels erhalten werden (Abb. 22, hP1 und hP2, W453X 1 und W453X 2). Diese Resultate sollen veranschaulichen, dass die verwendete Strategie zur Generierung transgener Mäuse richtig gewählt wurde und die Durchführung grundsätzlich funktioniert hat. Die fehlende Expression von Q159X ist daher wahrscheinlich auf intrinsische Faktoren des Transgens zurückzuführen.



**Abb. 22. Transgene Parkin-Mäuse exprimieren Parkin (hP) und die Stop-Mutante W453X in unterschiedlichen Mengen.** Hirngewebe aus Mäusen wurde in 0,5% Triton X-100/0,5% DOC lysiert und die gewonnenen Proteinextrakte mittels Immunblotting analysiert. Als Negativkontrolle diente Hirngewebe von Wildtyp FVB-Mäusen (FVB). Die Detektion von humanem Parkin (hP) und der Stop-Mutante W453X erfolgte unter Verwendung des pAb anti-hP. Jeweils zwei unterschiedliche Mauslinien (1 und 2) wurden analysiert. Aktin wurde mittels mAb anti-Aktin nachgewiesen und diente als Ladekontrolle für gleiche Proteinmengen. Die gezeigten Western Blot Analysen wurden von Frau Anita Schlierf durchgeführt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

### **2.1.2 Teil 1B - Analyse der intrinsischen und zellulären Faktoren, die für eine effiziente Translokation von PrP ins ER notwendig sind**

Eine ineffiziente Translokation von PrP oder PrP-Mutanten ins ER und damit verbundene Fehllokalisierung im Zytosol können zu neurotoxischen PrP-Spezies führen (vgl. Abschnitt 1.4.2). Zusätzlich konnte vor kurzem gezeigt werden, dass die Regulation der Translokation einen generellen Qualitätskontroll-Mechanismus der Zelle darstellt, um nicht-native Proteine frühestmöglich dem proteasomalen Abbau zuzuführen (vgl. Abschnitt 1.5.3.4). Diese sogenannte kotranslokationale Qualitätskontrolle (cQC) scheint ein alternativer Mechanismus zur ER-assoziierten Degradierung (ERAD) zu sein, bei der Proteine erst ins ER importiert und, falls fehlgefaltet, ins Zytosol zurücktransportiert werden, um dort proteasomal abgebaut zu werden. Noch ist sehr wenig über die cQC und die Faktoren, die sie beeinflussen, bekannt. Bisherige Studien haben ergeben, dass das Signalpeptid der naszierenden Polypeptide vor allem unter ER-Stressbedingungen wichtig für eine effiziente Translokation ist (Kang et al., 2006). Neben der Signalsequenz könnte aber auch der Faltungszustand der naszierenden Polypeptidkette ein möglicher Modulator des ER-Imports sein. Die Ausbildung von Sekundärstrukturen konnte bereits im ribosomalen Exit-Tunnel beobachtet werden (Lu und Deutsch, 2005b; Woolhead et al., 2004; Mingarro et al., 2000; Whitley et al., 1996). Des Weiteren ergab eine Studie, dass die Translokation durch die Sekundärstruktur von sich noch im Ribosom befindlichen Bereichen der naszierenden Kette moduliert werden kann. Es wurde gezeigt, dass die Sekundärstruktur im ribosomalen Exit-Tunnel die zeitliche Steuerung beeinflusst, mit der zuvor gebildete Domänen des untersuchten Transmembranproteins Kontakt zum Translokon herstellen und durch die Pore transloziert werden (Daniel et al., 2008).

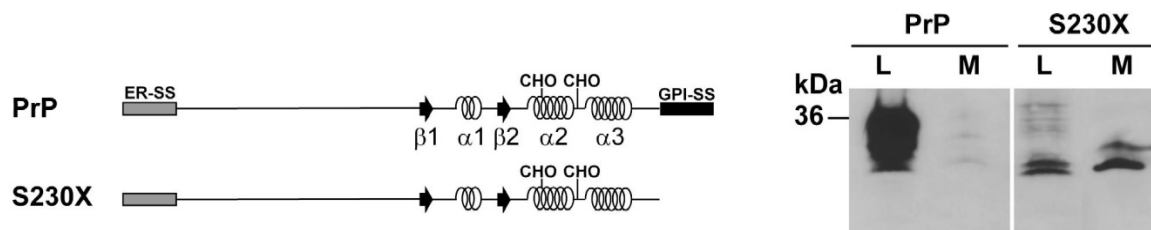
PrP ist ein interessantes Modellprotein, um zu untersuchen, ob die Sekundärstruktur die Translokationseffizienz modulieren kann, da es eine außergewöhnliche, modulare Struktur besitzt. Der N-terminale, 120 AS lange Bereich von PrP ist flexibel und unstrukturiert während die 110 AS umfassende C-terminale Domäne globulär gefaltet ist und drei  $\alpha$ -Helices sowie ein kurzes  $\beta$ -Faltblatt beinhaltet (Riek et al., 1996; Riek et al., 1997, siehe Abschnitt 1.2.5). Im Zellkulturmodell sollte anhand des Modellproteins PrP und verschiedener, neu generierter Konstrukte geklärt werden, ob die Sekundärstruktur der naszierenden Polypeptidkette den ER-Import modulieren kann. Darüber hinaus sollte die Rolle zellulärer Faktoren für die Translokation analysiert werden.



### 2.1.2.1 Die C-terminale GPI-Signalsequenz ist für den ER-Import entbehrlich, spielt aber eine Rolle bei der Umwandlung von mannosereichen Glykanen in komplexe Glykane

PrP besitzt eine N-terminale ER-SS (AS 1-22), die den kotranslationalen Import ins ER vermittelt, sowie zwei Konsensussequenzen für N-Glykosylierung (N180 und N196) und eine GPI-SS (AS 230-254) am C-Terminus (Stahl et al., 1987; Haraguchi et al., 1989). Im Golgi-Apparat werden die Kernglykane in komplexe Glykane umgewandelt und PrP wird an die Plasmamembran transportiert, wo es an der Außenseite GPI-verankert lokalisiert ist (vgl. Abschnitt 1.2.4).

Studien zeigten, dass PrP mit deletierter GPI-SS (S230X) von der Zelle effizient sekretiert, das heißt effizient ins ER importiert wird (Rogers et al., 1993, Kocisko et al., 1994, Winklhofer et al., 2003). Dies konnte durch die hier durchgeführte Analyse ebenfalls demonstriert werden. Die Expression von S230X in N2a Zellen ergab eine effiziente Sekretion ins Zellkulturmedium (M), während PrP als GPI-verankertes Protein nur im Lysat (L) detektiert werden konnte (Abb. 23). Dieses Ergebnis bestätigt den Befund, dass die Deletion der GPI-SS zwar die Verankerung des Proteins in der Membran verhindert, aber weder den Import in das ER noch den weiteren Transport durch den sekretorischen Biogeneseweg beeinträchtigt.

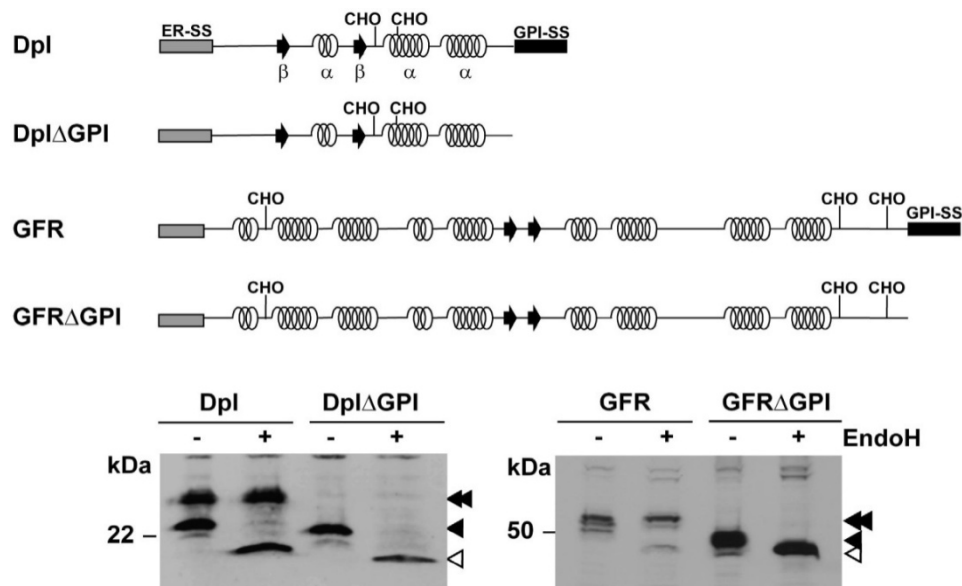


**Abb. 23. PrP mit deletierter GPI-SS (S230X) wird effizient ins ER importiert und sekretiert.** Links: schematische Darstellung der Konstrukte. ER-SS, ER-Signalsequenz;  $\alpha$  1-3,  $\alpha$ -Helices 1-3;  $\beta$  1 und 2,  $\beta$ -Faltblatt; gerade Linie, unstrukturierter Bereich; CHO, N-verknüpfte Glykosylierungsstelle; GPI-SS, GPI-Signalsequenz. Rechts: N2a Zellen wurden transient mit den gezeigten Konstrukten transfiziert. Proteine im Zelllysate (L) und im Zellkulturmedium (M) wurden mittels Western Blot unter Verwendung des mAb 3F4 detektiert.

Bei dieser Analyse konnten hinsichtlich der Maturierung von S230X zwei bereits beschriebene Phänomene verifiziert werden (Winklhofer et al., 2003). Einerseits ist im Gegensatz zu PrP das Ausmaß der Glykosylierung bei fehlendem GPI-Anker stark

vermindert. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Tatsache sein, dass die Konsensussequenzen für N-Glykosylierung durch Deletion der GPI-SS relativ nah am C-terminalen Ende des Proteins lokalisiert sind, sodass sie nicht mehr so effizient von der Oligosaccharyltransferase modifiziert werden können (Whitley et al., 1996). Darüber hinaus konnten bei S230X im Gegensatz zu PrP keine komplex modifizierten Glykane detektiert werden.

Um der Frage nachzugehen, ob die Deletion der GPI-SS generell bei Glykoproteinen dazu führt, dass keine komplexe Glykosylierung erfolgt, wurden die GPI-verankerten Proteine Doppel (Dpl) und GDNF-Rezeptor  $\alpha$  (GFR) in die Analyse miteinbezogen. Zur Unterscheidung zwischen komplexen und mannosereichen Glykanen wurde ein Endoglykosidase H (EndoH)-Verdau der Zelllysate durchgeführt. Das Enzym EndoH aus *Streptomyces plicatus* spaltet spezifisch zwischen zwei N-Acetyl-Glucosamin-Resten, mit denen mindestens fünf Mannoseeinheiten verknüpft sind. Somit können mittels EndoH nur die Glykane, die in einer mannosereichen Form vorliegen abgespalten werden, während komplex glykosylierte Strukturen nicht verdaut werden können (vgl. Abschnitt 1.5.2, Robbins et al., 1984; Maley et al., 1989). Wie in Abbildung 24 ersichtlich, ändert bei beiden Vollängen-Proteinen (Dpl, GFR) die oberste Bande ihr elektrophoretisches Laufverhalten nach EndoH-Behandlung nicht, was ein Indiz dafür ist, dass diese Proteine EndoH-resistent und daher komplex glykosyliert werden (doppelte Pfeilspitze).

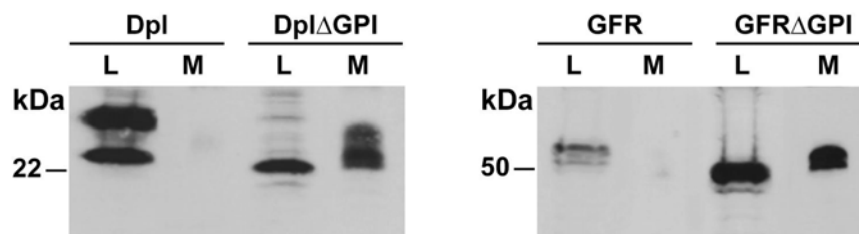


**Abb. 24. Die GPI-Verankerung ist für die Ausbildung von Glykanen mit komplexer Struktur notwendig.** N2a Zellen wurden transient mit den darüber gezeigten Konstrukten transfiziert und das Zelllysate mit EndoH behandelt oder unbehandelt analysiert ( $\pm$ EndoH).

Die Proteinexpression wurde unter Verwendung des anti-Dpl Antiserums (Dpl, Dpl $\Delta$ GPI) sowie des pAb anti-GFR $\alpha$  (GFR, GFR $\Delta$ GPI) untersucht. Doppelte Pfeilspitzen markieren die komplex glykosylierte Proteinfraktion, geschlossene Pfeilspitzen die mannosereiche Spezies und offene Pfeilspitzen unglykosylierte Proteine.

Bei den korrespondierenden Mutanten mit deletierter GPI-SS (Dpl $\Delta$ GPI, GFR $\Delta$ GPI) liegt jedoch ausschließlich eine EndoH-sensitive, also mannosereiche Fraktion der Proteine vor (geschlossene Pfeilspitze). Die N-verknüpften Glykane von Dpl $\Delta$ GPI und GFR $\Delta$ GPI werden also offensichtlich nicht in komplexe Strukturen umgewandelt. Dass eine fehlende Membranverankerung mit der komplexen Glykosylierung interferiert, scheint demzufolge nicht nur für PrP, sondern auch für andere GPI-verankerte Proteine wie Dpl oder GFR zuzutreffen.

Interessanterweise wurden trotz der fehlenden komplexen Glykosylierung sowohl Dpl $\Delta$ GPI als auch GFR $\Delta$ GPI von den Zellen effizient ins Zellkulturmedium sekretiert (Abb. 25, M). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die fehlende GPI-Verankerung von Dpl und GFR wie bei PrP mit der komplexen Glykosylierung, nicht aber mit effizientem ER-Import und dem weiteren Transport durch den sekretorischen Biogeneseweg interferiert.



**Abb. 25. Proteine mit deletierter GPI-SS werden effizient ins ER importiert.** N2a Zellen wurden transient mit den angegebenen Konstrukten transfiziert. Proteine im Zelllysat (L) und im Zellkulturmedium (M) wurden mittels Western Blot unter Verwendung des anti-Dpl Antiserums (Dpl, Dpl $\Delta$ GPI) beziehungsweise des pAb anti-GFR $\alpha$  (GFR, GFR $\Delta$ GPI) untersucht.

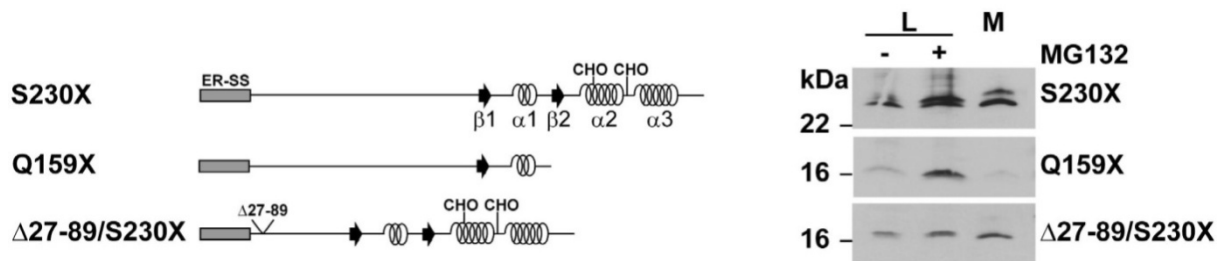
Die Tatsache, dass Proteine mit deletierter GPI-SS effizient ins ER transloziert werden, ist für die folgende Analyse der Regulation der Translokation wichtig, da alle weiteren in dieser Studie verwendeten Konstrukte ebenfalls ohne GPI-SS untersucht wurden. Studien zeigten

außerdem, dass die GPI-SS ein Signal für ER-Import sein kann (Gu et al., 2008, Holscher et al., 2001) weshalb dieses Signal für die weitere Analyse deletiert werden sollte.

### **2.1.2.2 $\alpha$ -helikale Bereiche sind wichtig für einen effizienten ER-Import**

Wie bereits erläutert, wird S230X erfolgreich in das ER importiert und sekretiert (Abb. 23, S230X, M). Interessanterweise führte jedoch die Deletion eines Teils der  $\alpha$ -helikalen Bereiche im C-Terminus von PrP zu einem verminderten ER-Import. In einer bereits früher durchgeführten Studie konnte gezeigt werden, dass die pathogene, mit GSS in Zusammenhang stehende, PrP-Mutante Q159X, der die  $\alpha$ -Helices 2 und 3 fehlen, nicht effizient in das ER importiert wird sondern partiell im Zytosol vorliegt (Heske et al., 2004; Zanusso et al., 1999). Diese Daten konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Die Western Blot Analyse von Q159X zeigte, dass im Vergleich zu S230X kaum Sekretion ins Zellkulturmedium erfolgt (Abb. 26, Q159X, M). Es konnte nur eine schwache Bande im Zelllysat detektiert werden. Um zu klären, ob Q159X im Zytosol vorliegt und proteasomal abgebaut werden kann, wurde das Proteasom transient mit dem Inhibitor MG132 gehemmt. Die Inkubation für 3 h mit MG132 führte tatsächlich dazu, dass die relative Menge von Q159X im Lysat zunahm (Abb. 26, Q159X, L  $\pm$  MG132). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Q159X nicht vollständig in das ER importiert wird, sondern partiell im Zytosol auftritt, wo es proteasomaler Degradierung unterliegt.

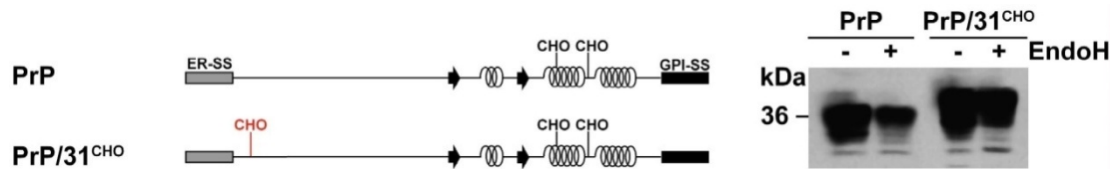
Um herauszufinden, ob die verkürzte Länge von Q159X für den verminderten ER-Import und den vermehrten proteasomalen Abbau verantwortlich ist, wurde eine weitere PrP-Mutante in die Analyse inkludiert. In  $\Delta$ 27-89/S230X wurde der N-terminale, unstrukturierte Teil von PrP (AS 27-89) deletiert. Dies führt dazu, dass diese Mutante zwar eine ähnliche Länge verglichen mit Q159X hat, jedoch noch den gesamten  $\alpha$ -helikalen Bereich beinhaltet. Die Western Blot Analyse ergab, dass  $\Delta$ 27-89/S230X effizient in den Zellkulturüberstand sekretiert und nicht proteasomal abgebaut wird (Abb. 26,  $\Delta$ 27-89/S230X). Das Vorhandensein des  $\alpha$ -helikalen, C-terminalen Bereichs von PrP scheint somit den Import in das ER stark zu verbessern. Fehlt dieser Bereich, wie im Fall der untersuchten Mutante Q159X, kann diese nicht mehr effizient ins ER importiert werden und unterliegt einem proteasomalen Abbau im Zytosol.



**Abb. 26. Das Vorhandensein  $\alpha$ -helikaler Bereiche ist für einen effizienten ER-Import wichtig.** Links: Schematische Darstellung der transfizierten Konstrukte. Rechts: N2a Zellen wurden transient mit den links gezeigten Konstrukten transfiziert und PrP im Zelllysat (L) und im Zellkulturmedium (M) mittels Western Blot unter Verwendung des mAb 3F4 untersucht. Für die Analyse des Lysats wurden die Zellen vor der Lyse in An- oder Abwesenheit des proteasomalen Inhibitors MG132 für 3 h bei 37°C inkubiert ( $\pm$ MG132).

### 2.1.2.3 Die Einführung einer zusätzlichen N-terminalen Konsensussequenz für N-Glykosylierung erleichtert die Analyse des ER-Imports

Um die weitere Analyse des ER-Imports zu erleichtern, wurde N-terminal direkt nach der ER-SS eine zusätzliche Akzeptorstelle für N-verknüpfte Glykosylierung eingefügt. Mittels PCR wurden die Aminosäuren W31 und N32 gegen die Aminosäuren N und F ausgetauscht, wodurch das Glykosylierungsmotiv N-F-T generiert wurde. Um festzustellen, ob dieses zusätzliche Motiv von der Oligosaccharyltransferase (siehe Abschnitt 1.5.2) erkannt und genutzt wird, wurden PrP sowie PrP mit dem zusätzlichen Glykosylierungsmotiv (PrP/31<sup>CHO</sup>) parallel in N2a Zellen transfiziert und nach EndoH-Verdau des Lysats mittels Western Blotting analysiert. PrP/31<sup>CHO</sup> weist im Vergleich zu PrP ein reduziertes Laufverhalten auf dem SDS-Gel auf, was darauf hindeutet, dass eine zusätzliche Glykosylierung vorliegt. Ein Verdau mit EndoH hatte kein verändertes Laufverhalten der Banden während der SDS-Elektrophorese zur Folge, was ein Indiz dafür ist, dass die Glykane an der Position N31 analog zu N180 und N196 EndoH-resistent und daher komplex glykosyliert sind (Abb. 27). Diese Daten lassen erkennen, dass die neu eingefügte Akzeptorstelle funktionell ist und komplex glykosyliert werden kann. Die zusätzliche Glykosylierung scheint außerdem nicht mit dem zellulären Transport von PrP an die Plasmamembran zu interferieren.

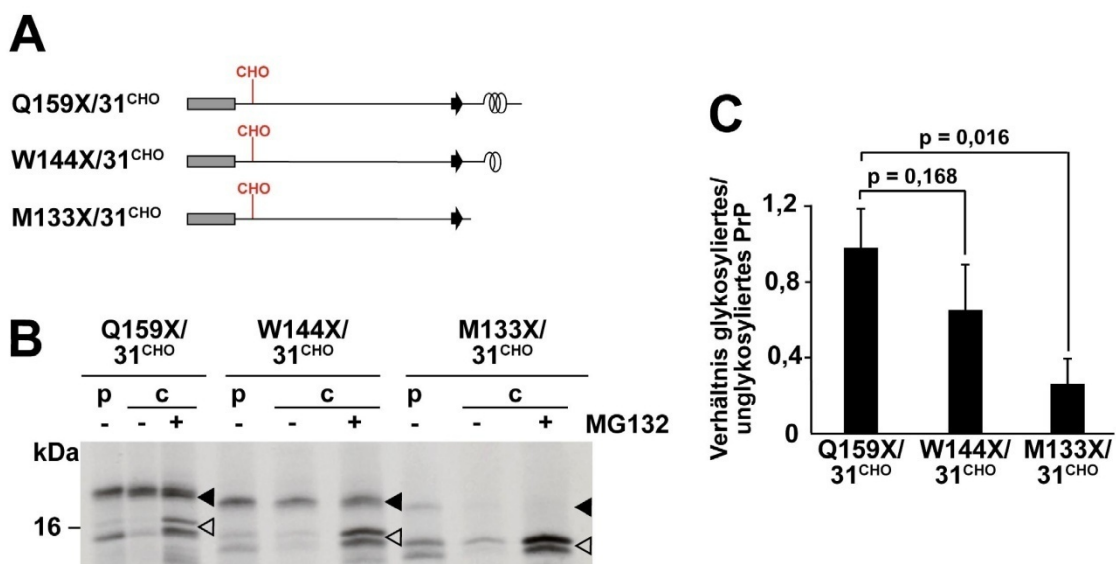


**Abb. 27. Die zusätzlich eingefügte Akzeptorstelle für N-verknüpfte Glykosylierung ist funktionell und wird komplex glykosyliert.** Links: schematische Darstellung der transfizierten Konstrukte. Die zusätzliche Glykosylierungsstelle (CHO) an der AS-Position 31 ist rot markiert. Rechts: N2a Zellen wurden transient mit PrP oder PrP/31<sup>CHO</sup> transfiziert. Die Gesamtzelllysate wurden anschließend entweder mit EndoH behandelt oder unbehandelt gelassen (±EndoH). PrP wurde unter Verwendung des mAb 3F4 mittels Immunblotting detektiert.

In Folge wurde diese zusätzliche Akzeptorstelle für Glykosylierung auch in verschiedene C-terminale Deletionsmutanten, darunter Q159X, eingefügt. Dies erleichterte die Analyse des ER-Imports der Mutanten, denen aufgrund der Deletion die endogenen Glykosylierungsstellen fehlen. Die transient transfizierten Zellen wurden mittels <sup>35</sup>S-Methionin radioaktiv markiert und direkt (*pulse*, p) oder nach einstündiger Inkubation mit frischem Medium (*chase*, c) analysiert. Parallel wurden Zellen während der *pulse*- und *chase*-Phase mit 50 μM MG132 versetzt (+MG132). PrP im Lysat wurde mit dem mAb 3F4 immunpräzipitiert und mittels SDS-PAGE analysiert. Für Q159X/31<sup>CHO</sup> wurden zwei Fraktionen beobachtet: eine elektrophoretisch langsamer laufende Bande, die nach Inkubation mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 nicht stabilisiert werden konnte, was ein Indiz dafür ist, dass dies die glykosylierte Bande darstellt (Abb. 28, geschlossene Pfeilspitze), und eine elektrophoretisch schneller laufende Bande. Die relative Menge dieser Bande nahm nach Behandlung mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 zu, was darauf hindeutet, dass diese Fraktion im Zytosol vorliegt und vom Proteasom abgebaut wird (Abb. 28, offene Pfeilspitze, ±MG132). Dieses Ergebnis zeigte, dass Q159X/31<sup>CHO</sup> teilweise glykosyliert, also in das ER importiert werden kann, eine Fraktion des Proteins jedoch unglykosyliert im Zytosol vorliegt. Außerdem muss angemerkt werden, dass zwei distinkte unglykosylierte Banden beobachtet werden konnten. Wie später (Abschnitt 2.1.2.9) noch genauer erklärt wird, stellt dabei vermutlich die Bande mit dem höheren elektrophoretischen Laufverhalten jene Fraktion von Q159X/31<sup>CHO</sup> dar, die eine geschnittene Signalsequenz hat. Die unglykosylierte Proteinfraction, bei der das Signalpeptid nicht prozessiert wurde, ist etwas größer und läuft daher etwas langsamer auf dem SDS-Gel.

### 2.1.2.4 Die Effizienz des ER-Imports korreliert mit der Ausdehnung der $\alpha$ -helikalen Bereiche

Um weitere Hinweise zu erhalten, dass die C-terminalen,  $\alpha$ -helikalen Bereiche von PrP wichtig für einen effizienten ER-Import sind, wurden zusätzlich zu Q159X/31<sup>CHO</sup> die Mutanten W144X/31<sup>CHO</sup> und M133X/31<sup>CHO</sup>, denen größere Teile des C-Terminus fehlen, generiert (Abb. 28A). Nach transients Transfektion der Konstrukte wurden die Zellen mittels <sup>35</sup>S-Methionin radioaktiv markiert und direkt (*pulse*, p) oder nach Inkubation mit frischem Medium (*chase*, c) analysiert. Parallel wurden Zellen während der *pulse*- und *chase*-Phase mit 50  $\mu$ M MG132 versetzt (+MG132). PrP wurde mit dem mAb 3F4 immunpräzipitiert und mittels SDS-PAGE analysiert. Die Analyse ergab, dass bei Q159X/31<sup>CHO</sup> noch deutlich eine glykosylierte Fraktion detektiert werden konnte, wohingegen dies für W144X/31<sup>CHO</sup> nur mehr in geringerem Maße und für M133X/31<sup>CHO</sup> kaum mehr der Fall war (Abb. 28B, geschlossene Pfeilspitzen). Nach Hemmung des Proteasoms konnte bei den analysierten Proteinen die unglykosylierte Fraktion (Abb. 28B, offene Pfeilspitze, +MG132) stabilisiert und deutlich auf dem SDS-Gel nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass die verminderte beziehungsweise fehlende glykosylierte Fraktion nicht aufgrund verminderter Proteinsynthese zustande kam. Der Vergleich der untersuchten Mutanten ergab, dass mit der Abnahme der Menge an  $\alpha$ -helikalen Bereichen das Ausmaß der Glykosylierung, und damit auch die Effizienz des ER-Imports abnimmt. Die Quantifizierung der Ergebnisse verdeutlicht, dass die Glykosylierungseffizienz invers mit der Größe der C-terminalen Deletion korreliert (Abb. 28C).



**Abb. 28. Die Effizienz des ER-Imports korreliert mit der Länge der  $\alpha$ -helikalen Bereiche. (A)** Schematische Darstellung der C-terminalen Deletionsmutanten. **(B)** N2a

Zellen wurden transient mit den gezeigten Konstrukten transfiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen 1 h mit [<sup>35</sup>S]-Methionin radioaktiv markiert und direkt (*pulse*, p) oder nach einstündiger Inkubation mit frischem Medium (*chase*, c) analysiert. Parallel wurden Zellen während der *pulse*- und *chase*-Phase mit 50 µM MG132 versetzt (+MG132). PrP wurde mit dem mAb 3F4 immunpräzipitiert und mittels SDS-PAGE analysiert. Der hier gezeigte repräsentative Versuch wurde von Frau Dr. Sophia Kiachopoulos durchgeführt. Offene Pfeilspitzen markieren die unglykosylierte, geschlossene Pfeilspitzen die glykosylierte Fraktion. **(C)** Drei unabhängige Versuche wurden quantifiziert und das Verhältnis der glykosylierten zur unglykosylierten Proteinfraction des *chase* + MG132 aufgetragen. Mittels studentischen t-Tests wurden die p-Werte ermittelt.

#### 2.1.2.5 $\alpha$ -helikale Bereiche sind für einen effizienten ER-Import ausreichend

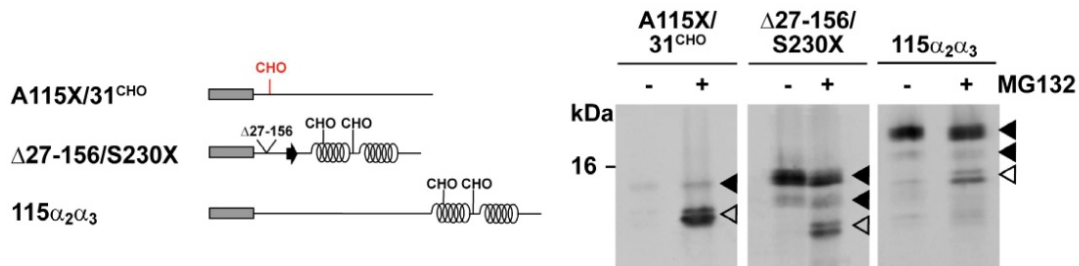
Um zusätzliche Evidenzen zu erhalten, dass der verminderte ER-Import der C-terminalen Deletionsmutanten auf das Fehlen  $\alpha$ -helikaler Strukturen im C-Terminus und nicht auf die verkürzte Länge der Mutanten zurückzuführen ist, wurden die Konstrukte A115X/31<sup>CHO</sup> und  $\Delta$ 27-156/S230X generiert. Diese Mutanten sind 114 beziehungsweise 100 AS lang. Während A115X/31<sup>CHO</sup> jedoch den N-terminalen Bereich von PrP umfasst und somit völlig unstrukturiert vorliegt, ist  $\Delta$ 27-156/S230X von  $\alpha$ -helikalen Bereichen dominiert (Abb. 29)

Eine Expression in N2a Zellen und die anschließende Immunpräzipitation der radioaktiv markierten Proteine zeigte, dass A115X/31<sup>CHO</sup> kaum detektiert werden konnte (Abb. 29). Erst nach Inhibition des Proteasoms konnte eine Bande nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass A115X/31<sup>CHO</sup> einem raschen proteasomalem Abbau unterliegt (offene Pfeilspitze). Dahingegen konnte  $\Delta$ 27-156/S230X bereits in den unbehandelten Zellen nachgewiesen werden (-MG132). Es konnten zwei Banden detektiert werden, die nach Hemmung des Proteasoms nicht stabilisiert werden konnten, was ein Indiz dafür ist, dass es sich dabei um die mono- und diglykosylierten Banden der Mutante handeln könnte (geschlossene Pfeilspitzen). Während also  $\Delta$ 27-156/S230X offensichtlich effizient glykosyliert und damit in das ER importiert wird, zeigt die annähernd gleich lange, aber unstrukturierte Mutante A115X/31<sup>CHO</sup> keinen produktiven Import in das ER sondern liegt im Zytosol vor und wird proteasomal abgebaut. Der markante Unterschied in der Translokationseffizienz zwischen den beiden Mutanten deutet darauf hin, dass die Länge des Polypeptids in Bezug auf die Translokation nicht ausschlaggebend ist.

Da angenommen werden kann, dass der  $\alpha$ -helikale Bereich ( $\alpha_2\alpha_3$ ) von PrP den ER-Import fördert, wurde diese  $\alpha$ -helikale Domäne an A115X fusioniert. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass in *in vitro* Experimenten gezeigt werden konnte, dass sich isolierte Peptidfragmente, die die Domäne  $\alpha_2\alpha_3$  von PrP beinhalten, strukturell autonom falten, das



heißt, dass sie unabhängig von der Umgebung des Gesamtproteins eine  $\alpha$ -helikale Konformation annehmen (Eberl und Glockshuber, 2002; Gallo et al., 2005). In der Tat stellte die Fusion der Helices an den unstrukturierten Teil von PrP den ER-Import wieder her.  $115\alpha_2\alpha_3$  wird ebenso effizient glykosyliert wie  $\Delta 27-156/S230X$  (Abb. 29,  $115\alpha_2\alpha_3$ ).



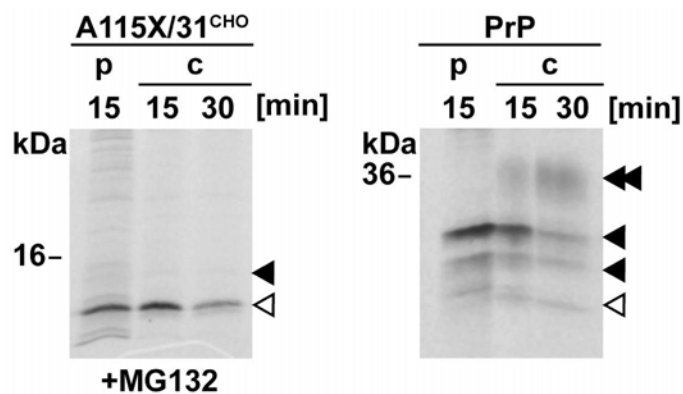
**Abb. 29.  $\alpha$ -helikale Domänen sind für die Translokation in das ER notwendig.** Neuroblastomzellen wurden transient mit den dargestellten Konstrukten transfiziert und 24 h später für 1 h radioaktiv markiert. Nach einstündiger Inkubation im frischen Medium in An- oder Abwesenheit des proteasomalen Inhibitors MG132 ( $\pm$ MG132) wurden die Zellen geerntet, lysiert und PrP im Zelllysat unter Verwendung des mAb 3F4 immunpräzipitiert sowie anschließend mittels SDS-PAGE analysiert. Offene Pfeilspitzen markieren die unglykosylierte, geschlossene Pfeilspitzen die mono- und diglykosylierte PrP-Fraktion.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Effizienz des ER-Imports mit dem Ausmaß an  $\alpha$ -helikalen Bereichen korreliert. Für eine erfolgreiche Translokation ist das Vorhandensein von  $\alpha$ -Helices, nicht aber die Länge des Polypeptids ausschlaggebend.

#### 2.1.2.6 A115X/31<sup>CHO</sup> wird offensichtlich kotranslokational degradiert

Wie bereits erklärt wurde, gibt es zwei Mechanismen der Qualitätskontrolle von ER-Proteinen. Die während oder noch vor der Translokation stattfindende kotranslokationale Qualitätskontrolle (cQC) scheint ein alternativer Mechanismus zu ERAD zu sein, bei der nicht-native Proteine erst im ER erkannt und von dort aus zurück ins Zytosol transportiert werden müssen, wo sie proteasomaler Degradierung unterliegen. Wie gezeigt wurde, konnte nur eine unglykosylierte Fraktion von A115X/31<sup>CHO</sup> nach Inhibition des Proteasoms gefunden werden. Es stellte sich die Frage, ob diese Mutante in das ER importiert und anschließend wieder exportiert wird oder ob sie noch vor einer vollständigen Translokation in das ER ins Zytosol geleitet und dort proteasomal abgebaut wird.

Um eine mögliche transiente Glykosylierung der Mutante zu analysieren, wurde eine sehr kurze radioaktive Markierung der Proteine durchgeführt. Transfizierte N2a Zellen wurden nur 15 min radioaktiv markiert (*pulse*) und anschließend für weitere 15 beziehungsweise 30 min in frischem Medium inkubiert (*chase*). Bei PrP, das hier als Kontrolle für ein effizient importiertes Protein diente, wurde bereits im *pulse* eine glykosylierte Fraktion beobachtet. Im *chase* wurden zusätzlich zu den mono- und diglykosylierten Fraktionen komplexe Glykane detektiert (Abb. 30, PrP, geschlossene, doppelte Pfeilspitzen). PrP wurde demnach in dem analysierten Zeitraum in das ER importiert, glykosyliert und weiter in den Golgi-Apparat transportiert, wo die Kernglykane in komplexe Glykane umgewandelt wurden. Hingegen kann bei A115X/31<sup>CHO</sup> in demselben Zeitraum nur eine unglykosylierte und keine glykosylierte Bande beobachtet werden (Abb. 30, offene Pfeilspitze). Dies deutet darauf hin, dass bei A115X/31<sup>CHO</sup> auch in einer sehr kurzen Zeitspanne keine Glykosylierung im ER stattgefunden hat, was vermuten lässt, dass diese Mutante nicht ins ER importiert wurde.



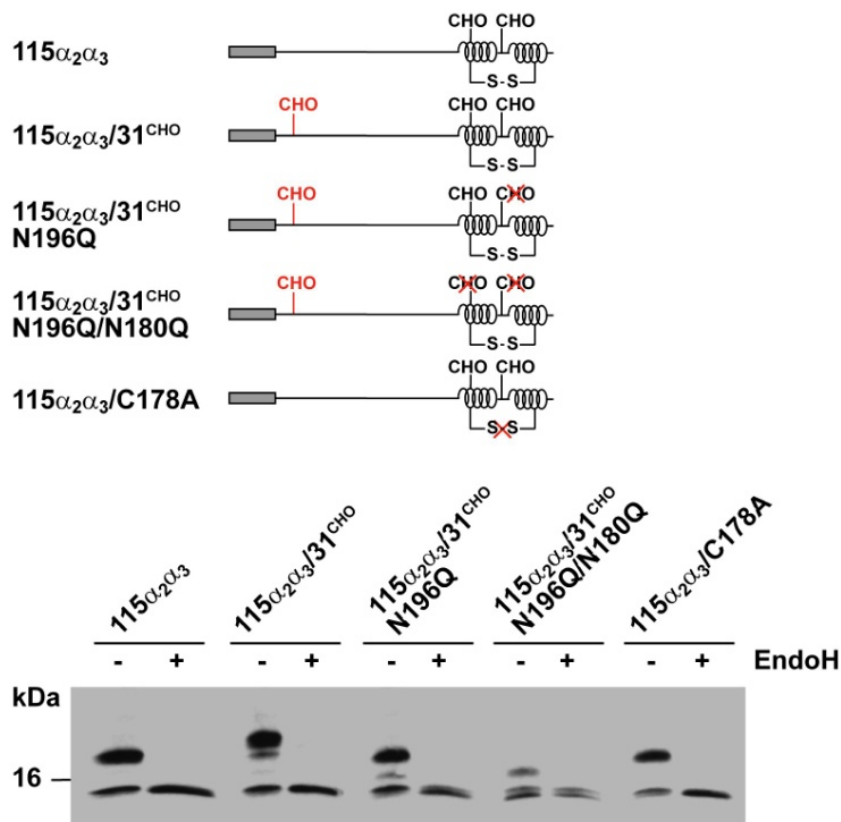
**Abb. 30. A115X/31<sup>CHO</sup> wird offensichtlich kotranslokational degradiert.** Transient transfizierte N2a Zellen wurden für 15 min radioaktiv mit [<sup>35</sup>S]-Methionin markiert und anschließend entweder direkt analysiert (*pulse*, p) oder für weitere 15 oder 30 min in unmarkiertem, frischem Medium inkubiert (*chase*, c). Die mit A115X/31<sup>CHO</sup> transfizierten Zellen wurden in Anwesenheit von 50  $\mu$ M MG132 inkubiert. Proteine wurden mit dem mAb 3F4 immunpräzipitiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Offene Pfeilspitze markiert die unglykosylierte PrP Spezies, geschlossene Pfeilspitzen die mono- und diglykosylierten und die doppelte Pfeilspitze die komplex glykosyliert auftretende Form von PrP.

#### 2.1.2.7 115 $\alpha_2\alpha_3$ wird unabhängig von einer N-verknüpften Glykosylierung und der Ausbildung einer Disulfidbrücke erfolgreich ins ER importiert

Um herauszufinden, ob N-verknüpfte Glykosylierungen oder die Ausbildung einer Disulfidbrücke eine Funktion im ER-Import von 115 $\alpha_2\alpha_3$  haben, wurden verschiedene

Mutanten, die in Abbildung 31 schematisch dargestellt sind, generiert. Zunächst wurden die C-terminalen Akzeptorstellen für N-Glykosylierung (N180, N196) mittels PCR-Techniken mutiert und stattdessen eine N-terminale Akzeptorstelle (N31) zur Detektion der Glykosylierung eingeführt. Die Western Blot Analyse der generierten Konstrukte ergab, dass die Deletion der C-terminalen Akzeptorstellen für N-Glykosylierung zu keinem verminderten ER-Import von  $115\alpha_2\alpha_3$  führte.  $115\alpha_2\alpha_3$ N196Q als auch  $115\alpha_2\alpha_3$ N196Q/N180Q wurden effizient glykosyliert, was durch EndoH-Verdau sichtbar gemacht wurde (Abb. 31).

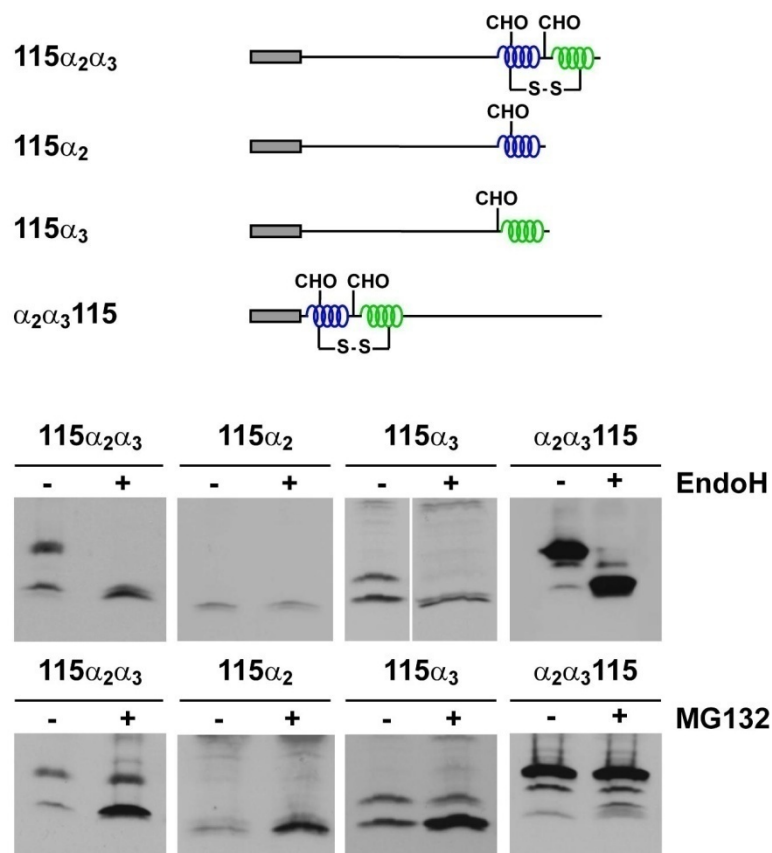
Anschließend wurde ein Cystein-Rest, der zur Ausbildung der Disulfidbrücke von PrP notwendig ist (C178), mittels PCR-Techniken mutiert, sodass keine Disulfidbrückenbildung mehr möglich ist. Wie in Abbildung 31 ersichtlich, konnte auch bei  $115\alpha_2\alpha_3$ C178A eine Glykosylierung beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass die Ausbildung einer Disulfidbrücke, genau wie die C-terminalen N-Glykosylierungen nicht für einen effizienten ER-Import notwendig sind.



**Abb. 31. ER-Import vom  $115\alpha_2\alpha_3$  ist unabhängig von der N-verknüpften Glykosylierung sowie der Ausbildung einer Disulfidbrücke.** Murine Neuroblastomzellen wurden transient mit den gezeigten Mutanten transfiziert. Das Zelllysat wurde in zwei Teile aufgeteilt, wobei ein Aliquot mit EndoH inkubiert wurde während das andere nicht behandelt wurde ( $\pm$ EndoH). Die PrP-Expression wurde mittels Western Blot unter Verwendung des mAb 3F4 analysiert.

### 2.1.2.8 Die Länge und möglicherweise die Lage der $\alpha$ -helikalen Domänen modulieren den ER-Import

Im nächsten Schritt wurde untersucht, wie groß der  $\alpha$ -helikale Bereich sein muss, um noch einen effizienten ER-Import von  $115\alpha_2\alpha_3$  zu gewährleisten. *In vitro* Experimente zeigten, dass isolierte Peptidfragmente der Helix 3 von PrP ( $\alpha_3$ ) unabhängig von der Gesamtstruktur des Proteins eine stabile  $\alpha$ -helikale Konformation einnehmen können, während die Stabilität der isolierten Helix 2 ( $\alpha_2$ ) reduziert ist (Gallo et al., 2005). Interessanterweise zeigten die hier durchgeführten Zellkulturexperimente, dass die isolierte Domäne  $\alpha_2$  nicht ausreichte, um eine effiziente Translokation zu ermöglichen. Die Western Blot Analyse von  $115\alpha_2$  ergab, dass diese Mutante kaum glykosyliert wurde, was für einen verminderten ER-Import spricht, und stattdessen im Zytosol proteasomalem Abbau unterlag. Im Gegensatz dazu wurde die Mutante  $115\alpha_3$ , die die Helix 3 von PrP ( $\alpha_3$ ) umfasst, teilweise glykosyliert, was indiziert, dass die isolierte Domäne  $\alpha_3$  in der Lage ist, die Translokation ins ER zu fördern (Abb. 32). Darüber hinaus scheint auch die Lage der  $\alpha$ -helikalen Bereiche innerhalb des Proteins den ER-Import zu beeinflussen.  $115\alpha_2\alpha_3$  wird etwas schwächer glykosyliert als die umgekehrt angeordnete Mutante  $\alpha_2\alpha_3115$ , bei der die  $\alpha$ -Helices direkt nach der ER-SS liegen (Abb. 32).



**Abb. 32.** Das Ausmaß der  $\alpha$ -helikalen Bereiche und möglicherweise die Lage der  $\alpha$ -Helices sind Faktoren für einen produktiven Import in das ER. N2a Zellen wurden

transient mit den gezeigten Konstrukten transfiziert und in An- oder Abwesenheit des proteasomalen Inhibitors MG132 (30  $\mu$ M, 3 h) inkubiert ( $\pm$ MG132). Die Gesamtzelllysate wurden mit EndoH inkubiert oder unbehandelt analysiert ( $\pm$ EndoH). PrP wurde mittels mAb 3F4 und Western Blotting detektiert. Im 115 $\alpha_3$ -Blot wurde die EndoH<sup>+</sup> Bande direkt neben die EndoH<sup>-</sup> Bande positioniert. Die Banden stammen jedoch von einem Gel.

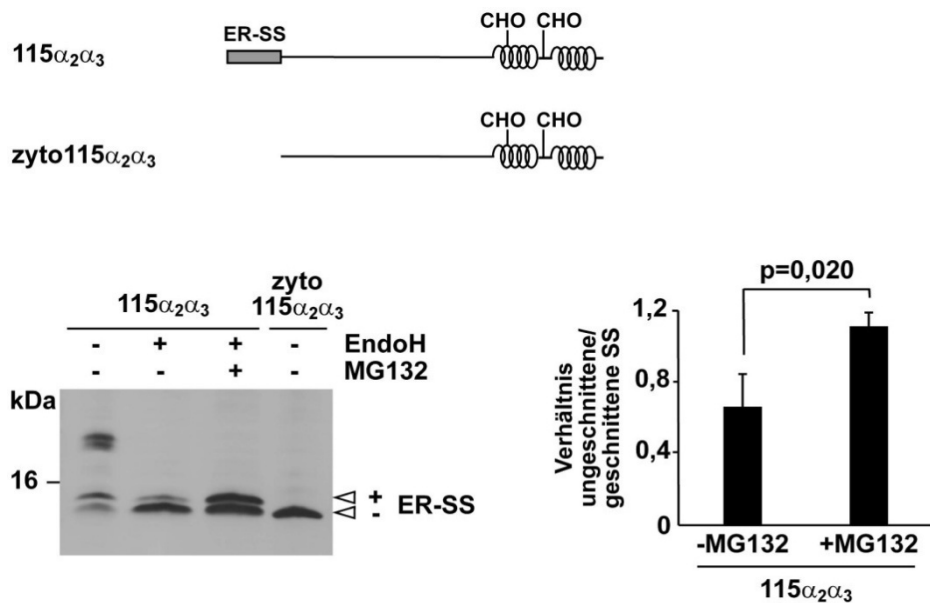
Diese Experimente bestätigen die Annahme, dass  $\alpha$ -helikale Domänen ein Signal für effizienten ER-Import sind. Die Ausdehnung und möglicherweise die Lokalisierung der  $\alpha$ -Helices innerhalb des Proteins beeinflussen die Produktivität der Translokation.

### **2.1.2.9 Eine unglykosylierte Fraktion von 115 $\alpha_2\alpha_3$ wird nicht in das ER importiert sondern kotranslokational degradiert**

Wie bereits im Abschnitt 1.5.1 erläutert, erfolgt die Abspaltung der N-terminalen ER-SS durch die Signalpeptidase während der Translokation des naszierenden Polypeptids in das ER. Die Degradierung nicht-nativer ER-Proteine über ERAD ist ein posttranslatinaler Vorgang, bei dem Proteine erst im ER als fehlgefaltet erkannt und anschließend retrotransloziert werden, um im Zytosol abgebaut zu werden. Im Gegensatz dazu findet der alternative Mechanismus der cQC noch vor oder während der Translokation des Polypeptids statt. Wie in mehreren Studien demonstriert werden konnte, wird bei Proteinen, die der cQC unterliegen und die daher nicht vollständig in das ER-Lumen gelangen, das Signalpeptid nicht abgespalten. Die Proteine mit ungeschnittener ER-SS werden indessen direkt ins Zytosol geleitet und dort proteasomal abgebaut (Oyadomari et al., 2006, Kang et al., 2006, Rutkowski et al., 2007).

Bei der Western Blot Analyse des Konstrukts 115 $\alpha_2\alpha_3$  konnte neben der glykosylierten, und daher in das ER importierten Fraktion, auch eine unglykosylierte Fraktion beobachtet werden. Bei genauerer Betrachtung der unglykosylierten Spezies konnten zwei distinkte Banden detektiert werden (Abb. 33). In Folge sollten diese unglykosylierten Spezies genauer untersucht werden. Nach Deglykosylierung des Zelllysats mit EndoH zeigte sich, dass die Menge der unteren, auf dem SDS-Gel schneller laufenden unglykosylierten Bande zunahm. Dies ist ein Indiz dafür, dass diese Bande, die von der glykosylierten Spezies stammt, vermutlich die Fraktion mit geschnittener Signalsequenz darstellt (Abb. 33, -ER-SS). Um diese Vermutung zu stützen, wurde die Mutante zyto115 $\alpha_2\alpha_3$  generiert, bei der die N-terminale ER-SS (AS 2-22) deletiert wurde. Ein Vergleich von 115 $\alpha_2\alpha_3$  und zyto115 $\alpha_2\alpha_3$  in der Western Blot Analyse zeigt, dass die untere der beiden unglykosylierten Banden von 115 $\alpha_2\alpha_3$  das gleiche Laufverhalten wie zyto115 $\alpha_2\alpha_3$  aufweist, was ein zusätzlicher Hinweis

dafür ist, dass diese Fraktion mit geschnittener ER-SS vorliegt. Außerdem ergab die Analyse, dass diese Fraktion durch Inhibition des Proteasoms nicht stabilisierbar ist. Die relative Menge der zweiten unglykosylierten Bande von  $115\alpha_2\alpha_3$  nahm jedoch nach Hemmung des Proteasoms deutlich zu und weist zusätzlich eine geringere elektrophoretische Mobilität als  $zyto115\alpha_2\alpha_3$  auf. Dies deutet darauf hin, dass diese Fraktion eine ungeschnittene SS hat (Abb. 33, +ER-SS). Eine quantitative Analyse der Resultate ergab, dass nach Hemmung des Proteasoms spezifisch die Menge an  $115\alpha_2\alpha_3$  mit ungeschnittener SS ansteigt. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die glykosylierte und somit ins ER importierte Fraktion von  $115\alpha_2\alpha_3$  eine geschnittene SS aufweist. Die Ergebnisse deuten des Weiteren darauf hin, dass eine unglykosylierte Spezies mit ungeschnittenem Signalpeptid vorliegt. Diese Fraktion könnte ein Substrat für die cQC sein, die Polypeptide noch vor dem vollständigen Import ins ER dem proteasomalen Abbau im Zytosol zuführt.

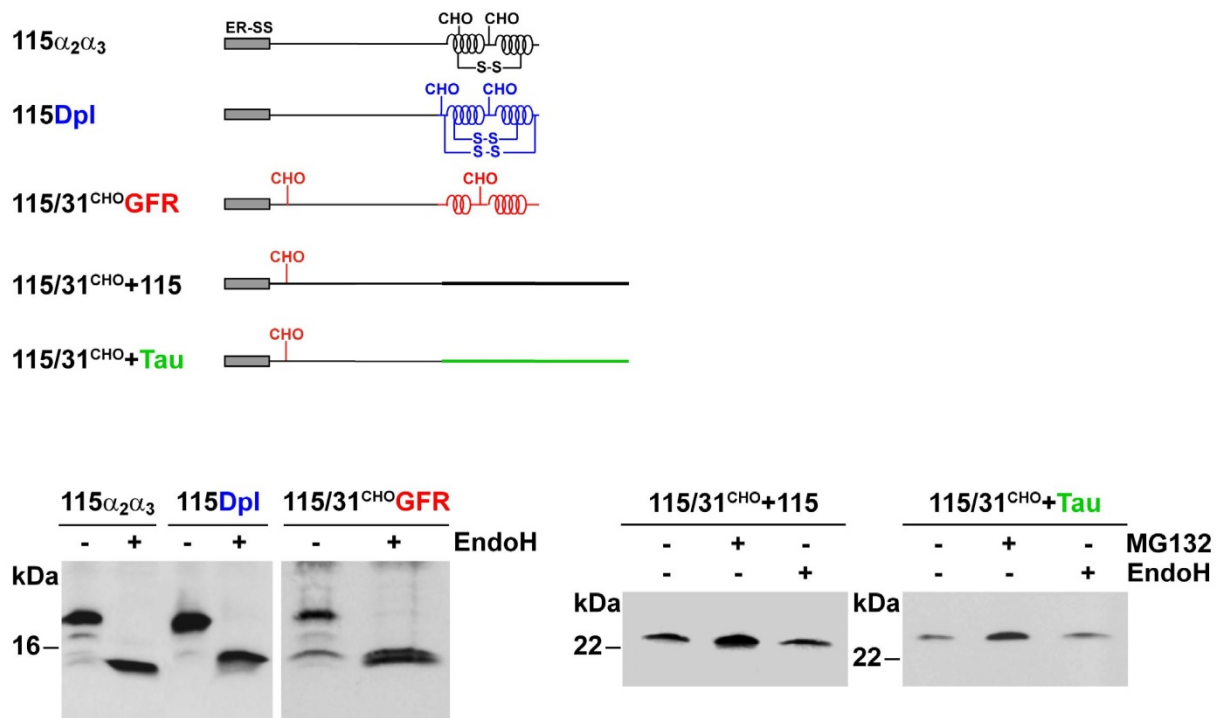


**Abb. 33. Polypeptide, die proteasomalem Abbau unterliegen, haben eine ungeschnittene Signalsequenz.** N2a Zellen wurden transient mit den Konstrukten  $115\alpha_2\alpha_3$  und  $zyto115\alpha_2\alpha_3$ , bei dem die ER-SS (AS 2-22) deletiert worden ist, transfiziert und in An- oder Abwesenheit des proteasomalen Inhibitors MG132 für 3 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert ( $\pm$ MG132). Zelllysate wurden, wenn angezeigt, mit EndoH behandelt ( $\pm$ EndoH). Die Detektion von PrP erfolgte unter Verwendung des mAb 3F4. Die unglykosylierte Fraktion mit und ohne dem ER-Signalpeptid ist mit einer Pfeilspitze markiert ( $\pm$ ER-SS). Eine Quantifizierung von mindestens drei unabhängigen Versuchen ist rechts dargestellt. Aufgetragen wurde das Verhältnis von  $115\alpha_2\alpha_3$  mit ungeschnittener SS zu dem mit geschnittener SS mit und ohne Behandlung mit MG132. Der über studentischen t-Test ermittelte p-Wert ist angezeigt.

### 2.1.2.10 $\alpha$ -helikale Bereiche heterologer Proteine fördern den ER-Import von PrP

Wie bereits gezeigt worden ist, sind  $\alpha$ -helikale Bereiche für die effiziente Translokation des unstrukturierten Teils von PrP wichtig. In Folge sollte geklärt werden, ob auch heterologe  $\alpha$ -helikale Domänen die Fähigkeit besitzen den unstrukturierten Bereich von PrP ins ER zu translozieren. Für diese Analyse wurde das paraloge Protein Doppel (Dpl) in die Untersuchung miteinbezogen (vgl. Abschnitt 1.2.3). Dieses Protein weist in der C-terminalen Domäne  $\alpha$ -helikale Bereiche auf, die jedoch keine signifikante Sequenzhomologie zu PrP zeigen (< 16%). Die beiden  $\alpha$ -Helices von Dpl wurden an A115X fusioniert und das dadurch generierte Konstrukt 115Dpl nach Expression in N2a Zellen mittels Western Blotting untersucht. Die Analyse ergab, dass 115Dpl effizient glykosyliert wurde, was für einen produktiven Import in das ER spricht (Abb. 34, 115Dpl). Um weitere, nicht homologe  $\alpha$ -helikale Domänen zu testen, wurde außerdem der GDNF-Rezeptor  $\alpha$  (GFR), ein überwiegend von  $\alpha$ -Helices dominiertes Protein, in die Analyse einbezogen (siehe Abschnitt 2.1.2.1, Abb. 24 und Leppanen et al., 2004). Die ersten beiden  $\alpha$ -Helices dieses heterologen Proteins wurden an den unstrukturierten Teil von PrP fusioniert. 115/31<sup>CHO</sup>GFR wies in der Western Blot Analyse ebenfalls eine Glykosylierung auf, was einen erfolgreichen ER-Import indiziert (Abb. 34, 115/31<sup>CHO</sup>GFR).

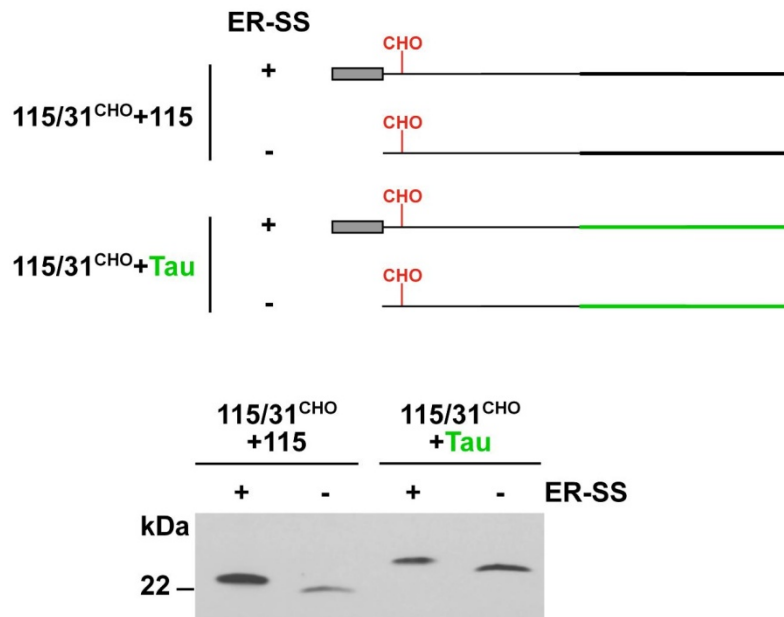
Um auszuschließen, dass der ineffiziente ER-Import auf die Primärsequenz des unstrukturierten Bereichs von PrP zurückzuführen ist, wurde der Effekt von heterologen unstrukturierten Domänen analysiert (Abb. 34). Die Fusion von A115X/31<sup>CHO</sup> mit der unstrukturierten Domäne von PrP (115/31<sup>CHO</sup>+115) sowie mit einem unstrukturierten Bereich des humanen Proteins Tau (115/31<sup>CHO</sup>+Tau) zeigte in der Western Blot Analyse keine Glykosylierung ( $\pm$ EndoH). Zusätzlich wurde bei beiden Konstrukten ein Anstieg der relativen Proteinmenge im Lysat nach Behandlung der Zellen mit MG132 detektiert ( $\pm$ MG132), was ein Indiz dafür ist, dass sie nicht in das ER importiert werden, sondern sich im Zytosol befinden und proteasomalem Abbau unterliegen (Abb. 34, 115/31<sup>CHO</sup>+115, 115/31<sup>CHO</sup>+Tau). Dieses Ergebnis zeigte, dass zusätzliche unstrukturierte Domänen die Translokation ins ER nicht fördern können.



**Abb. 34. Translokation in das ER wird durch heterologe  $\alpha$ -helikale Domänen gefördert.** N2a Zellen wurden mit den gezeigten chimären Konstrukten transfiziert und, wenn angezeigt, vor der Zellernte mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 für 3 h bei 37°C inkubiert ( $\pm$ MG132). Gesamtzelllysate wurden, sofern angegeben, mit EndoH behandelt ( $\pm$ EndoH). PrP wurde mittels Western Blot unter Verwendung des mAb 3F4 analysiert.

Um der Vermutung nachzugehen, dass 115/31<sup>CHO</sup>+115 und 115/31<sup>CHO</sup>+Tau nicht in das ER transloziert werden, wurde zusätzlich eine Version der Konstrukte ohne Signalsequenz generiert und in N2a Zellen transient transfiziert. Ein Vergleich des Laufverhaltens der Proteine mit und ohne Signalpeptid ( $\pm$ ER-SS) ergab, dass 115/31<sup>CHO</sup>+115 und 115/31<sup>CHO</sup>+Tau verglichen mit den zugehörigen zyto-Formen eine geringere elektrophoretische Mobilität aufweisen, was auf eine ungeschnittene Signalsequenz hindeutet (Abb. 35). Da Proteine, sobald sie ins ER importiert werden, von der Signalpeptidase prozessiert werden, kann man davon ausgehen, dass 115/31<sup>CHO</sup>+115 und 115/31<sup>CHO</sup>+Tau nicht vollständig ins ER transloziert werden.





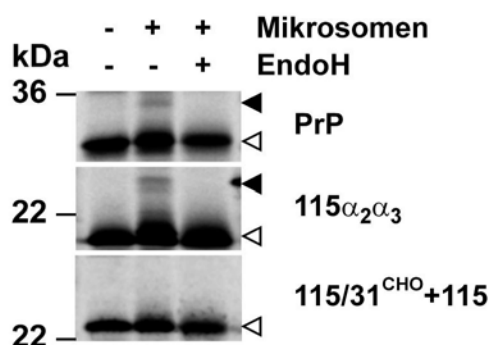
**Abb. 35. 115/31<sup>CHO</sup>+115 und 115/31<sup>CHO</sup>+Tau haben offenbar ein ungeschnittenes Signalpeptid.** Von den Konstrukten 115/31<sup>CHO</sup>+115 und 115/31<sup>CHO</sup>+Tau wurden je eine Version mit und ohne SS ( $\pm$ ER-SS) generiert und in N2a Zellen transfiziert. Proteine im Zelllysats wurden mittels Immunblotting und dem mAb 3F4 analysiert.

### 2.1.2.11 *In vitro* Analyse des ER-Imports

Die bisherigen Ergebnisse demonstrierten, dass das Vorhandensein  $\alpha$ -helikaler Bereiche notwendig und ausreichend für einen effizienten ER-Import von PrP ist. Es konnte gezeigt werden, dass 115 $\alpha_2\alpha_3$ , nicht aber 115/31<sup>CHO</sup>+115 ins ER transloziert wird. Um diese Daten zu stützen, wurde eine *in vitro* Analyse des ER-Imports durchgeführt. Dazu wurde die jeweilige DNA *in vitro* transkribiert, translatiert und in An- oder Abwesenheit von rauen Mikrosomen aus dem ER inkubiert ( $\pm$ Mikrosomen). Als Marker für den erfolgreichen Import in Mikrosomen wurde die Ausbildung von N-verknüpften Glykanen analysiert. Ein EndoH-Verdau diente dazu, glykosylierte Banden zu identifizieren.

Abbildung 36 zeigt nach Zugabe von Mikrosomen zur *in vitro* Transkription/Translations-Reaktion (+Mikrosomen) sowohl bei PrP als auch bei 115 $\alpha_2\alpha_3$  eine zweite, auf dem SDS-Gel langsamer laufende Bande. Diese Bande konnte nach EndoH-Verdau (+EndoH) nicht mehr detektiert werden, was ein Indiz dafür ist, dass es sich um die glykosylierte Fraktion handelte und die beiden Proteine *in vitro* importiert wurden (geschlossene Pfeilspitze). Hingegen konnte bei 115/31<sup>CHO</sup>+115 keine EndoH-sensitive, langsamer laufende Bande auf dem Gel

beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass diese Mutante *in vitro* nicht in Mikrosomen transloziert werden konnte.



**Abb. 36. *In vitro* Analyse des ER-Imports von PrP, 115 $\alpha_2\alpha_3$  und 115/31<sup>CHO</sup>+115.** Die DNA der jeweiligen Konstrukte wurde *in vitro* in An- und Abwesenheit von Mikrosomen aus dem ER ( $\pm$ Mikrosomen) transkribiert/translatiert und dabei mit [<sup>35</sup>S]-Methionin markiert. Die radioaktiv markierten Proben wurden anschließend, sofern angegeben, mit EndoH behandelt ( $\pm$ EndoH) und anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und analysiert. Geschlossene Pfeilspitzen symbolisieren glykosylierte, offene Pfeilspitzen unglykosylierte Proteinfractionen.

Zusammenfassend deuten die gezeigten Resultate darauf hin, dass das Vorhandensein  $\alpha$ -helikaler Bereiche unabhängig von der Primärsequenz ein entscheidender Faktor für einen erfolgreichen ER-Import ist.  $\alpha$ -helikale Domänen von heterologen Proteinen wie Dpl oder GFR fördern den Import in das ER, während zusätzliche unstrukturierte Bereiche, zum Beispiel von Tau, zu keiner effizienten Translokation führen. Dass strukturierte Domänen für einen produktiven Import notwendig sind, konnte auch in *in vitro* Versuchen gezeigt werden.

#### 2.1.2.12 Effiziente heterologe ER-Signalsequenzen können den ER-Import unstrukturierter Polypeptide nicht fördern

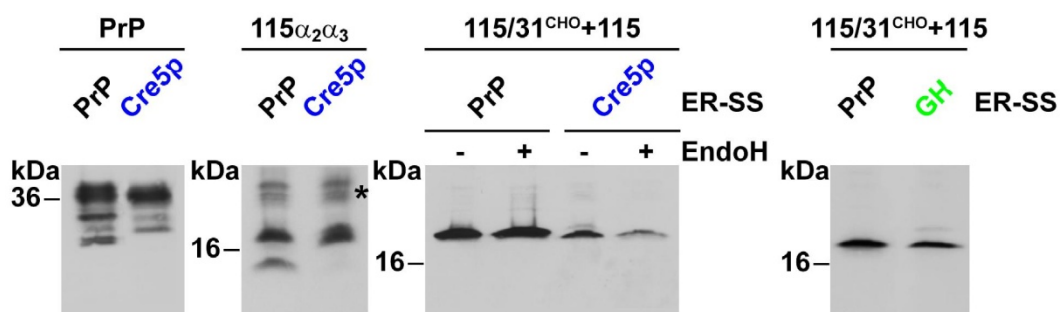
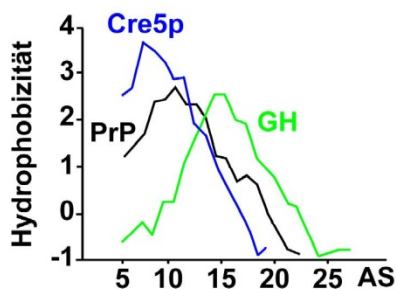
Studien haben ergeben, dass die Sequenz des ER-Signalpeptids eines Proteins die Effizienz des ER-Imports stark beeinflussen kann (vgl. Abschnitt 1.5.1). Des Weiteren ist bekannt, dass PrP zu den Proteinen mit einer ineffizienten ER-Lokalisationssequenz zählt (Kim und Hegde, 2002). In einer vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Expression von Säugetier-PrP in Hefe mit der Viabilität der Hefezellen interferiert, da die endogene SS von PrP für einen effizienten ER-Import nicht ausreichend war. Durch Austausch des PrP-Signalpeptids gegen die stark hydrophobe SS des

Hefeproteins Cre5p konnten der Import wieder hergestellt werden und die negativen Auswirkungen bezüglich der zellulären Viabilität verhindert werden (Heller et al., 2003).

Um zu testen, ob das hydrophobere Signalpeptid des Hefeproteins Cre5p die Produktivität des ER-Imports in Säugetierzellen verbessern kann, wurde die endogene ER-SS von PrP gegen die Cre5p-SS ausgetauscht. Während die so generierten Mutanten Cre5p-PrP und Cre5p-115 $\alpha_2\alpha_3$  verglichen mit PrP und 115 $\alpha_2\alpha_3$  in der Western Blot Analyse eine Reduktion der unglykosylierten Fraktion aufwiesen, was für eine verbesserte Translokation ins ER spricht, konnte die Cre5p-SS den ER-Import von 115/31<sup>CHO</sup>+115 nicht verbessern. Nur eine äußerst geringe Menge an glykosyliertem, EndoH-sensitivem Cre5p-115/31<sup>CHO</sup>+115 konnte in der Western Blot Analyse detektiert werden (Abb.37, Cre5p). Zusätzlich wurde eine weitere effiziente SS getestet. In einer vorangegangenen Studie wurde gezeigt, dass das Signalpeptid des Wachstumshormons aus der Ratte (*growth hormone*, GH) den ER-Import von sekretorischen Proteinen fördern kann (Rutkowski et al., 2003). GH-115/31<sup>CHO</sup>+115, bei dem die endogene PrP-SS gegen die des Wachstumshormons ausgetauscht wurde, zeigte im Vergleich zu 115/31<sup>CHO</sup>+115 aber ebenfalls keine deutlich verbesserte Translokationseffizienz (Abb. 37, GH).

ER-SS

PrP        **MANLGYWLLALFVTMWTDVGLC**        22 AS  
 Cre5p     **MRLALVLLLLCAPLRA**                17 AS  
 GH        **MAADSQTPWLLTFSLLCLLWPQEAGA** 26 AS



**Abb. 37. Effiziente heterologe ER-Signalsequenzen können den ER-Import unstrukturierter Polypeptide nicht fördern.** Die ER-SS von PrP (schwarz), dem Hefeprotein Cre5p (blau) und dem Wachstumshormon aus der Ratte (*growth hormone*, GH, grün) sind gezeigt. Hydrophobe AS sind rot markiert. Ein Hydrophobizitäts-Plot der drei ER-SS ist ebenfalls dargestellt, wobei eine Zahl über Null für hydrophobe AS steht (Kyte und Doolittle, 1982). N2a Zellen wurden transient mit den Konstrukten mit unterschiedlichen SS transfiziert und die Lysate, sofern angegeben, mit EndoH behandelt ( $\pm$ EndoH). Proteine im Gesamtzelllysat wurden mittels Western Blotting unter Verwendung des mAb 3F4 analysiert. Das Sternchen markiert unspezifische Hintergrundbanden.

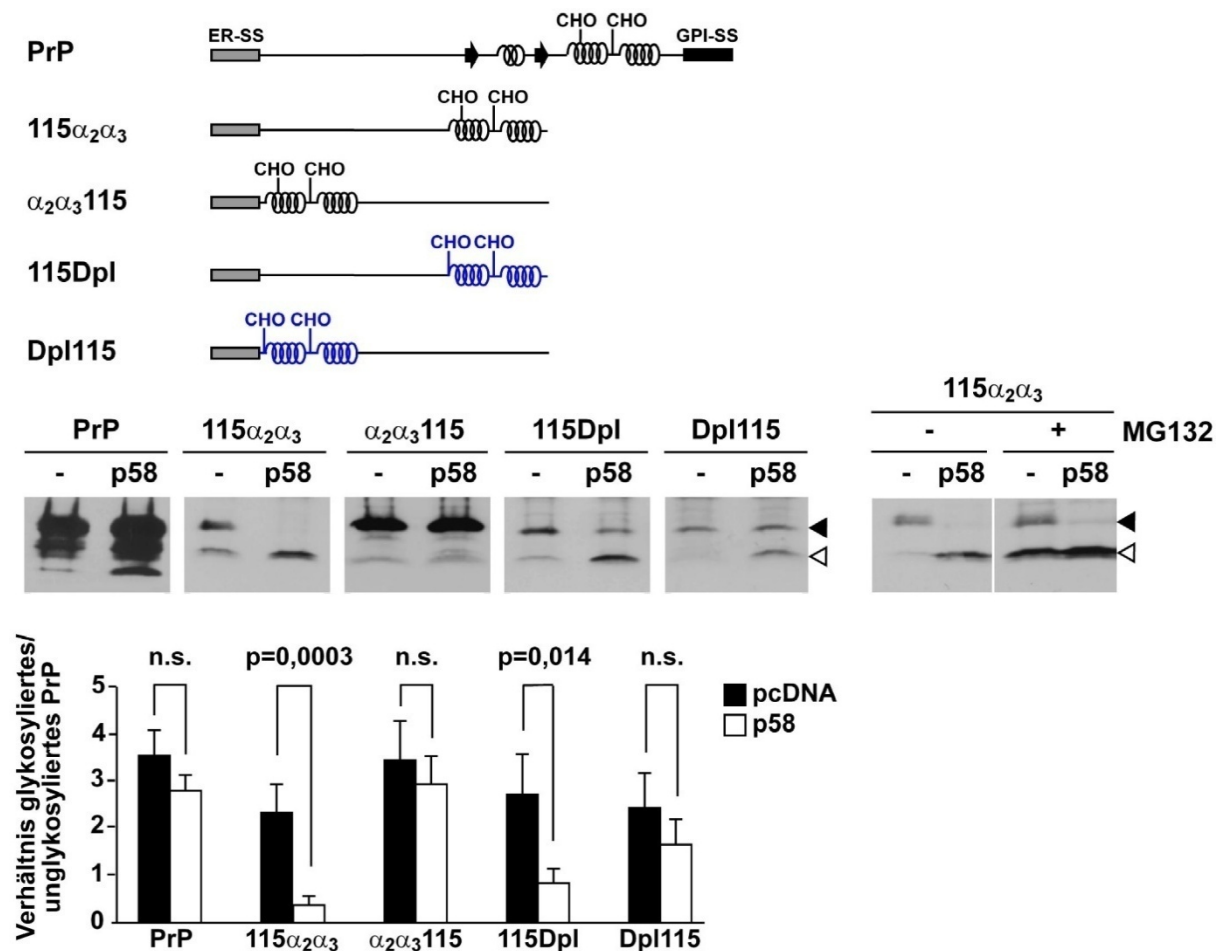
Wie schon in mehreren Studien gezeigt wurde, deuten auch die hier dargestellten Ergebnisse darauf hin, dass effiziente Signalsequenzen die Translokation von sekretorischen Proteinen grundsätzlich verbessern können. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die Translokation unstrukturierter ER-Proteine, die keine  $\alpha$ -helikalen Bereiche aufweisen, durch eine effizientere SS kaum gefördert wird.

#### **2.1.2.13 p58<sup>IPK</sup> fördert die kotranslokationale Degradierung von sekretorischen Proteinen mit ausgedehnten unstrukturierten Bereichen am N-Terminus**

In einer Studie konnte gezeigt werden, dass das zur Hsp40-Familie zählende Protein p58<sup>IPK</sup> eine wichtige Funktion in der cQC übernimmt. P58<sup>IPK</sup> liegt dieser Publikation zufolge mit Sec61 assoziiert vor und vermittelt durch Rekrutierung von Hsp70 an die zytosolische Seite des Translokons die kotranslokationale Degradierung von Proteinen unter ER-Stressbedingungen (Oyadomari et al., 2006). Alternativ wurde in einer zweiten Studie postuliert, dass p58<sup>IPK</sup> mit BiP assoziiert im ER-Lumen vorliegt und dort indirekt Einfluss auf die Translokation und Maturierung der naszierenden Polypeptidkette ausübt. Da die Translokation ins ER unter anderem von lumenalen Chaperonen gefördert wird, könnte diesem Modell zufolge die reduzierte Menge an frei vorliegendem BiP aufgrund verstärkter Assoziation mit p58<sup>IPK</sup> dafür verantwortlich sein, dass die Translokationseffizienz vermindert wird (Rutkowski et al., 2007).

Unabhängig von dem genauen Mechanismus stellte sich daher die Frage, ob und in welchem Ausmaß p58<sup>IPK</sup> die Translokationseffizienz der in dieser Arbeit untersuchten Mutanten modulieren kann. Um die mögliche Rolle von p58<sup>IPK</sup> zu analysieren, wurden N2a Zellen mit den verschiedenen PrP-Konstrukten und p58<sup>IPK</sup> oder einem Leervektor kotransfiziert und die Glykosylierung der jeweiligen Mutanten untersucht. Bei allen analysierten Konstrukten konnte in der Western Blot Analyse eine relative Zunahme der

Menge an unglykosyliertem Protein nach Überexpression von p58<sup>IPK</sup> beobachtet werden (Abb. 38, linke Blots). Während allerdings bei PrP kaum ein Einfluss auf die Glykosylierungseffizienz zu beobachten war, führte die gesteigerte Expression von p58<sup>IPK</sup> zu einem deutlich verminderten ER-Import von 115 $\alpha_2\alpha_3$  und 115Dpl. Bei beiden Konstrukten nahm die Menge der glykosylierten Fraktion (geschlossene Pfeilspitze) in den p58<sup>IPK</sup> überexprimierenden Zellen signifikant ab und die der unglykosylierten Fraktion (offene Pfeilspitze) zu. Wie erwartet unterlag die unglykosylierte Fraktion von 115 $\alpha_2\alpha_3$  in p58<sup>IPK</sup>-überexprimierenden Zellen proteasomaler Degradierung (Abb. 38, rechter Blot).



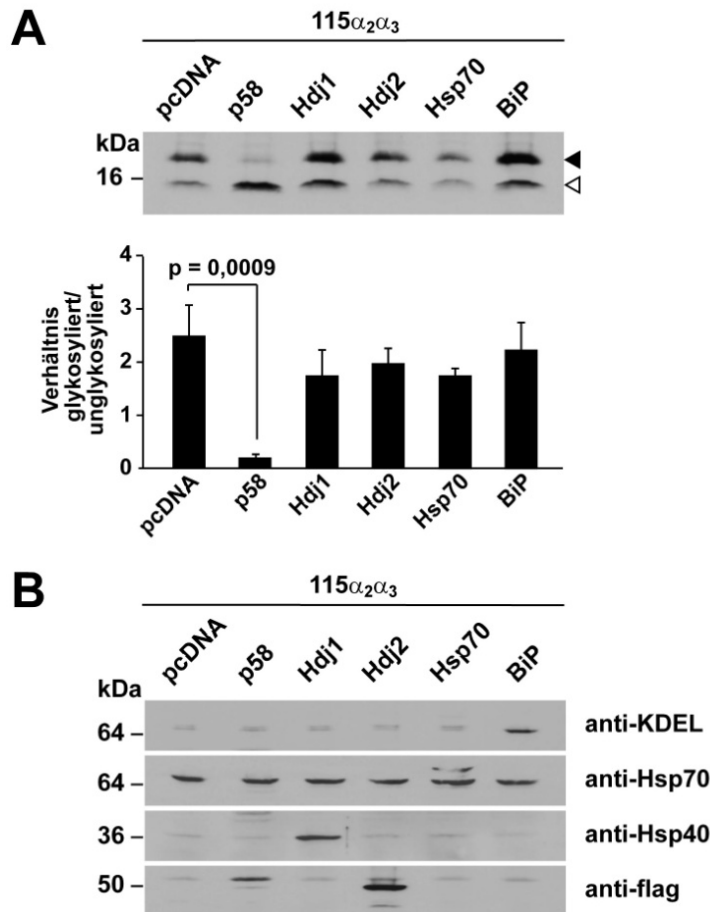
**Abb. 38. p58<sup>IPK</sup> fördert bei sekretorischen Proteine mit erweiterten N-terminalen unstrukturierten Bereichen die kotranslokationale Degradierung.** N2a Zellen wurden transient mit den gezeigten Konstrukten und p58<sup>IPK</sup> (p58) oder dem Leervektor (-) kotransfiziert und wenn angegeben mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 für 3 h bei 37°C inkubiert. Die Expression der Proteine wurde mittels Immunblotting und der Verwendung des mAb 3F4 analysiert. Offene Pfeilspitzen markieren unglykosylierte Spezies, geschlossene Pfeilspitzen die glykosylierten Fraktionen. Im rechten Blot wurden die MG132+ Banden direkt neben die MG132- Banden positioniert. Die Banden stammen jedoch von einem Gel. Die Quantifizierung basiert auf mindestens drei unabhängigen Versuchen und zeigt das

---

Verhältnis der Mengen von glykosylierter zu unglykosylierter Proteinfraction. Die p-Werte wurden mittels studentischen t-Tests ermittelt; n.s., nicht signifikant.

Die Translokationseffizienz der umgekehrt arrangierten Konstrukte  $\alpha_2\alpha_3115$  und Dpl115, bei denen die  $\alpha$ -helikale Domäne direkt nach dem Signalpeptid beginnt, wurde durch Überexpression von p58<sup>IPK</sup> nicht signifikant beeinflusst (Abb. 38). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass p58<sup>IPK</sup> die kotranslokationale Degradierung zwar fördert, das Ausmaß aber abhängig von der Länge und Lage von unstrukturierten Domänen des zu translozierenden Proteins ist. Vor allem bei Proteinen mit erweiterten unstrukturierten Domänen am N-Terminus konnte durch Überexpression von p58<sup>IPK</sup> eine deutliche Abnahme der Translokationseffizienz beobachtet werden.

Um zusätzlich zu zeigen, dass die beobachteten Effekte des verminderten ER-Imports bei Überexpression von p58<sup>IPK</sup> spezifisch für dieses Kochaperon sind, wurde der Glykosylierungsstatus von  $115\alpha_2\alpha_3$  auch in Anwesenheit verschiedener anderer Chaperone und Kochaperone analysiert. Diese vergleichende Analyse ergab, dass nur die gesteigerte Expression von p58<sup>IPK</sup> signifikant mit dem ER-Import von  $115\alpha_2\alpha_3$  interferiert. Die Überexpression von zytosolischem Hsp70 und den Hsp40-Mitgliedern Hdj1 und Hdj2 beeinflussten die Translokationseffizienz genauso wenig wie die gesteigerte Expression des ER-luminalen Chaperons BiP (Abb. 39).

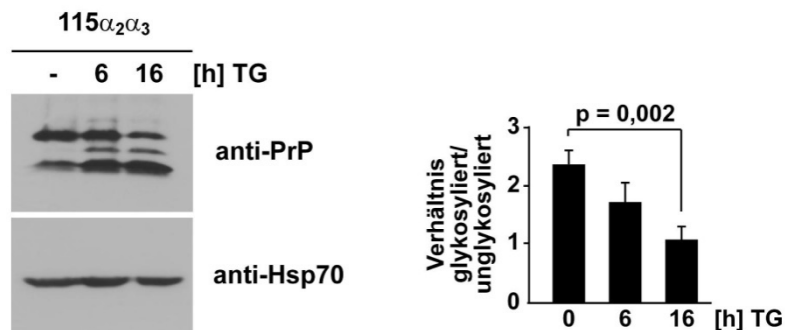


**Abb. 39. Die Überexpression von Hsp70, Hdj1, Hdj2 oder BiP hat keinen signifikanten Einfluss auf den ER-Import von  $115\alpha_2\alpha_3$ .** N2a Zellen wurden transient mit  $115\alpha_2\alpha_3$  und den angegebenen Konstrukten kotransfiziert. **(A)** Die Expression von  $115\alpha_2\alpha_3$  wurde mittels Immunblotting unter Verwendung des mAb 3F4 analysiert. Die offene Pfeilspitze markiert die unglykosylierte, die geschlossene Pfeilspitze die glykosylierte Proteinfraktion. Die Quantifizierung von mindestens drei unabhängigen Versuchen zeigt das Verhältnis von glykosyliertem zu unglykosyliertem  $115\alpha_2\alpha_3$ . Der p-Wert wurde mittels studentischen t-Tests ermittelt **(B)** Western Blot Analyse zur Kontrolle des Expressionslevels der überexprimierten Proteine. Die Expression von Flag-markiertem p58<sup>IPK</sup> (p58) und Flag-markiertem Hdj2 wurde mittels mAb M2 flag (anti-flag), Hdj1 mittels anti-Hsp40 Serum und BiP mittels mAb anti-KDEL detektiert. Der mAb anti-Hsp70 erkennt sowohl endogenes Hsp70 (untere Banden) als auch überexprimiertes, EYFP-Hsp70 (obere Bande).

#### 2.1.2.14 $115\alpha_2\alpha_3$ wird unter ER-Stressbedingungen vermindert in das ER importiert

Die cQC ist ein Mechanismus, der vor allem unter ER-Stressbedingungen verhindern soll, dass die Faltungsmaschinerie im ER überlastet wird, indem Polypeptide noch vor dem vollständigen ER-Import ins Zytosol geleitet werden (Oyadomari et al., 2006, Kang et al., 2006). Des Weiteren zeigten Untersuchungen, dass p58<sup>IPK</sup> unter ER-Stressbedingungen

hochreguliert wird (Lee et al., 2003). Um einen Hinweis dafür zu erhalten, wie sich ER-Stressbedingungen auf die Translokation auswirken können, wurden die transient mit der Mutante  $115\alpha_2\alpha_3$  transfizierten Zellen für die in Abbildung 40 angegebenen Zeiten mit Thapsigargin (TG) inkubiert. Thapsigargin hemmt spezifisch die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase des ERs. Dadurch erhöht sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Zytosol, während die  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher im ER entleert werden, was in der Induktion von ER-Stress resultiert. Die Western Blot Analyse zeigte, dass nach Inkubation mit TG die Menge an glykosyliertem  $115\alpha_2\alpha_3$  deutlich abnahm, während ein Anstieg an unglykosyliertem  $115\alpha_2\alpha_3$  detektiert werden konnte. Die Menge an Hsp70 als Kontrollprotein blieb hingegen gleich (Abb. 40). Dieses Resultat deutet darauf hin, dass unter ER-Stressbedingungen eine verminderte Translokation von  $115\alpha_2\alpha_3$  in das ER stattfindet.



**Abb. 40.  $115\alpha_2\alpha_3$  wird unter ER-Stressbedingungen vermindert in das ER transloziert.** Mit dem Konstrukt  $115\alpha_2\alpha_3$  transfizierte N2a Zellen wurden für die angegebene Zeit mit Thapsigargin (TG, 1  $\mu\text{M}$ ) inkubiert und anschließend mittels Western Blot analysiert. Der Nachweis von  $115\alpha_2\alpha_3$  erfolgte durch den mAb 3F4 (anti-PrP) während Hsp70 als Kontrolle mittels mAb anti-Hsp70 detektiert wurde. Die Quantifizierung von mindestens drei unabhängigen Experimenten zeigt das Verhältnis der glykosylierten und unglykosylierten Proteinfraction. Die Ermittlung des p-Wertes erfolgte mittels studentischen T-Tests.

Gemeinsam mit in früheren Studien gezeigten Daten deuten die hier gewonnenen Resultate darauf hin, dass  $p58^{\text{IPK}}$  die kotranslokationale Degradierung von sekretorischen Proteinen fördern kann. Im Zuge dieser Arbeit konnte überdies herausgefunden werden, dass die verminderte Translokation nach Überexpression von  $p58^{\text{IPK}}$  vor allem Proteine mit erweiterten, N-terminal unstrukturierten Bereichen betrifft und spezifisch von  $p58^{\text{IPK}}$  und nicht anderen Chaperonen oder Kochaperonen vermittelt wird. ER-Stress führt zudem zu einem verminderten ER-Import von  $115\alpha_2\alpha_3$ .



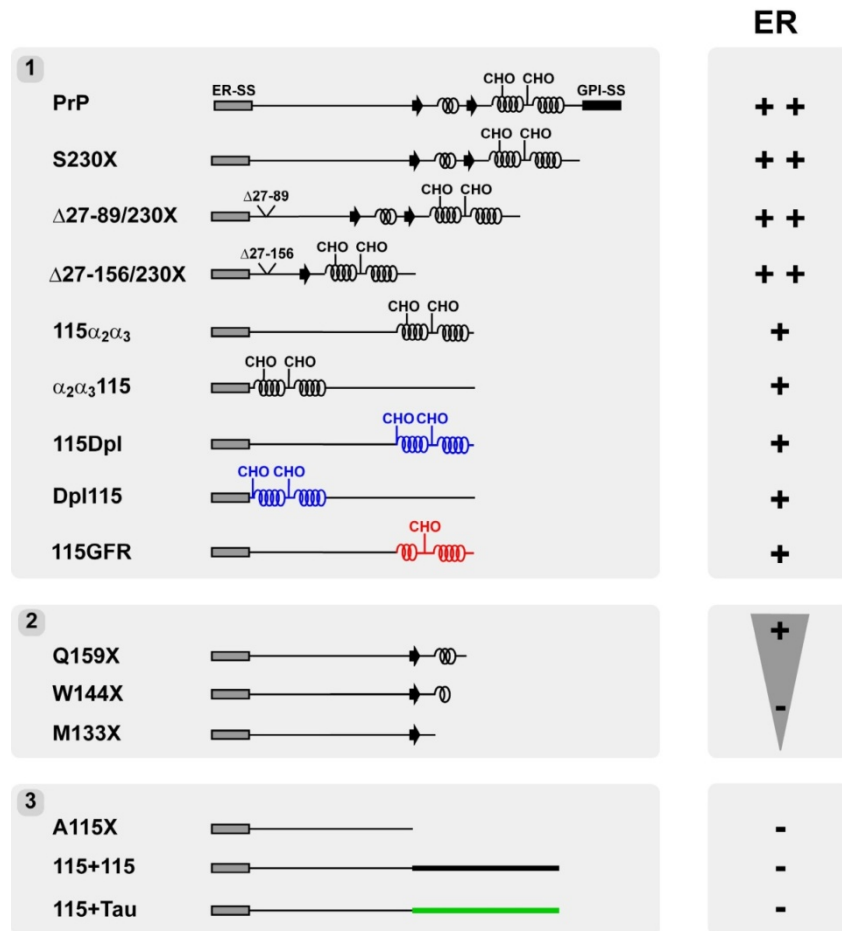
### 2.1.2.15 Zusammenfassung

Die umfangreiche Analyse des ER-Imports von PrP und verschiedenen chimären Proteinen hat gezeigt, dass dem Faltungszustand des Polypeptids eine Rolle bei der Translokation ins ER zukommt. Eine vorangegangene Studie hat bereits ergeben, dass die C-terminale, globulär gefaltete Domäne von PrP für einen effizienten ER-Import nötig zu sein scheint (Heske et al., 2004). Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde dies nun umfassend analysiert.

So wurden zuerst verschiedene intrinsische Faktoren der Polypeptide untersucht, die den ER-Import modulieren können. Es konnte deutlich gezeigt werden, dass ein gewisses Maß an  $\alpha$ -helikalen Bereichen ausreichend und notwendig für einen produktiven ER-Import ist. Der Einfluss der Sekundärstruktur auf die Translokation ist unabhängig von der Primärsequenz, da auch  $\alpha$ -helikale Domänen von heterologen Proteinen wie Dpl oder GFR die Translokation in das ER fördern können. (Abb. 41, Gruppe 1). Des Weiteren wurde eine direkte Korrelation zwischen der abnehmenden Menge an  $\alpha$ -helikalen Bereichen und der Translokationseffizienz gezeigt (Abb. 41, Gruppe 2). ER-Proteine, die von unstrukturierten Domänen dominiert sind, werden nicht in das ER importiert, sondern direkt ins Zytosol geleitet und dort proteasomal abgebaut (Abb. 41, Gruppe 3).

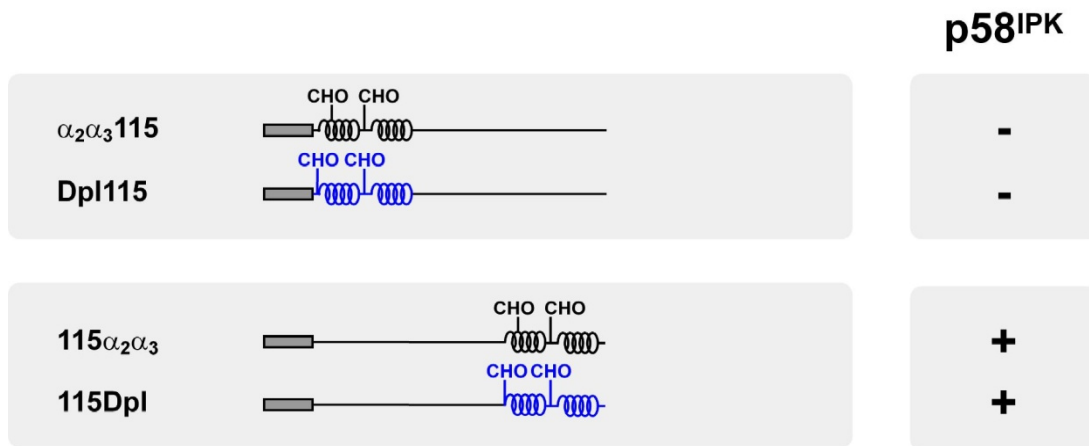
Außerdem konnte dargelegt werden, dass intrinsische Faktoren, wie (i) die Länge des Polypeptids, (ii) die GPI-Verankerung, (iii) die N-Glykosylierung oder (iv) die Möglichkeit zur Ausbildung einer Disulfidbrücke die Translokation ins ER nicht beeinflussen.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der Austausch des endogenen PrP-Signalpeptids gegen eine effizientere ER-SS nicht grundsätzlich zu einem verbesserten Import führt. Die Translokation von Polypeptiden, die gänzlich unstrukturiert sind, konnte durch eine effizientere ER-SS nicht gefördert werden. Dies deutet darauf hin, dass das Fehlen einer Sekundärstruktur gegenüber der Sequenz des Signalpeptids einen dominanten Effekt auf die Produktivität des ER-Imports ausübt.



**Abb. 41. Zusammenfassung der analysierten Konstrukte und deren ER-Import Effizienz.** Gruppe 1 fasst jene Konstrukte zusammen, die effizient ins ER importiert werden (++, +). Gruppe 2 zeigt den Zusammenhang zwischen der Menge an  $\alpha$ -Helices und der Translokationseffizienz. Je kürzer die  $\alpha$ -helikale Domäne im Protein, desto ineffizienter ist ein produktiver Import. Gruppe 3 umfasst diejenigen Konstrukte, die aufgrund fehlender strukturierter Domänen nicht oder nur sehr ineffizient ins ER transloziert werden (-).

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnte des Weiteren gezeigt werden, dass vor allem Polypeptide mit ausgedehnten unstrukturierten Bereichen der kotranslokationalen Qualitätskontrolle der Zelle unterliegen. Diese Proteine werden weder N-glykosyliert, noch von der Signalpeptidase prozessiert. Stattdessen werden sie bereits vor oder während der Translokation zum Proteasom geleitet, wo sie abgebaut werden. Studien zufolge ist das Kochaperon  $p58^{\text{IPK}}$  in die cQC involviert (Oyadomari et al., 2006; Rutkowski et al., 2007), was in der hier durchgeführten Arbeit bestätigt werden konnte. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass  $p58^{\text{IPK}}$  spezifisch Polypeptide mit erweiterten unstrukturierten Bereichen im N-Terminus der kotranslokationalen Degradierung zuführt (Abb. 42).



**Abb. 42 p58<sup>IPK</sup> beeinflusst die ER-Translokationseffizienz von Polypeptiden mit erweiterter unstrukturierter Domäne am N-Terminus.** 115 $\alpha_2\alpha_3$  und 115Dpl stehen unter dem Einfluss von p58<sup>IPK</sup> (+) während die darüber gezeigten Konstrukte  $\alpha_2\alpha_3$ 115 und Dpl115 hinsichtlich ihres ER-Imports weniger stark von p58<sup>IPK</sup> beeinflusst werden (-).

Schließlich wurde der Einfluss der zellulären Homöostase auf den ER-Import studiert. Die gezeigten Resultate deuten darauf hin, dass ER-Stress die Translokationseffizienz vermindern kann.

## 2.2 Teil 2 - Biochemische Charakterisierung von PrP-Homologen aus dem Zebraärbling (*Danio rerio*)

Der evolutionäre Ursprung von humanem PrP sowie seine physiologische Funktion sind immer noch unklar. Analysen ergaben jedoch, dass PrP in Säugetieren hoch konserviert ist und auch in Amphibien und Vögeln fand man PrP-Homologe. Des Weiteren wurden im Zebraärbling (*Danio rerio*) sowie in einer Reihe anderer Fischarten wie zum Beispiel dem Kugelfisch (*Fugu rubripes*) oder dem Lachs (*Salmo salar*) mit PrP verwandte Proteine entdeckt (Gibbs und Bolis, 1997; Suzuki et al., 2002; Oidtmann et al., 2003; Rivera-Milla et al., 2003; Cotto et al., 2005). Obwohl diese nur sehr geringe Sequenzhomologie zu humanem PrP aufweisen, scheinen einige charakteristische Merkmale konserviert zu sein. Die hydrophobe Domäne (HD) im Mittelteil von PrP liegt mit nahezu identischer AS-Sequenz in den Zebraärbling-Homologen vor. Des Weiteren konnte bei einigen Zebraärbling-PrP Isoformen analog zu humanem PrP eine N-terminale Repeat-Region festgestellt werden (vgl. Abschnitt 1.2.6).

Zu Beginn dieser Arbeit lagen für PrP-Homologe aus dem Zebraärbling lediglich bioinformatische Vorhersagen über konservierte Merkmale wie eine hydrophobe N- und C-terminale AS-Sequenz, die möglicherweise als ER-Lokalisationssignal beziehungsweise als GPI-Signalsequenz dienen könnte, vor. Computergestützte bioinformatische Analysen verwiesen des Weiteren bei den mit PrP verwandten Proteinen auf putative N-Glykosylierungsmotive (Cotto et al., 2005). Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten PrP-Homologe aus dem Zebraärbling hinsichtlich ihrer Biogenese, Maturierung und zellulären Lokalisierung untersucht werden. Es sollten erstmals experimentelle Evidenzen dafür geliefert werden, dass die Fischproteine wie vorhergesagt ins ER importiert und glykosyliert werden sowie an der Außenseite der Zellmembran GPI-verankert lokalisiert sind.

Für die Analyse wurden zwei verschiedene, erst vor kurzem beschriebene Proteine ausgewählt. Zebraärbling PrP 1 (zePrP1), welches zur Gruppe der möglicherweise duplizierten langen PrP-Formen im Fisch zählt, ist das wahrscheinlich mit humanem PrP am stärksten verwandte Protein aus dem Zebraärbling (Cotto et al., 2005). Das zweite Protein, das untersucht werden sollte, ist Zebraärbling Shadoo 2 (zeSho2) und zählt zur Gruppe der Shadoo (Sho)-Proteine, die vom Mensch bis zum Fisch hoch konserviert vorkommen. Sho-Proteine weisen nur eine geringe Sequenzhomologie zu PrP auf und sind viel kürzer (130-150 AS), zeichnen sich jedoch durch eine mit PrP fast identische HD aus. Auch für zeSho2 lagen zu Beginn dieser Arbeit lediglich Vorhersagen über eine ER- und GPI-Signalsequenz sowie ein mögliches Glykosylierungsmotiv im C-terminalen Teil des Proteins vor (Premzl et al., 2003).

### 2.2.1 Generierung von zePrP1 und zeSho2 und Expression in murinen Neuroblastomzellen

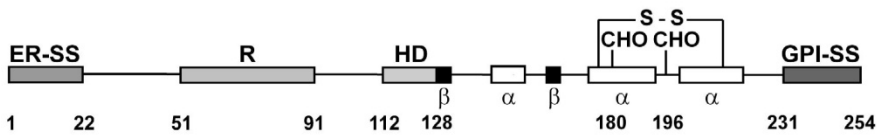
Die biochemische Untersuchung der Zebrabärbling-Proteine wurde in einer etablierten Säugetier-Zelllinie durchgeführt. Eine geeignete Zebrabärbling-Zelllinie stand nicht zur Verfügung, doch aufgrund der Tatsache, dass die Mechanismen der Protein-Translokation ins ER sowie der N-Glykosylierung und GPI-Verankerung von der Hefe bis zum Menschen relativ gut konserviert sind, konnte davon ausgegangen werden, dass ER- und GPI-Signalsequenzen sowie N-Glykosylierungsmotive (N-X-T/S) von Fischproteinen auch in Säugetierzellen funktionell sind. Für die Analyse der mit PrP verwandten Proteine aus dem Zebrabärbling schien die Verwendung der in der Prion-Forschung oft benutzten, neuronalen, murinen Neuroblastom-Zelllinie N2a geeignet.

Für die biochemische Studie mussten die Zebrabärbling-Proteine zunächst aus einer *Danio rerio* cDNA-Bibliothek in den Säugetier-Expressionvektor pcDNA3.1/Zeo kloniert werden. Dies wurde freundlicherweise von der Gruppe um Dr. Michael Baier durchgeführt. Um eine Detektion der beiden Proteine zu ermöglichen, Antikörper standen nicht zur Verfügung, wurde mittels PCR ein Flag-Epitop (DYKDDDK) direkt hinter die ER-Signalsequenz in beide Konstrukte eingefügt. Eine Sequenzanalyse ergab, dass der verwendete cDNA-Klon von zePrP1 eine interne Deletion (AS 199-235) aufweist, was auf eine mögliche Spleiß-Variante hindeuten könnte (Abb. 43A).

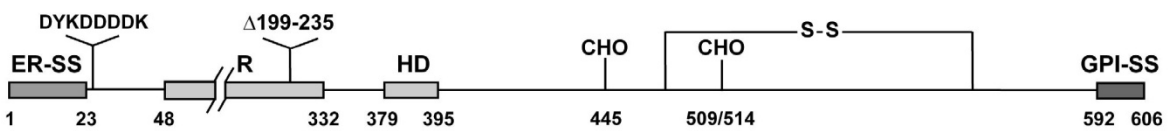
Zuerst wurde das Löslichkeitsprofil der Proteine untersucht. Dazu wurden die Konstrukte transient in N2a Zellen transfiziert. Nach der Lyse in 0,5% Triton X-100/0,5% DOC wurden die Lysate mittels Zentrifugation bei 15.000 g in eine Detergens-lösliche (S) und -unlösliche (P) Fraktion aufgeteilt. Die Western Blot Analyse ergab, dass beide Zebrabärbling-Proteine in Säugetierzellen gut exprimiert wurden. Maus-PrP (mPrP), das als Kontrolle für ein Säugetier-PrP diente, wurde wie erwartet hauptsächlich in der Detergens-löslichen Fraktion gefunden. Im Gegensatz dazu waren die Zebrabärbling-Proteine zePrP1 und zeSho2 sowohl in der Detergens-löslichen als auch -unlöslichen Fraktion detektierbar (Abb. 43B).

## A

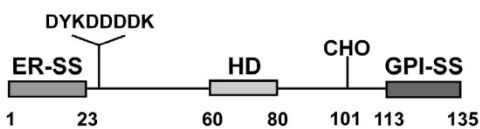
## mPrP



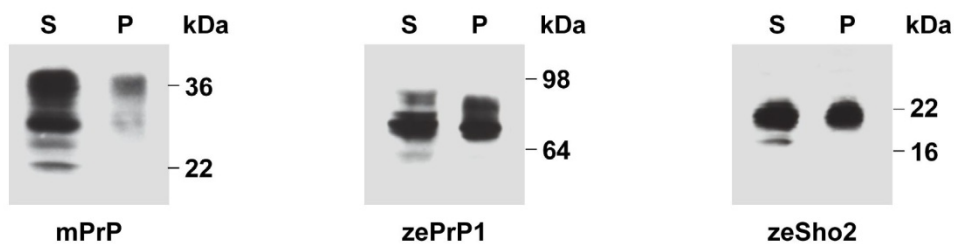
## zePrP1



## zeSho2



## B



**Abb. 43. Expression von zePrP 1 und zeSho2 in murinen Neuroblastomzellen. (A)** Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte: Maus-PrP (mPrP), Zebrafärbling PrP 1 (zePrP1) und Zebrafärbling Sho 2 (zeSho2). ER-SS, ER-Signalsequenz; R, Repeat-Region; HD, hydrophobe Domäne;  $\alpha$ , alpha-helikale Domäne;  $\beta$ , beta-Strang; CHO, N-verknüpfte Glykosylierungsstelle; S-S, Disulfidbrücke; GPI-SS, GPI Signalsequenz; DYKDDDDK, Flag-Epitop. Die AS-Nummerierung der einzelnen Domänen findet sich unterhalb der jeweiligen Konstrukte. In zePrP1 wurde eine Deletion der AS 199-235 gefunden ( $\Delta$ 199-235). **(B)** N2a Zellen wurden mit den Konstrukten aus (A) transient transfiziert. Nach Lyse in 0,5% Triton X-100/0,5% DOC und Trennung des Lysats durch Zentrifugation bei 15.000 g wurden die Proteine in der Detergens-löslichen (S) und -unlöslichen Fraktion (P) mittels Western Blot unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers (mAb) 3F4 für mPrP oder mAb M2 flag für zePrP1 und zeSho2 detektiert.

### 2.2.2 zePrP1 und zeSho2 werden ins ER importiert und N-glykosyliert

Maus-PrP besitzt eine N-terminale ER-SS (AS 1-22), die einen kotranslationalen Import ins ER vermittelt. Im C-Terminus von PrP finden sich zwei Konsensussequenzen für N-

Glykosylierung (N180 und N196) (Haraguchi et al., 1989) sowie eine GPI-Signalsequenz (GPI-SS, AS 230-254) (Stahl et al., 1987). Zunächst wird mPrP im ER N-glykosyliert sowie GPI-verankert. Danach werden im Golgi die Kernglykane in komplexe Glykane umgewandelt und mPrP an die Plasmamembran transportiert, wo es an der Außenseite lokalisiert ist (siehe Abschnitt 1.2.4). Bioinformatische Analysen verweisen bei beiden zu untersuchenden PrP-Homologen des Zebrafischblings auf eine hydrophobe N-terminale Sequenz, die als ER Lokalisationssignal dienen könnte. Des Weiteren wurden drei mögliche N-Glykosylierungsmotive in zePrP1 und ein solches putatives Motiv in zeSho2 gefunden. Ein viertes N-Glykosylierungsmotiv in zePrP1 (N367) wurde zwar vorhergesagt (Cotto et al., 2005), kann aber aufgrund des Prolins an zweiter Stelle des allgemein verwendeten Motivs N-X-T/S nicht genutzt werden, da Position X Prolin als einzige AS ausschließt.

Um festzustellen ob die Zebrafisch-Bling-Proteine N-glykosyliert sind, wurden sie in N2a Zellen transient exprimiert und die Zellen für 16 h in Gegenwart von Tunicamycin, einem Antibiotikum, das die Anknüpfung des Kernglykangerüsts an die Peptidkette inhibiert, inkubiert. Wie in Abbildung 44A ersichtlich, führte diese Behandlung zu einem veränderten Laufverhalten während der SDS-Gelelektrophorese. Alle Proben, die mit Tunicamycin behandelt wurden, zeigten im Gegensatz zu den unbehandelten Proben eine erhöhte elektrophoretische Mobilität. Dies deutet darauf hin, dass beide Zebrafisch-Bling-Proteine analog zu mPrP N-glykosyliert sind.

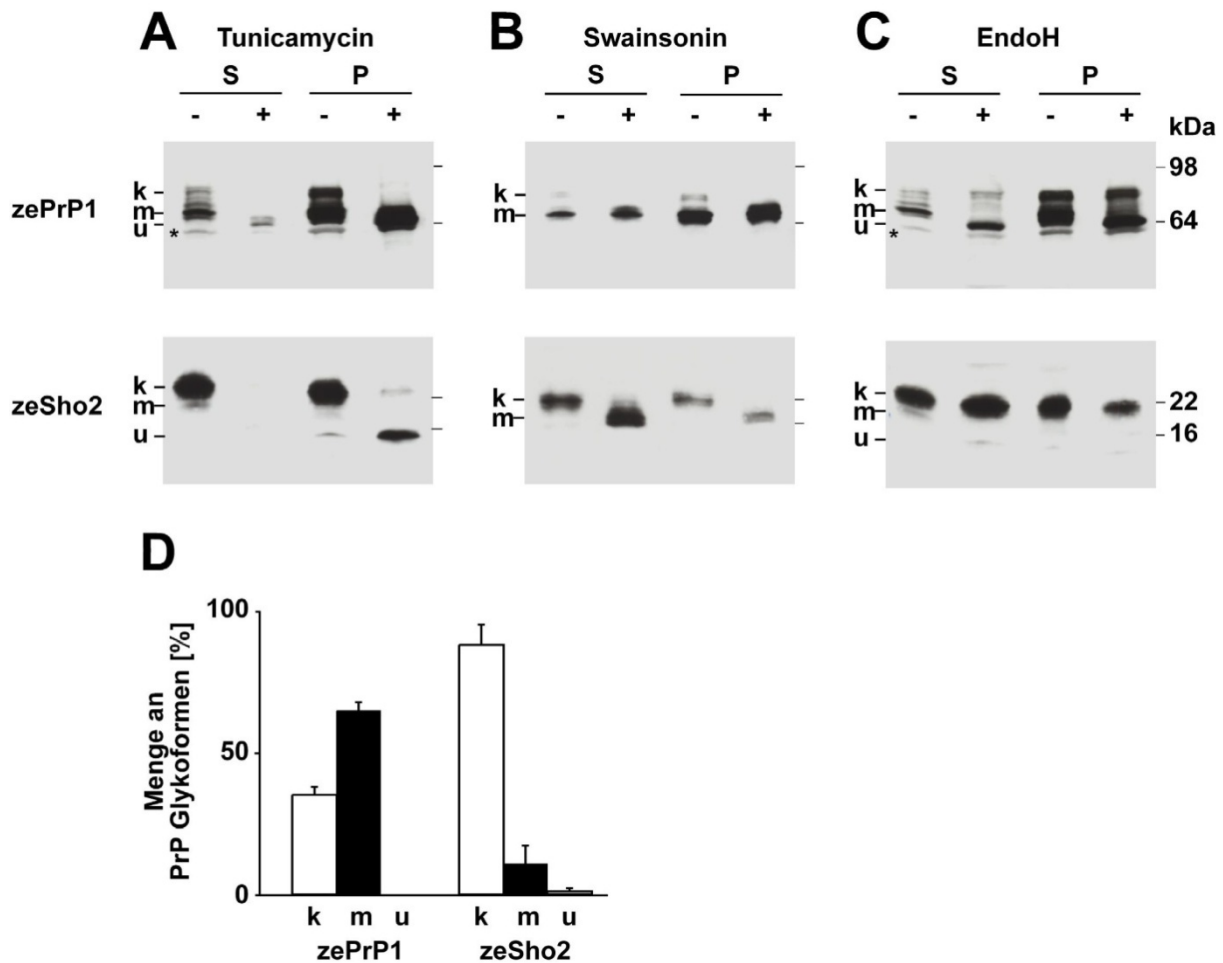
Anschließend sollte die Art der Glykosylierung genauer untersucht werden. Dazu wurden die transient transfizierten N2a Zellen für 16 h in Gegenwart von Swainsonin kultiviert. Swainsonin inhibiert die Golgi-lokalisierte Mannosidase II und somit die Umwandlung von mannosereichen Glykanen in komplexe Strukturen (vgl. Abschnitt 1.5.2). Diese Analyse lieferte den ersten Hinweis, dass zeSho2 komplex glykosyliert sein könnte. Die Inkubation mit Swainsonin führte bei zeSho2 dazu, dass die obere, elektrophoretisch langsamer laufende Bande (k) der unbehandelten Zellen vollständig verschwand und eine im Vergleich dazu schneller laufende Bande (m) in Swainsonin-behandelten Zelle detektiert werden konnte (Abb. 44B, zeSho2). Im Fall von zePrP1 nahm nur die Menge der sehr schwachen obersten Bande (k) nach Inkubation mit Swainsonin ab. Die stärkere Bande (m) darunter konnte in behandelten genauso wie in unbehandelten Zellen detektiert werden (Abb. 44B, zePrP1). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass im Gegensatz zu mPrP und zeSho2, die beide möglicherweise überwiegend komplex glykosyliert sind, nur ein kleiner Teil der Glykane von zePrP1 komplex glykosyliert vorzuliegen scheint.

Um diese Vermutung zu unterstützen, wurde zusätzlich ein Endoglykosidase H (EndoH) - Verdau der Zelllysate durchgeführt. Das Enzym EndoH aus *Streptomyces plicatus* spaltet

---

spezifisch zwischen zwei N-Acetyl-Glucosamin-Resten, mit denen mindestens fünf Mannoseeinheiten verknüpft sind (vgl. Abschnitt 2.1.2.1). Somit können mittels EndoH nur die Glykane abgespalten werden, welche in einer mannosereichen Form vorliegen, während komplex glykosylierte Strukturen nicht verdaut werden können. Ist das zu analysierende Protein EndoH-sensitiv, so hat dies eine erhöhte elektrophoretische Mobilität in einem SDS-Gel zur Folge. Wie in Abbildung 44C zu sehen ist, konnten die Glykane von zeSho2 mittels EndoH nicht abgespalten werden, da sich keine Änderung des elektrophoretischen Laufverhaltens der Bande nach EndoH-Verdau ergab (Abb. 44C, zeSho2). Dies ist ein weiterer Hinweis auf eine fast vollständige komplexe Glykosylierung dieses Proteins. ZePrP1 hingegen scheint nur teilweise komplex glykosyliert aufzutreten (Abb. 44C, zePrP1). Die Western Blot Analyse ergab, dass nur eine kleine Fraktion von zePrP1 (k) nach EndoH-Verdau kein verändertes Laufverhalten zeigte und somit komplex glykosyliert ist. Dagegen weist eine größere Proteinfraction von zePrP1 (m) nach EndoH-Behandlung eine erhöhte elektrophoretische Mobilität auf. Dies indiziert, dass zePrP1 überwiegend EndoH-sensitiv und damit mit mannosereichen Glykanen modifiziert ist. Eine Quantifikation aller Ergebnisse ergab, dass nur 35% der zePrP1 Glykane aber 88% von zeSho2 komplex modifiziert sind. Der Hauptteil von zePrP1 (65%) liegt in einer mannosereich glykosylierten Form vor. Bei beiden Proteinen wurde kaum eine unglykosylierte Spezies detektiert (Abb. 44D).





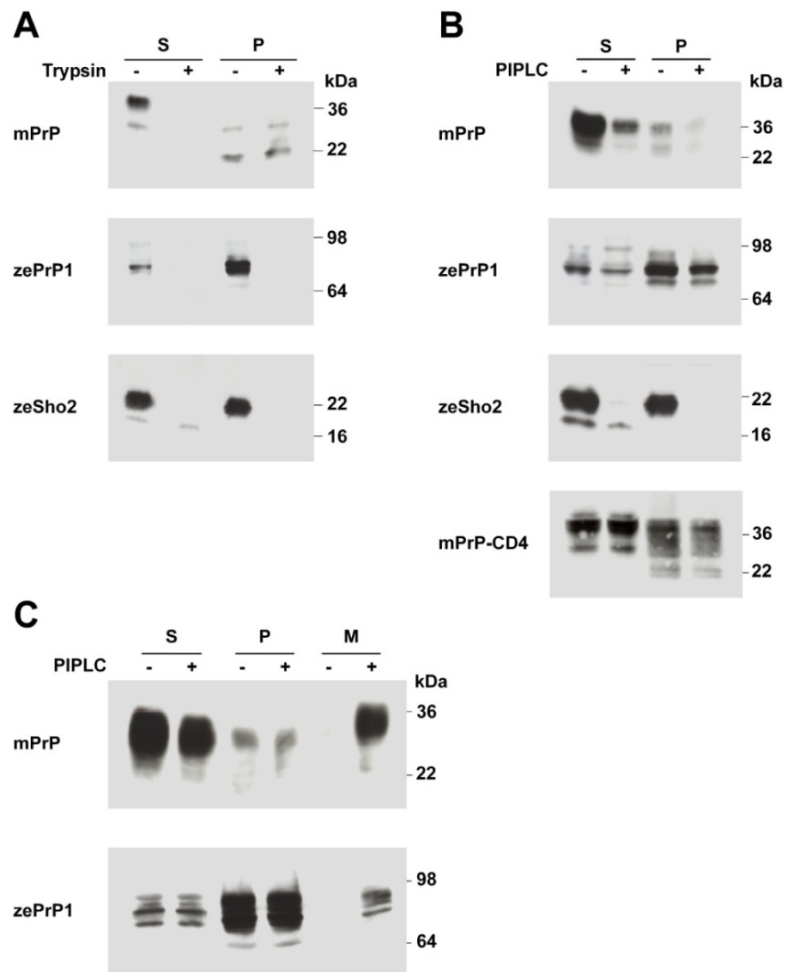
**Abb. 44. ZePrP1 und zeSho2 sind N-glykosyliert.** (A, B) Transient transfizierte N2a Zellen wurden für 16 h in Gegenwart von (A) Tunicamycin (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), welches die Kernglykosylierung inhibiert oder (B) Swainsonin (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), das die Golgi-Mannosidase II und somit die weitere Prozessierung in komplexe Glykane hemmt, inkubiert. Proteine in der Detergens-löslichen (S) und -unlöslichen (P) Fraktion wurden mittels Western Blot unter Verwendung des mAb M2 flag analysiert. (C) Um mannosereiche Glykane zu detektieren, wurden Lysate transient transfizierter Zellen mit EndoH inkubiert, welches nur mannosereiche aber keine komplexen Glykane spalten kann. Die Proteine wurden anschließend mittels Western Blot Analyse unter Verwendung des mAb M2 flag detektiert. Die verschiedenen N-verknüpften Glykoformen sind links angezeigt. k, Glykane mit komplexen Strukturen; m, mannosereiche Glykane; u, unglykosylierte Proteinfraktion. Das Sternchen markiert unspezifische Banden. (D) Quantitative Analyse der Experimente aus (A, B und C). Die Daten wurden aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Gezeigt ist die relative Menge der verschiedenen Glykoformen in Prozent der Gesamtmenge des jeweiligen Konstrukts.

### **2.2.3 zePrP1 und zeSho2 werden mit einem GPI-Anker modifiziert und sind an der Außenseite der Plasmamembran lokalisiert**

Sowohl für zePrP1 als auch für zeSho2 lagen bioinformatische Vorhersagen über eine C-terminale, hydrophobe AS-Sequenz vor, die als GPI-Signalsequenz dienen könnten. Deshalb sollte untersucht werden, ob die Zebrabärbling-Proteine analog zu mPrP GPI-verankert und an der Außenseite der Zelle lokalisiert sind. Eine mögliche Lokalisierung an der Plasmamembran wurde analysiert, indem transfizierte N2a Zellen vor der Ernte mit Trypsin, welches alle Proteine an der Zelloberfläche abspaltet, inkubiert wurden (Abb. 45A, +Trypsin). Nach Inaktivierung von Trypsin mit Trypsininhibitor wurden die Zellen lysiert und mittels Western Blot analysiert. Parallel wurden Zellen ohne Trypsinbehandlung geerntet (Abb 45A, -Trypsin). Abbildung 45A zeigt deutlich, dass sowohl zePrP1 als auch zeSho2 nach Trypsinbehandlung auf dem Western Blot nicht mehr detektiert werden konnten, was dafür spricht, dass die Proteine an der Zelloberfläche lokalisiert waren.

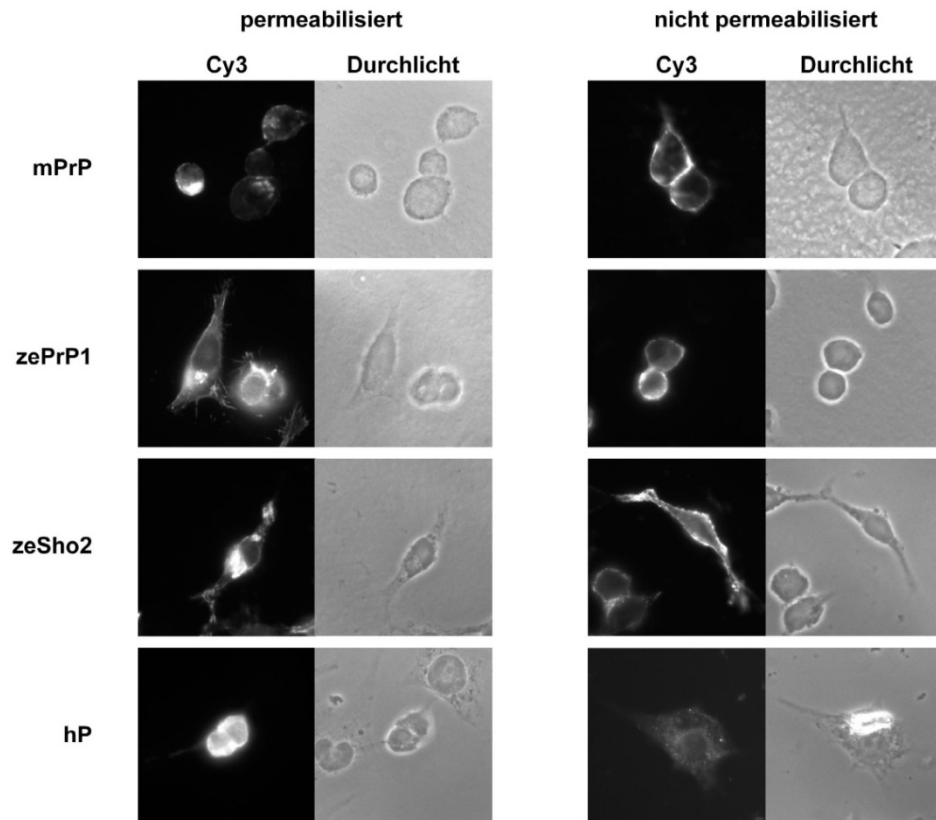
Um spezifisch eine mögliche GPI-Verankerung der beiden Zebrabärbling-Proteine zu untersuchen, wurden die Zellen vor ihrer Ernte mit der Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PIPLC) für 2 h inkubiert (Abb. 45B, C). Dieses Enzym schneidet spezifisch am Phosphatrest der Phosphatidylinositol-Gruppe des GPI-Ankers und setzt somit die Proteine ins Zellkulturmedium frei. GPI-verankerte Proteine können nach einem Verdau mit PIPLC vermindert im Zelllysat und vermehrt im Zellkulturüberstand mittels Western Blot detektiert werden. Um eine Lokalisierung der Proteine im Zellkulturmedium durch eine möglicherweise stattfindende Sekretion zu vermeiden, wurde der Verdau bei 4°C vollzogen. Als Negativkontrolle wurde PrP-CD4, bei dem die endogene C-terminale GPI-Signalsequenz durch die heterologe Transmembrandomäne von CD4 ausgetauscht wurde, in die Analyse miteinbezogen. Wie erwartet konnte PrP-CD4 durch PIPLC nicht freigesetzt werden, da die relative Proteinmenge im Lysat nach der Inkubation mit PIPLC gleichblieb (Abb. 45B, mPrP-CD4). Dahingegen konnten mPrP und zeSho2 nach PIPLC-Inkubation im Zelllysat kaum mehr detektiert werden, was darauf hindeutet, dass sie fast vollständig von der Plasmamembran entfernt wurden. ZeSho2 scheint daher analog zu mPrP GPI-verankert zu sein (Abb. 45B, mPrP, zeSho2). Auffallend war, dass zePrP1 mit dieser Methode nur teilweise freigesetzt werden konnte. Um dieses Phänomen genauer zu untersuchen, wurde auch der Zellkulturüberstand untersucht. Analog zu mPrP, das nach PIPLC-Inkubation im Medium detektiert werden konnte, wurde auch ein Teil von zePrP1 von der Plasmamembran abgespalten und tauchte nach PIPLC-Behandlung im Überstand auf (Abb 45C, M). Dieses Resultat zeigte, dass zePrP1 ebenfalls an der Außenseite der Plasmamembran GPI-verankert vorliegt. Die partielle Resistenz von zePrP1 beim Verdau mit PIPLC könnte durch die Größe dieses Proteins erklärt werden. Das Enzym PIPLC könnte aus sterischen Gründen

einen schlechteren Zugang zu dem GPI-Anker des, im Vergleich zu den anderen analysierten Proteinen, relativ großen, fast 500 AS langen Zebrabärbling-Proteins haben.



**Abb. 45. ZePrP1 und zeSho2 sind GPI-verankerte Proteine, die an der Außenseite der Plasmamembran lokalisiert sind. (A, B, C)** Murine Neuroblastomzellen wurden mit den angezeigten Konstrukten transient transfiziert. Beim Konstrukt mPrP-CD4 wurde der endogene GPI-Anker von PrP durch die heterologe Transmembrandomäne des Proteins CD4 ersetzt. **(A)** Um unspezifisch alle Zelloberflächenproteine zu entfernen, wurden die Zellen vor der Zellernte für 5 min bei 4°C mit Trypsin inkubiert (+Trypsin). Parallel wurden Zellen zur Zellernte abgekratzt (-Trypsin). Nach Lyse und Zentrifugation wurde PrP in der Detergens-löslichen (S) sowie -unlöslichen (P) Fraktion mittels Immunblotting analysiert. **(B, C)** Transfizierte N2a Zellen wurden in Anwesenheit von PIPLC für 2 h bei 4°C inkubiert (+PIPLC) um spezifisch GPI-verankerte Proteine von der Zelloberfläche abzuschneiden. Die Proteine im Lysat (S, P) und im Zellkulturmedium (M) wurden mittels Western Blot unter Verwendung des mAb 3F4 (mPrP, mPrP-CD4) sowie mAb M2 flag (zePrP1, zeSho2) analysiert.

Um die Lokalisierung der beiden Zebrafärbung-Proteine an der Außenseite der Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenzanalyse zu untersuchen, wurden die transient transfizierten N2a Zellen mittels Formaldehyd-Behandlung fixiert. Dies hat zur Folge, dass Antikörper nicht in die Zelle diffundieren können. Dadurch können ausschließlich Proteine an der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit dem Detergens Triton X-100 resultiert in einer Permeabilisierung der Zellmembran wodurch Antikörper in der Lage sind, ins Zellinnere zu gelangen.



**Abb.46. ZePrP1 und zeSho2 sind an der Zelloberfläche lokalisiert.** N2a Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und mit den gezeigten Konstrukten transient transfiziert. Zytosolisch lokalisiertes, humanes Parkin (hP) diente als Kontrolle für ein nicht an der Außenseite der Zellen lokalisiertes Protein. Die Lokalisierung wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz von mit Triton X-100 permeabilisierten und nicht-permeabilisierten, fixierten Zellen visualisiert (Cy3). Dafür wurden die Antikörper mAb 3F4 (mPrP), mAb M2 flag (zePrP1, zeSho2) und anti-hP Antiserum (hP) verwendet.

Maus-PrP sowie die Zebrafärbung-Proteine konnten mit dieser Methode an der Zelloberfläche von nicht-permeabilisierten Zellen detektiert werden. In permeabilisierten Zellen war hauptsächlich eine intensive Golgi-Färbung sichtbar, die durch die starke Überexpression der sekretorischen Proteine zustande kommt. Im Gegensatz zu den an der

---

Außenseite der Zellmembran lokalisierten Proteinen konnte humanes Parkin, ein zytosolisch lokalisiertes Protein, wie erwartet nur in permeabilisierten Zellen gefunden werden (Abb. 46).

#### **2.2.4 Zusammenfassung**

Insgesamt ergab die Analyse, dass bei beiden untersuchten Zebrabärbling-Proteinen trotz sehr geringer Sequenzhomologie zu Säugetier-PrP einige charakteristische Merkmale konserviert sind. Es konnte erstmals experimentell nachgewiesen werden, dass beide Proteine ein N-terminales Signalpeptid aufweisen, welches sie in den sekretorischen Biogeneseweg leitet. Dort werden sie analog zu Säugetier-PrP N-glykosyliert und GPI-verankert. Überdies konnte gezeigt werden, dass in murinen Neuroblastomzellen zePrP1 teilweise und zeSho2 vollständig komplex glykosyliert vorliegt. Beide Proteine sind außerdem genau wie Säugetier-PrP an der Außenseite der Plasmamembran lokalisiert. Da man davon ausgehen kann, dass die Proteinbiosynthese in Fischzellen ähnlich abläuft wie in Säugetier-Zellen, deuten die hier generierten Daten darauf hin, dass die essentiellen Maturierungsschritte von PrP stark konserviert sind und bei den mit PrP verwandten Proteinen im Zebrabärbling ähnlich erfolgen. Das hier gezeigte eukaryontische Expressionssystem für Fischproteine könnte deshalb hilfreich für die zukünftige Erforschung der möglicherweise konservierten Funktion von PrP und Sho sein.

## 3 Diskussion

### 3.1 Teil 1 - Translokation von PrP ins ER: die Rolle intrinsischer und zellulärer Faktoren

Transmissible spongiforme Enzephalopathien sind bis jetzt unheilbare, neurodegenerative Erkrankungen, die sich durch Ablagerungen von missgefaltetem PrP<sup>Sc</sup>, durch eine progressive Degeneration von Nervenzellen im Gehirn und durch die Bildung eines infektiösen Agens (Prionen) auszeichnen (Prusiner et al., 1998). Heute gilt es als gesichert, dass PrP<sup>Sc</sup> den Hauptbestandteil von infektiösen Prionen darstellt, doch die Identität des toxischen Agens und der Mechanismus der Neurodegeneration sind noch immer weitgehend ungeklärt. Obwohl man vermutet, dass die Missfaltung von PrP in direktem Zusammenhang mit der Pathogenese von Prion-Krankheiten steht, ist fraglich, auf welchem Weg physiologisch gefaltetes PrP Neurotoxizität auslöst. Des Weiteren ist bis heute weder die genaue physiologische Funktion des zellulären PrP (PrP<sup>C</sup>) noch sein evolutionärer Ursprung bekannt.

Interessanterweise konnte in einer Vielzahl von Studien gezeigt werden, dass PrP auch in Abwesenheit von infektiösen Prionen toxisches Potential erwerben kann (vgl. Abschnitt 1.4.2). PrP wird normalerweise ins ER importiert und ist an die Außenseite der Plasmamembran GPI-verankert lokalisiert. Verschiedene zelluläre Bedingungen und/oder pathogene Mutationen im PrP-Gen können jedoch den ER-Import von PrP modulieren. Wie in mehreren Studien gezeigt worden ist, kann die dadurch hervorgerufene Fehllokalisierung und Missfaltung von PrP im Zytosol zur Neurodegeneration führen (Ma und Lindquist, 2001; Ma et al., 2002; Yedidia et al., 2001; Drisaldi et al., 2003; Rane et al., 2004; Orsi et al., 2006; Rambold et al., 2006).

#### 3.1.1 ER-Import von PrP: Die Rolle der N-terminalen Signalsequenz und der HD

Aufgrund der Tatsache, dass Mutationen in verschiedenen Domänen von PrP dessen ER-Import modulieren können, stellt PrP ein interessantes Modellprotein für die generelle Analyse der Regulation der Translokation dar. So konnten bisher die N-terminale ER-SS und die HD als Domänen identifiziert werden, die eine Rolle im ER-Import von PrP spielen. Erste Hinweise für eine Modulation des Imports von PrP lieferten die Untersuchungen von nicht vollständig ins ER importierten PrP-Konformeren. Neben der GPI-verankerten Form von PrP treten in der Zelle auch kleine Fraktionen von zwei unterschiedlichen transmembran vorliegenden Topologien auf, bei denen entweder der C- (<sup>C<sub>tm</sub></sup>PrP) oder der N-Terminus

(<sup>N</sup>tmPrP) von PrP im Zytosol lokalisiert ist (Lopez et al., 1990; Yost et al., 1990). Interessanterweise verursachen verschiedene Mutationen im N-terminalen Signalpeptid und in der HD von PrP eine Modulation der relativen Anteile der drei PrP-Topologien. Obwohl bisher noch nicht bekannt ist, durch welchen Mechanismus diese transmembranären Topologien zustande kommen, zeigte sich, dass Mutationen im PrP-Gen, die bei GSS-Patienten (A117V) und bei transgenen Mäusen (AV3) zur Neurodegeneration führen, mit einer verstärkten Bildung von <sup>C</sup>tmPrP einhergehen (Hegde et al., 1998a; Kim et al., 2001; Stewart et al., 2005). In einer Studie unserer Arbeitsgruppe wurde die Rolle der ER-SS und der HD für den ER-Import von PrP in *Saccharomyces cerevisiae* untersucht. Aufgrund der geringen Hydrophobizität der ER-SS wird PrP in der Hefe über einen posttranslationalen Weg ins ER importiert. Wie gezeigt werden konnte, führte dies zu einer Beeinträchtigung der Translokation und zur Akkumulation von PrP im Zytosol, was mit der Viabilität der Zellen interferierte. Durch die Verwendung einer heterologen, hydrophoberen ER-SS oder aber durch die Deletion der HD konnte der ER-Import von PrP und damit das Wachstum der Hefezellen wieder hergestellt werden (Heller et al., 2003).

### 3.1.2 Die Sekundärstruktur ist ein Signal für effizienten ER-Import

Eine interessante Vermutung ergab sich aus der Untersuchung zweier mit dem Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom assoziierter PrP-Mutanten, W145X und Q160X (Kitamoto et al., 1993; Zanusso et al., 1999; Finckh et al., 2000). Die Analyse der Biogenese dieser pathogenen Stop-Mutanten zeigte, dass sie - obwohl sie weder in der ER-SS noch in der HD Mutationen aufweisen - nicht effizient ins ER importiert werden und folglich teilweise im Zytosol lokalisiert sind, wo sie Apoptose induzieren (Heske et al., 2004; Rambold et al., 2006). Diese Beobachtung ließ vermuten, dass die strukturierte, C-terminalen Domäne von PrP neben der N-terminalen SS und der HD ebenfalls Informationen für einen produktiven ER-Import beinhalten könnte.

In der hier durchgeführten Arbeit wurde diese Idee aufgegriffen und die intrinsischen Faktoren, die zur Beeinträchtigung des ER-Imports der pathogenen Mutanten W145X und Q160X beitragen, ausführlicher untersucht. Durch die hier gewonnenen Daten konnten erstmals Evidenzen dafür generiert werden, dass auch die Sekundärstruktur im C-Terminus für einen erfolgreichen ER-Import von PrP erforderlich ist. Abbildung 8 (vgl. Abschnitt 1.2.5) verdeutlicht die modulare Struktur von PrP mit einem unstrukturierten N- und einem hochstrukturierten, globulär gefalteten C-Terminus (Riek et al., 1996; Riek et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Fehlen dieses strukturierten Bereichs von PrP, wie im Fall der beiden pathogenen Mutanten, zur verminderten

Translokation ins ER führt und dass das Ausmaß an  $\alpha$ -Helices direkt mit der Effizienz des ER-Imports korreliert. Eine schrittweise Deletion der  $\alpha$ -helikalen Bereiche führte zu einer sukzessiven Reduktion des ER-Imports (Abb. 28). Anhand der durchgeführten Experimente konnte jedoch auch ausgeschlossen werden, dass die verkürzte Länge der Polypeptide für die verminderte Translokation verantwortlich ist. Eine relativ kurze PrP-Mutante, die nur den C-terminalen, von  $\alpha$ -Helices dominierten Teil von PrP beinhaltet ( $\Delta 27-156/S230X$ ), wurde effizient ins ER importiert (Abb. 29).

Da die Mechanismen des ER-Imports nicht nur für PrP relevant, sondern auch von generellem zellbiologischem Interesse sind, wurde die Modulation der Translokation durch Sekundärstrukturelemente ausführlicher untersucht. Die weiterführende Analyse ergab, dass nicht nur das Ausmaß sondern auch die Lokalisierung von Sekundärstrukturen im naszierenden Polypeptid einen Einfluss auf die Effizienz des ER-Imports haben kann. Bei chimären Polypeptiden, die aus einer strukturierten und einer unstrukturierten Domäne von je etwa 100 AS bestehen, begünstigen  $\alpha$ -Helices im N-Terminus des Polypeptids den ER-Import stärker als  $\alpha$ -Helices im C-terminalen Teil (Abb. 32). Darüber hinaus konnte durch die Verwendung  $\alpha$ -helikaler oder unstrukturierter Domänen heterologer Proteine die Unabhängigkeit von der Primärsequenz demonstriert werden (Abb. 34). Dies deutet darauf hin, dass die Effekte bezüglich der Import-Effizienz nicht PrP-spezifisch sind, und lassen ein generelles Prinzip der Translokationsregulation durch Strukturelemente vermuten. Eine weitere wichtige Beobachtung war, dass Proteine, die von unstrukturierten Domänen dominiert sind (Abb. 30, 34 und 41, Gruppe 3), nicht ins ER transloziert, sondern direkt ins Zytosol geleitet werden, wo sie proteasomal abgebaut werden. Interessanterweise ergaben die vorliegenden Daten auch, dass neben den Sekundärstrukturen, die als Modulator der Translokation identifiziert wurden, posttranslationale Modifikationen wie die N-Glykosylierung, die GPI-Verankerung oder die Ausbildung einer Disulfidbrücke keine entscheidende Rolle für einen erfolgreichen ER-Import spielen (Abb. 23 und 31).

Die dargestellten Ergebnisse lassen erstmals vermuten, dass Sekundärstrukturen im naszierenden Polypeptid die Translokation modulieren können. Bisher wurde angenommen, dass vorwiegend das Signalpeptid des Proteins die Translokation induziert und reguliert (Kim und Hegde, 2002; Kim et al., 2001; Levine et al., 2005; Hegde und Bernstein, 2006). Für PrP ergaben *in vitro* und *in vivo* Analysen, dass es aufgrund seiner relativ ineffizienten ER-SS im Vergleich zu anderen untersuchten Proteinen mit geringerer Produktivität ins ER importiert wird (Rutkowski et al., 2001; Kim und Hegde, 2002; Levine et al., 2005). Überraschenderweise zeigte die hier durchgeführte Untersuchung, dass der Austausch gegen effiziente Signalpeptide von heterologen Proteinen zwar den ER-Import von PrP fördern kann, aber nicht in der Lage ist, die Translokationseffizienz von Polypeptiden mit



unstrukturierten Domänen (115/31<sup>CHO</sup>+115, 115/31<sup>CHO</sup>+Tau) erheblich zu steigern (Abb. 37). Diese Ergebnisse könnten also ein Indiz dafür sein, dass das Vorhandensein von unstrukturierten Bereichen einen dominanten Effekt auf die ER-Import-Effizienz ausübt. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass alle weiteren untersuchten Konstrukte zwar dieselbe ineffiziente PrP-SS aufweisen, aber abhängig vom Ausmaß der Sekundärstruktur unterschiedlich effizient ins ER importiert wurden.

### 3.1.3 Wie kann die Sekundärstruktur Einfluss auf die Translokation ausüben?

Die durchgeführten Experimente lieferten Evidenzen dafür, dass die Anwesenheit von  $\alpha$ -helikalen Bereichen ausschlaggebend für die Effizienz des ER-Imports ist. Die gängige Annahme, dass die Proteinfaltung erst im ER stattfindet (Stevens und Argon, 1999; Nishikawa et al., 2005; van Anken und Braakman, 2005), wirft jedoch die Frage auf, wie Sekundärstrukturen überhaupt Einfluss auf die Translokation der naszierenden Polypeptide ausüben können. Während der Proteinsynthese dehnt sich die naszierende Polypeptidkette in der ribosomalen Austrittspore aus. Nach erfolgter Interaktion des Ribosoms mit dem Translokation werden die meisten eukaryontischen sekretorischen Proteine schließlich kotranslational durch die Membran ins ER transloziert (Blobel und Dobberstein, 1975a; Blobel und Dobberstein, 1975b; Walter und Blobel, 1980; Walter und Blobel, 1982). Wenn man die Größe des ribosomalen Exit-Tunnels und der Translokationspore in Betracht zieht, so besteht die Möglichkeit, dass naszierende Polypeptide bereits vor Eintritt ins ER eine Sekundärstruktur annehmen (Hamman et al., 1997; Liao et al., 1997; Menetret et al., 2000; Morgan et al., 2002; Lu und Deutsch, 2005b). Tatsächlich konnte in verschiedenen *in vitro* Studien gezeigt werden, dass sich kompakte, vermutlich  $\alpha$ -helikale Strukturen innerhalb dieser Poren ausbilden (Mingarro et al., 2000; Hardesty und Kramer, 2001; Kowarik et al., 2002; Kosolapov et al., 2004; Woolhead et al., 2004). Ob ausgestreckte oder kompaktere, eventuell  $\alpha$ -helikale Polypeptidkonformationen im Ribosomen-Translokation-Kanal entstehen, scheint abhängig von der Hydrophobizität, der Länge und der Neigung der AS zur Ausbildung von  $\alpha$ -Helices zu sein (Mingarro et al., 2000; Lu und Deutsch, 2005a). Zusätzlich ergaben FRET-Experimente, dass die kompakten Strukturen des Polypeptids durch das Ribosom induziert und sogar stabilisiert werden, sodass der ribosomale Exit-Tunnel eine geschützte Umgebung für die initiale Faltung des Polypeptids darstellen könnte (Woolhead et al., 2004).

Diesen Beobachtungen zufolge besteht also bereits vor oder während der Translokation ins ER die Möglichkeit einer beginnenden Proteinfaltung. Demnach kann vermutet werden, dass die Ausbildung von Sekundärstrukturen die weitere Biogenese der naszierenden Polypeptide

beeinflussen könnte. In der Tat zeigte eine kürzlich publizierte Studie, dass der ER-Import durch die Faltung von sich noch im Ribosom befindlichen Domänen der naszierenden Kette moduliert werden kann. Durch die Ausbildung von Sekundärstrukturen im ribosomalen Exit-Tunnel wurde die zeitliche Steuerung beeinflusst, mit der zuvor gebildete Domänen des untersuchten Transmembranproteins Kontakt zum Translokton herstellen und durch die Pore transloziert werden (Daniel et al., 2008).

Wie kann die Sekundärstruktur das Signal zur Translokation weitergeben? Verschiedene, sich nicht gegenseitig ausschließende Szenarien sind vorstellbar. Einerseits könnte die Ausbildung  $\alpha$ -helikaler Strukturen im Exit-Tunnel eine Konformationsänderung am Ribosom und in Folge auch am Translokton auslösen. Denkbar wäre, dass als Reaktion kotranslationaler Faltung im ribosomalen Tunnel die dynamische Interaktion des Ribosoms mit dem Translokton moduliert und dadurch der ER-Import des naszierenden Polypeptids begünstigt wird. Andererseits könnten auch zelluläre Faktoren in die Regulation der Translokation involviert sein. Für die Translokation von Proteinen durch die ER-Membran sind die Kernkomponenten Sec61-Komplex, TRAM und SRP-Rezeptor ausreichend (Görllich und Rapoport, 1993; Voigt et al., 1996). Einige Proteine, darunter auch PrP, benötigen für einen erfolgreichen ER-Import weitere Faktoren wie beispielsweise den TRAP-Komplex. Bisher ist die genaue Funktion dieses Komplexes für die Translokation nicht bekannt. Es konnte aber gezeigt werden, dass vor allem Proteine, die aufgrund ihres schwachen Signalpeptids nicht effizient importiert wurden, verstärkt von diesem Faktor abhängig sind (Fons et al., 2003). Demzufolge könnte man sich vorstellen, dass diese zusätzlichen Komponenten am Translokton auftretende Strukturelemente des Polypeptids erkennen und dadurch dessen Translokation fördern. Schließlich gibt es auch Hinweise darauf, dass die naszierende Polypeptidkette Zugang zum Zytosol haben kann (Liao et al., 1997). So könnte die Rekrutierung von zytosolischen Chaperonen zum Sec61-Komplex die Translokation modulieren (Oyadomari et al., 2006). Indem Chaperone im Zytosol bevorzugt an unstrukturierte Domänen der naszierende Polypeptidkette binden, könnte die Effizienz der Translokation für Proteine mit fehlender Sekundärstruktur vermindert werden.

#### **3.1.4 Die Regulation der Translokation - ein früher Qualitätskontrollmechanismus?**

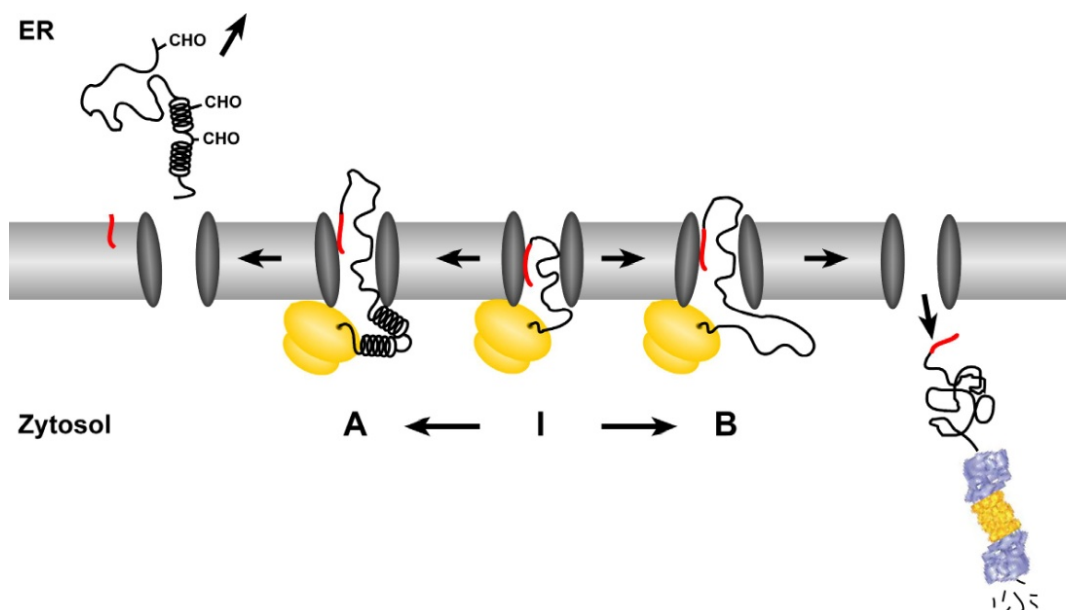
Bisher ging man davon aus, dass sekretorische Polypeptide konstitutiv ins ER importiert werden und erst dort der Qualitätskontrolle (QC) unterliegen, sodass terminal missgefaltete Proteine frühestens im ER erkannt und zurück ins Zytosol transportiert werden, wo sie proteasomaler Degradierung unterliegen (Nakatsukasa und Brodsky, 2008; Vembar und Brodsky, 2008). Interessanterweise ist jedoch bisher kaum etwas über die Qualitätskontrolle

von missgefalteten, GPI-verankerten Proteinen bekannt und ERAD in Säugetierzellen wurde hauptsächlich anhand von Transmembranproteinen studiert. Möglicherweise stellen nicht alle Proteine gleich gute Substrate für ERAD dar, denn in der Tat gibt es Hinweise darauf, dass PrP ein schlechtes ERAD-Substrat ist. Beispielsweise zeigte sich, dass PrP $\Delta$ GPI (S230X), obwohl unvollständig glykosyliert und missgefaltet, nicht von der QC erkannt und abgebaut sondern effizient sekretiert wird (Rogers et al., 1993; Blochberger et al., 1997; Walmsley et al., 2001; Winklhofer et al., 2003; Chesebro et al., 2005) (Abb. 23).

Vor kurzem konnte demonstriert werden, dass die Regulation der Translokation einen alternativen Mechanismus zur posttranslokational stattfindenden ER-assoziierten Degradierung (ERAD) darstellt (Oyadomari et al., 2006, Kang et al., 2006; Hegde und Kang, 2008). Die kotranslokationale Qualitätskontrolle (cQC) scheint ein früher Mechanismus der Zelle zu sein, um nicht-native Proteine vor dem vollständigen ER-Import ins Zytosol zu leiten, wo sie proteasomal abgebaut werden. Bisher ist noch sehr wenig über die cQC und die Faktoren, die sie beeinflussen, bekannt. Eine frühere Studie zeigte, dass die Eigenschaften des Signalpeptids für einen effizienten Import der naszierenden Polypeptide verantwortlich sind und dass vor allem unter ER-Stressbedingungen keine konstitutive Translokation ins ER mehr stattfindet (Kang et al., 2006).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde das Fehlen von Sekundärstruktur als neuer Faktor identifiziert, der eine kotranslokationale QC begünstigen kann. Es konnte gezeigt werden, dass Polypeptide mit langen unstrukturierten Domänen proteasomal degradiert werden und dass kotranslokationale Modifikationen wie die N-Glykosylierung und die Prozessierung des Signalpeptids nicht erfolgten (Abb. 33 und 35). Bereits in früheren Studien wurde das Auftreten einer Proteinfraction mit ungeschnittenem ER-Signalpeptid als ein charakteristisches Merkmal von Substraten der cQC identifiziert (Oyadomari et al., 2006; Kang et al., 2006; Rutkowski et al., 2007). Interessanterweise ergab die hier durchgeführte Analyse, dass p58<sup>IPK</sup>, ein Kochaperon, das vorangegangenen Studien zufolge in die cQC involviert ist (Oyadomari et al., 2006), vor allem bei Polypeptiden mit erweiterten unstrukturierten Domänen am N-Terminus die kotranslokationale Degradierung fördert (Abb. 38, 115 $\alpha_2\alpha_3$ , 115Dpl). Im Gegensatz dazu hatte die Überexpression von p58<sup>IPK</sup> keinen signifikanten Einfluss auf die Translokationseffizienz von Polypeptiden, bei denen N-terminal  $\alpha$ -helikale Domänen synthetisiert wurden (Abb. 38,  $\alpha_2\alpha_3$ 115, Dpl115). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Ausmaß der Modulation durch p58<sup>IPK</sup> abhängig von der Länge und Lage von unstrukturierten Domänen des Proteins ist. Polypeptide mit N-terminalen unstrukturierten Domänen scheinen dementsprechend bevorzugte Substrate für die cQC zu sein.

Basierend auf den hier gezeigten und früheren Ergebnissen ist das folgende Modell der Regulation der Translokation vorstellbar: Nachdem der Ribosomen-Polypeptid-Komplex durch das N-terminale ER-Signalpeptid an den Sec61-Komplex geleitet wurde, könnte die Translation von erweiterten unstrukturierten Domänen eine Verzögerung der Translokation ins ER hervorrufen. Die wachsende Polypeptidkette könnte daraufhin im Translokons oder an der zytosolischen Seite des Translokons in einem Translokations-kompetenten Zustand gehalten werden (Abb. 47, I). Abhängig von Faltungszustand der sich eventuell noch im Ribosom befindlichen naszierenden Peptidkette sind zwei alternative Wege vorstellbar. Die Synthese  $\alpha$ -helikaler Domänen könnte ein Signal zur Fortsetzung der Translokation sein. In diesem Fall würde das Protein effizient ins ER importiert, von der Signalpeptidase prozessiert und von der Oligosaccharyltransferase glykosyliert werden (Abb. 47, A). Enthält die verbleibende Polypeptidkette jedoch keine strukturellen Domänen, so wird das Protein nicht ins ER importiert, sondern direkt ins Zytosol geleitet, wo es proteasomal degradiert werden kann (Abb. 47, B).



**Abb. 47. Modell der kotranslokationalen Qualitätskontrolle von ER-Proteinen mit erweiterten unstrukturierten Domänen.** Nachdem der Ribosomen-Polypeptid-Komplex durch das N-terminale ER-Signalpeptid (rot) an das Translokons geleitet wurde, könnte die Translation von erweiterten unstrukturierten Domänen eine Verzögerung der Translokation hervorrufen. Die wachsende Polypeptidkette könnte in einem Translokations-kompetenten Zustand gehalten werden (I). Abhängig von Faltungszustand der naszierenden Peptidkette wären zwei alternative Wege vorstellbar. Die Synthese  $\alpha$ -helikaler Domänen könnte ein Signal zur Fortsetzung der Translokation und zum erfolgreichen ER-Import sein (A). Enthält die verbleibende Polypeptidkette jedoch keine strukturellen Domänen, so wird das Protein nicht ins ER transloziert sondern direkt ins Zytosol geleitet, wo es proteasomal degradiert werden kann (B). Das Bild des Proteasoms wurde entlehnt von (Voges et al., 1999).

### 3.1.5 Die physiologische Bedeutung der kotranslokationalen Qualitätskontrolle

Das gezeigte Modell wirft die Frage nach der physiologischen Relevanz dieses, im Gegensatz zu ERAD, kotranslokationalen Qualitätskontrollsystems für die Zelle auf. Eine mögliche Erklärung wäre, dass unter physiologischen Bedingungen nur Polypeptide, die überwiegend oder gänzlich unstrukturiert sind, diesem Kontrollmechanismus unterliegen und daher nicht ins ER importiert sondern kotranslokational im Zytosol abgebaut werden (Abb. 41, Gruppe 3). Solche Proteine wären klassische ERAD-Substrate, sodass die cQC einen eleganten Mechanismus darstellt, um die QC-Maschinerie des ER zu entlasten. Wie bereits erwähnt wurde, ist die cQC verstärkt unter ER-Stressbedingungen zu beobachten (Kang et al., 2006). Tatsächlich konnte auch in der hier durchgeführten Studie gezeigt werden, dass ER-Stress die Translokationseffizienz vermindert (Abb. 40). Infolgedessen wäre es möglich, dass unter diesen Bedingungen auch Polypeptide mit erweiterten unstrukturierten Domänen nicht mehr effizient ins ER transloziert werden (Abb. 41, 115 $\alpha_2\alpha_3$ , 115Dpl). Diese sind zwar prinzipiell in der Lage zu falten, aber aufgrund ihrer langen, unstrukturierten Domänen würden sie die Chaperone und Helferproteine im ER stark beanspruchen. Unter Stressbedingungen könnte ein verminderter Import dieser Polypeptide und die damit verknüpfte effiziente proteasomale Degradierung im Zytosol helfen, die Faltungskapazität im Lumen aufrechtzuerhalten und potentiell toxischen Folgen missgefalteter Proteine im ER vorbeugen. Polypeptide mit ausreichend langen  $\alpha$ -helikalen Strukturen scheinen im Gegensatz dazu keine bevorzugten Substrate für die cQC zu sein, da sie selbst unter ER-Stress effizient ins ER transloziert werden. Aus physiologischer Sicht ist ein konstitutiver Import beispielsweise bei lumenalen Chaperonen notwendig, damit sie auch unter Stressbedingungen ihre Funktion in der Proteinfaltung ausüben können. Tatsächlich konnte in einer Studie gezeigt werden, dass ER-Stress keinen Einfluss auf die Translokation von BiP hat (Kang et al., 2006).

### 3.1.6 Die kotranslokationale Qualitätskontrolle - Implikationen für neurodegenerative Erkrankungen

Im vorigen Abschnitt wurde die Regulation der Translokation als ein physiologischer Mechanismus zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase dargestellt. Womöglich kann aber eine verstärkte Beeinträchtigung des ER-Imports über die cQC auch pathophysiologische Folgen haben. Die verminderte Translokation führt zur zytosolischen Lokalisierung von Proteinen, was unter Umständen schwerwiegende Auswirkungen für die Zelle hat. Im Fall von PrP ist die Akkumulation im Zytosol toxisch und kann zur

Neurodegeneration führen (Ma und Lindquist, 2001; Ma et al., 2002; Yedidia et al., 2001; Drisaldi et al., 2003; Rane et al., 2004; Rambold et al., 2006; Orsi et al., 2006). Interessanterweise führt die Induktion der cQC allein aber zu keiner Akkumulation von zytosolischem PrP oder einem signifikanten neurodegenerativen Phänotyp in transgenen Mäusen (Rane et al., 2008). Ein Grund dafür könnte die Tatsache sein, dass zytoPrP effizient vom Proteasom abgebaut werden kann. Erst die abnehmende Aktivität des Proteasoms - beispielsweise während des Alterns (Ding et al., 2006; Hipkiss, 2006; Vernace et al., 2007) oder unter ER-Stress (Menendez-Benito et al., 2005) - sowie eine daraus entstehende Überbelastung des Chaperon-Systems würden die Aggregation von PrP im Zytosol begünstigen und das toxische Potential freilegen. Auch für das mit der Alzheimer-Erkrankung assoziierte Amyloid-Precursor-Protein (APP) gibt es Hinweise für eine ineffiziente Translokation ins ER mit pathophysiologischen Konsequenzen. Einer Studie zufolge beinhaltet APP eine kryptische mitochondriale Signalsequenz. Wird diese in Folge eines verminderten ER-Imports im Zytosol freigesetzt, wird das Protein ins Mitochondrium transloziert, wo es zur mitochondrialen Dysfunktionen beitragen könnte (Anandatheerthavarada et al., 2003).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass wahrscheinlich sowohl die ko- (cQC) als auch posttranslokationalen (ERAD) Qualitätskontrollmechanismen für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase verantwortlich sind. Es wäre denkbar, dass, abhängig von intrinsischen Faktoren des Substrats aber auch von zellulären Faktoren wie beispielsweise dem Ausmaß an ER-Stress, entweder die cQC oder ERAD dafür sorgen, dass aberrante Proteine rasch im Zytosol abgebaut werden. Nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Sekundärstruktur des naszierenden Polypeptids als Signal für einen effizienten ER-Import dient, bleibt nun herauszufinden, auf welchem Weg die Faltung des wachsenden Proteins zur Modulation der Translokation und gegebenenfalls zur kotranslokationalen Degradierung führt. Obwohl die Regulation der Translokation einen physiologischen Mechanismus der Qualitätskontrolle der Zelle darzustellen scheint, besteht auch die Vermutung, dass der verminderte ER-Import bestimmter Proteinen eine zelluläre Dysfunktion zur Folge haben kann. Inwieweit die cQC spezifisch durch die Generierung von zytosolischem PrP oder anderen Proteinen zur Pathophysiologie neurodegenerativer Erkrankungen beiträgt, muss in Zukunft noch aufgeklärt werden.

## **3.2 Teil 2 - Biochemische Charakterisierung von PrP-Homologen aus dem Zebrabärbling (*Danio rerio*)**

Trotz intensiver Forschungsarbeiten der letzten Jahre ist es bisher noch nicht gelungen, den evolutionären Ursprung sowie die physiologische Funktion von PrP vollständig aufzuklären. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass PrP ein von Säugetieren bis zu Amphibien hoch konserviertes Protein ist. Sowohl die Anordnung der strukturellen Domänen als auch die ko- und posttranslationalen Modifikationen von PrP wie die N-Glykosylierung, die Ausbildung einer Disulfidbrücke und die GPI-Verankerung sind zwischen den Spezies stark konserviert (Harris et al., 1991; Gabriel et al., 1992; Schatzl et al., 1995; Wopfner et al., 1999; Simonic et al., 2000; Strumbo et al., 2001; Wuthrich und Riek, 2001). In den vergangenen Jahren wurden auch in mehreren Fischarten, darunter der Zebrabärbling (*Danio rerio*), mit PrP verwandte Proteine gefunden (Gibbs und Bolis, 1997; Suzuki et al., 2002; Oidtmann et al., 2003; Rivera-Milla et al., 2003; Cotto et al., 2005).

### **3.2.1 zePrP1 und zeSho2 zeigen konservierte ko- und posttranslationale Modifikationen sowie eine konservierte zelluläre Lokalisierung**

Im Zuge dieser Arbeit wurden zwei dieser Zebrabärbling-Proteine, zePrP1 und zeSho2, biochemisch charakterisiert. Es sollte analysiert werden, ob sie hinsichtlich der ko- und posttranslationalen Modifikationen sowie der Lokalisierung an der Außenseite der Plasmamembran eine Homologie zu Säugetier-PrP zeigen. Die Analyse ergab, dass zePrP1 und zeSho2 eine N-terminale ER-SS aufweisen, die sie in den sekretorischen Biogeneseweg leitet, wo sie tatsächlich analog zu Säugetier-PrP N-glykosyliert und GPI-verankert werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass in dem verwendeten murinen Zellkulturmodell zePrP1 teilweise und zeSho2 vollständig komplex glykosyliert vorliegt (Abb. 44). Beide Proteine sind außerdem an der Außenseite der Plasmamembran lokalisiert (Abb. 45, 46).

Da angenommen werden kann, dass die Proteinbiosynthese in Fisch- und Säugetier-Zellen analog abläuft, deuten die hier generierten Daten darauf hin, dass die essentiellen Maturierungsschritte von Säugetier-PrP stark konserviert sind und bei den PrP-Homologen im Zebrabärbling ähnlich erfolgen. Die gefundenen Homologien zwischen Säugetier-PrP und den Zebrabärbling-Proteinen geben Anlass zur Vermutung einer evolutionär konservierten Funktion von PrP. Es ist immer noch unklar, wie sich diese Funktion von PrP im Lauf der Evolution entwickelt hat. Insofern können die in dieser Studie gewonnenen Informationen hilfreich sein, um die funktionelle Bedeutung der konservierten Proteindomänen sowie der ko- und posttranslationalen Modifikationen weiter aufzuklären.

### 3.2.2 Sho-Proteine haben möglicherweise eine PrP-ähnliche, protektive Funktion

Neben dem untersuchten Protein zePrP1, das wahrscheinlich das mit PrP am stärksten verwandte Protein des Zebrafisches darstellt, wurde in der hier vorliegenden Arbeit auch zeSho2, ein Mitglied der Sho-Proteinfamilie, analysiert. Sho-Proteine wurden erst vor wenigen Jahren als neue Gruppe von Proteinen identifiziert, die vom Säugetier bis hin zum Zebrafisch vorkommen. Sie zeigen eine hohe AS-Sequenzhomologie untereinander, aber abgesehen von der HD nur geringe Sequenzhomologie zu PrP (Premzl et al., 2004; Premzl et al., 2003). In der hier durchgeführten Studie wurden erstmals Hinweise dafür generiert, dass Sho-Proteine komplex glykosylierte, GPI-verankerte Zelloberflächenproteine sind. Erst kürzlich konnten diese Daten für das murine Sho-Homolog bestätigt werden (Watts et al., 2007). Dies deutet darauf hin, dass wie bei PrP die Proteinmodifikationen und die zelluläre Lokalisierung der Sho-Proteine von Säugetieren bis hin zu Fischen konserviert sind. Darüber hinaus fanden Watts et al. heraus, dass Sho möglicherweise eine neuroprotektive Funktion hat. Sie zeigten auch, dass sich die Expressionsprofile von Sho und PrP im ZNS zwar überlappen, Sho interessanterweise aber genau dort die höchste Expression aufweist, wo PrP am geringsten exprimiert wird (Watts et al., 2007). Aufgrund dieser Beobachtungen und der Tatsache, dass PrP-defiziente Mäuse keinen markanten neurodegenerativen Phänotyp zeigen (Büeler et al., 1992; Manson et al., 1994), könnte vermutet werden, dass Sho eine PrP-ähnliche, konservierte physiologische Funktion hat und bei fehlender PrP-Expression zumindest partiell dessen protektive Aufgaben übernehmen kann. Bemerkenswerterweise wurden reduzierte Expressionslevels von Sho in experimentell mit Scrapie infizierten Mäusen gefunden. Dies lässt vermuten, dass Sho nicht nur ein funktionelles Homolog von PrP ist, sondern auch eine Rolle in der Pathogenese von TSE spielen könnte (Watts et al., 2007). Erst kürzlich konnte eine Studie anhand eines genetischen Screens Varianten des Sho-Gens (*SPRN*) mit humanen Prion-Erkrankungen in Zusammenhang bringen. Eine *frameshift*-Mutation im *SPRN* wurde dabei beispielsweise in zwei nvCJK-Fällen identifiziert (Beck et al., 2008).

Gemeinsam deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Sho ein Mitglied der PrP-Familie ist und sowohl eine PrP-ähnliche physiologische wie auch pathophysiologische Funktion haben könnte. Die Informationen, die durch die hier durchgeführten Analysen bezüglich der Biogenese von Sho gewonnen wurden, könnten sich somit in Zukunft als nützlich erweisen, bis jetzt ungeklärte Aspekte der Funktion von Sho zu entschlüsseln. Zusätzlich würde die Generierung von Sho-defizienten Mäusen sowie Mäusen, die weder PrP noch Sho exprimieren, hilfreich sein, um die Relevanz der neuroprotektiven Funktion dieser neuen Proteinfamilie zu klären.



## 4 Zusammenfassung

Vorangegangene Studien zeigten, dass PrP an der ER-Membran in verschiedenen topologischen Isoformen synthetisiert wird und teilweise sogar im Zytosol vorliegen kann. Sowohl die ER-SS als auch die HD von PrP wurden dabei als Domänen identifiziert, die eine Rolle in der Translokation spielen. Die hier durchgeführte Analyse des ER-Imports von PrP und verschiedenen chimären Proteinen hat nun erstmals gezeigt, dass auch der Faltungszustand von Polypeptiden Einfluss auf deren Translokation ins ER-Lumen haben kann. Die vorliegende Studie ergab, dass - unabhängig von der Primärstruktur - ein gewisses Maß an  $\alpha$ -helikalen Bereichen notwendig für einen produktiven ER-Import ist. Sowohl die Länge der Polypeptide als auch posttranslationelle Modifikationen wie die GPI-Verankerung, die N-Glykosylierung oder die Ausbildung einer Disulfidbrücke beeinflussen die Translokation nicht. Darüber hinaus deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass Proteine mit ausgedehnten unstrukturierten Domänen am N-Terminus einer kotranslokationalen Qualitätskontrolle unterliegen und noch vor der Translokation ins ER-Lumen einer proteasomalen Degradierung im Zytosol zugeführt werden. Die in dieser Doktorarbeit dargestellten Ergebnisse legen daher die Vermutung nahe, dass die Ausbildung von Sekundärstrukturen vor oder während der Translokation die weitere Biogenese des naszierenden Polypeptids beeinflusst. Die gewonnenen Erkenntnisse können dazu beitragen die physiologischen aber auch die möglichen pathophysiologischen Konsequenzen der Regulation der Translokation besser zu verstehen.

Der zweite Teil der Arbeit erbrachte erstmals experimentelle Evidenzen, dass trotz sehr geringer Sequenzhomologie zwischen den PrP-Homologen im Zebrafisch (*Danio rerio*) und Säugetier-PrP<sup>C</sup> die charakteristischen posttranslationalen Modifikationen, wie beispielsweise die komplexe Glykosylierung und der C-terminale GPI-Anker, konserviert sind. Die neu etablierten Zellkulturmodelle zur Analyse von PrP-homologen Proteinen deuten auf eine evolutionär konservierte Funktion von PrP hin und könnten dazu beitragen, neue Einsichten in die physiologische Aktivität von PrP<sup>C</sup> zu gewinnen.

## 5 Material

### 5.1 Biologisches Material

#### 5.1.1 Bakterienstämme

DH5 $\alpha$

Genotyp: *supE44*, *\_lac169* (*\_80lacZ\_M15*)  
*hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *eIA1*  
Herkunft: Hanahan, 1983

#### 5.1.2 Vektoren

pcDNA3.1/ZEO(+)  
pEYFP  
phgMmPrP

Invitrogen, Karlsruhe  
Clontech, Mountain View, CA, USA  
halbgenomisches Maus-PrP Plasmid  
(Fischer et al., 1996)

#### 5.1.3 Zelllinien

N2a

murine Neuroblastomzelllinie  
ATCC-Nr. CCL 131

#### 5.1.4 Antikörper

Anti-PrP 3F4, monoklonal  
Anti-Flag M2, monoklonal  
Anti-Flag, polyklonal  
Anti-Parkin hP1, polyklonal

Signet Laboratories, Dedham, MA, USA  
Sigma, Taufkirchen  
Sigma, Taufkirchen  
Immunisierung eines Kaninchens mit der  
rekombinanten, rückgefalteten terminalen  
Domäne von Parkin

Anti-Parkin hP, polyklonal  
Anti-Kaninchen Antikörper  
(HRP-gekoppelt) aus Esel  
Anti-Maus Antikörper  
(HRP-gekoppelt) aus Schaf

Cell Signaling, Danvers, MA, USA  
Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg  
Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Anti-Maus Antikörper Cy3  
Anti-KDEL (BiP), monoklonal  
Anti-Hsp70 N27, monoklonal  
Anti-Hsp 40, polyklonal  
Anti-Doppel, polyklonal

Dianova, Hamburg  
Stressgene, Ann Arbor, MI, USA  
William Welch  
F.-Ulrich Hartl (Muchowski et al., 2000)  
Immunisierung eines Kaninchens mit  
rekombinant exprimiertem Doppel  
(Gilch et al., 2004)

Anti-GFP, monoklonal  
Anti-GFR $\alpha$ , polyklonal

Roche Diagnostics, Mannheim,  
Sigma, Taufkirchen

#### 5.1.5 Enzyme und Proteine

BSA  
Endoglycosidase H  
Lysozym  
Pfu-Polymerase

USB, Cleveland, OH, USA  
New England Biolabs, Schwalbach  
Sigma, Taufkirchen  
Promega, Mannheim

Phosphatidylinositol-Phospholipase C	Roche Diagnostics, Mannheim
Proteinase K	Boehringer Mannheim, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach
Shrimp-Alkaline-Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim
Streptavidin (HRP-gekoppelt)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Schwalbach
Taq-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
Trypsin	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe

### 5.1.6 Standardgrößenmarker für Proteine und Nukleinsäuren

See Blue Plus2 Proteinmarker	Invitrogen, Karlsruhe
1 kb DNA-Leiter	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
100 bp DNA-Leiter	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

### 5.1.7 Synthetische Oligonukleotide

Die Synthese der Oligonukleotide (Primer) erfolgte von der Firma Metabion (Martinsried) bzw. von der Firma Thermo Electron Corp. (Erlangen).

**Tabelle 3. Auflistung der verwendeten PCR-Primer.**

Name	Sequenz (5'-3')
115115Tau_forw	ATGAAGCATATGGCAGGGGCTGCTGAAGAAGCAGGCAAT
115115Tau_rev	ATTGCCTGCTTCTTCAGCAGCCCCTGCCATATGCTTCAT
115115Xhol_rev	CCGCTCGAGGGAGAAAAGCACGGTTCAAGCCCCTGCCATATG
115Dpl_forw	ATGAAGCATATGGCAGGGGCTGCCAACGTGACCAAGGAGATG
115Dpl_rev	CATCTCCTTGGTCACGTTGGCAGCCCCTGCCATATGCTTCAT
115GFR_forw	AAGCATATGGCAGGGGCTCAGAGCTGCAGCACCAAG
115GFR_rev	CTTGGTGCTGCAGCTCTGAGCCCCTGCCATATGCTT
115-SacII_forw	TCCCCGCGGAAAAGCGGCCAAAGCCTGGA
115-SacII_rev	TCCCCGCGGCGCAGCCCCTGCCATATGCTT
115-Xhol_rev	CCGCTCGAGTCAAGCCCCTGCCATATGCTTCAT
115 $\alpha_2\alpha_3$ -Xhol_rev	GCGCTCGAGCGGCTAGGACTCCTTCTGGTACTG
BiP- HindIII_forw	CCCAAGCTTGGGATGAAGTTCCTATGGTGGCG
BiP-Xhol_rev	CCGCTCGAGCGGCTACAACCTCATCTTTTTCTGA
C178A_forw	GTGCACGACGCGGTCAATATCACC
C178A_rev	GGTATATTGACCGCGTCGTGCAC
Cre5p-HindIII_forw	CCCAAGCTTATGAGACTACTTGCGTTGGTATTGTTATTGTTGTGTGCGCCGCTTCG TGCACCTGGAGGGTGAACACC
Cre5p-WN-HindIII_forw	CCCAAGCTTATGAGACTACTTGCGTTGGTATTGTTATTGTTGTGTGCGCCGCTTCG TGCACCTGGAGGGAATTCACC
Dpl149-Xhol_rev	CCGCTCGAGCGGTTAGCAGTGCTTGGCGGAGCA
Dpl-HindIII_forw	CCCAAGCTTGGGATGAAGAACCGGCTGGGT
Dpl $\Delta$ GPI-Xhol_rev	CCGCTCGAGCGGTCATCCCCTTCCAGCCAGAA
GFR-BamHI_forw	CGCGGATCCGCGATGTTCCCTAGCCACTCTG
GFR- $\alpha_2$ -Xhol_rev	GCGCTCGAGCGGCTAGCAGCGGCAGTTGTACAG

<b>GFR-ΔGPI-XhoI_rev</b>	GCGCTCGAGCGGCTAGCTGGAGGCACCAGCGAG
<b>GH-HindIII_forw</b>	CCCAAGCTTATGGCTGCAGACTCTCAGACTCCCTGGCTCCTGACCTTCAGCCTGC TCTGCCTG
<b>GH-PrP-WN_forw</b>	TGGCTCCTGACCTTCAGCCTGCTCTGCCTGCTGTGGCCTCAAGAGGCTGGTGCTC CTGGAGGGAATTTCCACC
<b>GH-PrP-WN_rev</b>	GGTAAATTCCTCCAGGAGCACCAGCCTCTTGAGGCCACAGCAGGCAGAGCAG GCTGAAGGTCAGGAGCCA
<b>Hdj2-BamHI_forw</b>	CGCGGATCCGCGATGGTCAAAGAAACAACCTTACTACGATG
<b>Hdj2-Cflag-XhoI_rev</b>	CCGCTCGAGTTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAAATCAGAGGTCTGACACTGAAC
<b>HindIII5'</b>	AAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACT
<b>N180Q_forw</b>	TTCGTGCACGACTGCGTCAAATCACCATCAAGCAGCACA
<b>N180Q_rev</b>	GTGCTGCTTGATGGTGATTTGGACGCGAGTCGTGCACGAA
<b>N196Q_forw</b>	ACCACCACCAAGGGGGAGCAATTCACCGAGACCGATGTG
<b>N196Q_rev</b>	CACATCGGTCTCGGTGAATTGCTCCCCCTTGGTGGTGGTGG
<b>p58<sup>IPK</sup>-BamHI_forw</b>	CGCGGATCCATGGTGGCCCCGGCTCG
<b>p58<sup>IPK</sup>-Cflag_rev</b>	CCGCTCGAGTTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAAATCATTGAAGTGGAACTTAAATCT
<b>Parkin-Scel_forw</b>	<u>ATTACCCTGTTATCCCTAATGATAGTGTGGTTCAGGTTTC</u>
<b>Parkin-Scel_rev</b>	<u>TAGGGATAAC AGGGTAATCTACACGTCGAACCAAGTGGTC</u>
<b>pcDNA-HindIII_forw</b>	CCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACG
<b>Q159X-Scel_forw</b>	<u>ATTACCCTGTTATCCCTAATG GCGAACCTTGGCTACTGG</u>
<b>Q159X-Scel_rev</b>	<u>TAGGGATAACAGGGTAATTCAGTTAGGGTAGCGGTACAT</u>
<b>Q159X-Tg_forw</b>	ATGGCGAACCTTGGCTACTGGCTG
<b>Q159X-Tg_rev</b>	AGCCCCTGCCATATGCTT <u>CAT</u>
<b>SSDpl-α<sub>2</sub>α<sub>3</sub>_forw</b>	ACTGATGTCGGCCTCTGCGCCAACGTGACCAAGGAG
<b>SSDpl-α<sub>2</sub>α<sub>3</sub>_rev</b>	CTCCTTGGTACAGTTGGCGCAGAGGCCGACATCAGT
<b>SS-α<sub>2</sub>α<sub>3</sub>_forw</b>	ACTGATGTCGGCCTCTGCCAGAACAACCTTCGTGCAC
<b>SS-α<sub>2</sub>α<sub>3</sub>_rev</b>	GTGCACGAAGTTGTTCTGGCAGAGGCCGACATCAGT
<b>Tau220_XhoI_rev</b>	CCGCTCGAGCGGTCAAGTACCGCTGCGATCCCCTGA
<b>W453X-Scel_rev</b>	<u>TAGGGATAACAGGGTAATCTACTCGCAGCCACAGTTCCA</u>
<b>WN31/32NF_forw</b>	AAGCGGCCAAAGCCTGGAGGGAATTTACCAGGTGGAAGCCGGTATCCCCGGG
<b>WN31/32NF_rev</b>	CCCGGGATACCGGCTTCCACCGGTGAAATTCCTCCAGGCTTTGGCCGCTT
<b>XhoI3'</b>	CCCTCTAGACTCGAGGGCGCCATCCCCAAACAGTGG
<b>zeSho2_forw</b>	CCGCTCGAGCGGATGCTGGGCAATCAGAAGCTGCTGATCATATGGGTGTGGATGTT G
<b>zeSho2_rev</b>	CCCAAGCTTGGGTCAAGCCCACATAATAACAAC
<b>zeSho2-SS_forw</b>	ATATGGGTGTGGATGTTGCTGTTGGCGTCGCTGTGCCCTTGTGGCACTGTGACTA CAAGGATGACGAT
<b>zeSho2-SS_rev</b>	ATCGTCATCCTTGTAGTCACAGTGCAAACAAGGGCACAGCGACGCCAACAGCAAC ATCCACACCCATAT
<b>zytoPrPHindIII_forw</b>	AAGCTTAAGCGGCCAAAGCCTGGA
<b>α<sub>2</sub>α<sub>3</sub>115_forw</b>	CAGTACCAGAAGGAGTCCAAAAAGCGGCCAAAGCCTGG
<b>α<sub>2</sub>α<sub>3</sub>115_rev</b>	CCAGGCTTTGGCCGCTTTTTGGACTCCTTCTGGTACTG
<b>α<sub>2</sub>α<sub>3</sub>Dpl_forw</b>	TGCTCCGCCAAGCACTGCAAAAAGCGGCCAAAGCCT
<b>α<sub>2</sub>α<sub>3</sub>Dpl_rev</b>	AGGCTTTGGCCGCTTTTTGCAGTGCTTGGCGGAGCA
<b>Δα<sub>2</sub>_forw</b>	AAGCATATGGCAGGGGCTTTCACCGAGACCGATGTG
<b>Δα<sub>2</sub>_rev</b>	CACATCGGTCTCGGTGAAAGCCCCTGCCATATGCTT

## 5.2 Chemikalien/Reagentien

Aceton	Merck, Darmstadt
Agarose	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Boehringer Mannheim, Mannheim
Amplify®	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
APS	USB, Cleveland, OH, USA
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Biotin	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Complete Protease-Inhibitor	Boehringer Mannheim, Mannheim
Desoxycholat	Sigma, Taufkirchen
Desoxynucleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Sigma, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
EDTA	USB, Cleveland, OH, USA
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Sigma, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
FCS	Invitrogen, Karlsruhe
Formamid	Merck, Darmstadt
Geneticin	Sigma, Taufkirchen
Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Glutaraldehyd	Sigma, Taufkirchen
Glycerol	USB, Cleveland, OH, USA
Glycin	USB, Cleveland, OH, USA
Harnstoff	Sigma, Taufkirchen
Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Immersionsöl	Merck, Darmstadt
Instant-Magermilchpulver	Uelzena, Uelzen
Kaliumacetat	Sigma, Taufkirchen
Kaliumchlorid	USB, Cleveland, OH, USA
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kupfersulfat	Sigma, Taufkirchen
L-[ <sup>35</sup> S]-Methionin	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Lachsspermien-DNA	Sigma, Taufkirchen
Lipofectamine Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	USB, Cleveland, OH, USA
Manganchlorid	Sigma, Taufkirchen
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natrium-Diatrizoat	Sigma, Taufkirchen
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma, Taufkirchen
PBS Dulbecco's -/- Mg/Ca	Invitrogen, Karlsruhe
PBS Dulbecco's +/- Mg/Ca	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin	Invitrogen, Karlsruhe

Pepton	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Plus Reagens	Invitrogen, Karlsruhe
Polyacrylamid/Bisacrylamid (29:1) 40%	Roth, Karlsruhe
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
ProMix <sup>35</sup> S-Methionin/Cystein	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Protease-Inhibitor Mix	Sigma, Taufkirchen
Protein A-Agarose	Pierce, Perbio Science, Bonn
Protein A-Trisacryl-Matrix	Pierce, Perbio Science, Bonn
Protein G-Matrix	Pierce, Perbio Science, Bonn
Proteasominhibitor MG132	Calbiochem, Bad Soden
RediPrime™ II DNA Labeling System	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Rubidiumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Sarkosyl	USB, Cleveland, OH, USA
SDS	Roth, Karlsruhe
Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Thapsigargin	Sigma, Taufkirchen
TEMED	USB, Cleveland, OH, USA
Trichloressigsäure	Sigma, Taufkirchen
Tris	USB, Cleveland, OH, USA
Triton X-100	USB, Cleveland, OH, USA
Trypan Blau	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsininhibitor	Invitrogen, Karlsruhe
Trypton	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Tunicamycin	Sigma, Taufkirchen
Tween-20	USB, Cleveland, OH, USA
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt

### 5.3 Lösungen und Puffer

APS-Lösung	10% Ammoniumperoxodisulfat in PBS
Blockierungsmilch für Western Blot	5% Magermilchpulver in 1x PBST
Blockierungspuffer für IF	1% BSA in PBS
BSA (100x)	New England Biolabs, Schwalbach
Church-Puffer	500 mL 1M NaPi 350 mL 20% SDS 10 g BSA 10 mL ssDNA (10 ng/mL) ad 1000 mL
Church-Waschpuffer	40 mM NaPi 1% SDS
Coomassie-Entfärbelösung	40% Methanol 7% Essigsäure
DEPC-Wasser	1mL DEPC in 1 L H <sub>2</sub> O o/n 37°C, dann autoklavieren
DNA-Probenpuffer (6x)	0.25% Bromphenolblau 30% Glycerol

---

Fixierlösung	40% Methanol 7% Essigsäure
Laemmli-Probenpuffer (2x)	120 mM Tris pH 6.8 2% SDS 20% Glycerol 0.5% Bromphenolblau 2% Mercaptoethanol
Laemmli-Probenpuffer (4x)	240 mM Tris pH 6.8 4% SDS 40% Glycerol 1% Bromphenolblau 4% Mercaptoethanol
Laufpuffer für SDS-Page (10x)	250 mM Tris, pH 6,8 1,9 M Glycin 1% SDS
Lysepuffer	0,5% Triton X-100 0,5% DOC in PBS
Lysepuffer IP	0,5% Triton X-100, 0,5% DOC + Protease- Inhibitor in PBS
Lysepuffer M	100 mM Tris 5 mM EDTA 0,2% SDS 200 nM NaCl 100 µg/mL Proteinase K (frisch zugeben)
MG132	10 mM MG132 in DMSO
NaPi (1M)	89 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 4 mL 85% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ad 1000 mL
PCR-Mix	1200 µL H <sub>2</sub> O 200 µL 10x Pfu/Taq-Puffer je 2 µL dNTP
PBS (Zellkultur)	Gibco, BRL Life Technologies, Karlsruhe
PBS (10x)	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> für 1000 mL H <sub>2</sub> O
PBS-T (10x)	1% Tween-20 in 1x PBS
Pfu-Polymerase-Puffer (10x)	Promega, Mannheim
Ponceau S – Färbelösung	0,2 g Ponceau S 5 mL Essigsäure H <sub>2</sub> O ad 100 mL
RNA-Gel (1,5%)	2,25 g Agarose + 115 mL DEPC-H <sub>2</sub> O aufkochen und auf 50°C abkühlen lassen +7,5 mL 20x RNA-Gellaufpuffer + 27 mL Formaldehyd
RNA-Gellaufpuffer (20x)	0,8 M MOPS

	0,2 M NaOAc
	20 mM EDTA
	pH 7,0, in DEPC H <sub>2</sub> O, autoklaviert
RNA-Resuspensionspuffer	6 µL H <sub>2</sub> O
	1 µL 20x RNA-Gellaufpuffer
	3,5 µL Formaldehyd
	10 µL Formamid
Sammelgelpuffer für SDS-Page	0,5M Tris, pH 6,8
	0,4% SDS
	pH 6,8
Shrimp-Alkaline-Phosphatasepuffer (10x)	Roche Diagnostics, Mannheim
SSC (10x)	87,5 g NaCl
	44,1 g Na <sub>3</sub> -Citrat-Dihydrat
	H <sub>2</sub> O ad 1000 mL, pH 7,0
T4-DNA-Ligase-Puffer (10x)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris-Base
	57,1 mL Eisessig
	50 mM Na <sub>2</sub> EDTA x 2H <sub>2</sub> O, pH 8,0
	H <sub>2</sub> O ad 1000 mL
Thapsigargin	1 mM in DMSO
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 7,5
	1 mM EDTA, pH 8,0
TFB1 (pH 5,8)	30 mM Kaliumacetat
	100 mM RbCl
	10 mM CaCl <sub>2</sub>
	50 mM MnCl <sub>2</sub>
	15 % Glycerol
TFB2 (pH 6,5)	10 mM MOPS
	75 mM CaCl <sub>2</sub>
	10 mM RbCl
	15 % Glycerol
Transferpuffer für Western Blot	20 mM Tris-Base
	150 mM Glycin
	0,01% SDS
	20% Methanol
Trenngelpuffer für SDS-Page	1,5M Tris, pH 8,8
	0,4% SDS
	pH 8,8
Tunicamycin	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O

#### 5.4 Medien

*Dulbecco's Modified*

*Eagle's Medium (DMEM)*

*Minimal Essential Medium (MEM)*

*Minimal Essential Medium*

ohne L-Methionin

Invitrogen, Karlsruhe

Invitrogen, Karlsruhe

Invitrogen, Karlsruhe

Invitrogen, Karlsruhe



OPTIMEM	Invitrogen, Karlsruhe
LB-Medium	1% NaCl 1% Bacto Trypton 0,5% Hefeextrakt 100 µg/mL Ampicillin bzw. 30 µg/mL Kanamycin (nach dem Autoklavieren)
LB-Agar	LB-Medium + 1,5% Bacto Agar 100 µg/mL Ampicillin bzw. 30 µg/mL Kanamycin (nach dem Autoklavieren)

## 5.5 Kits

ECL RPN 2106	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Immobilon Western Chemolumineszenz HRP-Substrat	Millipore, Schwalbbach
Nucleobond Mini-Kit	Macherey-Nagel, Düren
Nucleospin Gelextraktionskit	Macherey-Nagel, Düren
Protein Assay Kit	Bio-Rad, München
QIAprep Spin Plasmidextraktionskit Mini/Maxi	Qiagen, Hilden
QIAquick Gelextraktionskit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini und Maxi	Qiagen, Hilden
TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System + raue Mikrosomen aus ER	Promega, Mannheim  Promega, Mannheim

## 5.6 Geräte

Agarosegel-Elektrophoresekammern	Zentralwerkstatt, MPI, Martinsried
Analysenwaage Mettler Toledo AG285	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Brutschränke	Heraeus, Hanau
Filmentwickler X-Omat	Kodak, Stuttgart
Geldokumentation MWG	Biotech, Ebersberg
Geltrockner SGD300	Savant, Holbrook, NY, USA
Kühlzentrifuge GS-6R mit Rotor GH3.8	Beckmann, Unterschleissheim
Kühlzentrifuge J2-21M mit Rotor JA-14	Beckmann, Unterschleissheim
Kultur-Schüttler Forma Scientific 4518	ThermoQuest, Egelsbach
Mikroskop Axiovert 25, 200M	Carl Zeiss, Göttingen
Mikroskop Axioscope2 plus (Software Axiovision)	Carl Zeiss, Göttingen
pH-Meter	Fischer Scientific, Nidderau
Phosphoimager FLA-2000 (mit Software AIDA)	Fuji Photo Film, Düsseldorf
Pipetten (P10, P20, P100, P200)	Gilson Abimed, Langenfeld
Pipette (P1000)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipet-aid	Drummond Scientific, Broomall, PA, USA
Polyacrylamidgel-Elektrophorese-	Amersham Biosciences, Freiburg

kammer Hoefler SE600	
PowerSupply EPS	Amersham Biosciences, Freiburg
Power Supply EPS 2A200	Amersham Biosciences, Freiburg
Reinstwasseranlage Milli-QPLUS	Millipore, Eschborn
Schwenktisch GFL 3017	Merck eurolab, Ismaning
Spektralphotometer DU-640	Beckmann, Unterschleissheim
T1 und T3 Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Transferkammer Hoefler TE-Serie	Amersham Biosciences, Freiburg
Überkopfmischer Heidolph REAX 2	Merck Eurolab, Ismaning
UV-Tisch Foto/UV 21	Fotodyne, Hartland, WI, USA
Vortex	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Waage Mettler Toledo PB602	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Wasserbad MT	Roth, Karlsruhe
Zählkammer, Neubauer	Merck eurolab, Ismaning
Tischzentrifuge Biofuge A	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Tischkühlzentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg

## 5.7 Sonstige Materialien

Deckgläschen (diverse Größen)	neoLab, Heidelberg und Roth, Karlsruhe
Elutip-D Minisäulchen	Schleicher&Schuell, Dassel
Einmalkanülen Neolus	Terumo, Tokyo, Japan
21G, 23G, 27G	
Einmalpipetten, steril	Nunc, Wiesbaden
Einmalspritzen	Braun, Melsungen
Expositionskassetten	Fischer Scientific, Nidderau
HybondXL Transfermembran	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Objektträger 76 x 26 mm	neoLab, Heidelberg
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Polypropylen-Zentrifugenröhren	Falcon, Heidelberg
Polysterol-Röhrchen, steril, 18 x 95 mm	Greiner, Frickenhausen
Protran Nitrocellulose	Schleicher & Schüll, Dassel
ProbeQuant G50 Säulchen	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Safe-Lock Micro Test Tubes	Eppendorf, Hamburg
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 mL	Abgene, Hamburg
Röntgenfilme Kodak	Sigma, Deisenhofen
Röntgenfilme Fuji	Fujifilm Deutschland, Düsseldorf
Sterilfilter Millex®-HA 0,45µm	Millipore, Eschborn
Sterilfilter Millex®-GS 0,22µm	Millipore, Eschborn
Whatman Chromatographie-Papier	Schleicher & Schüll, Dassel
Zellkulturflaschen	BD Biosciences Falcon, Heidelberg
Zellkulturschalen 3,5, 6 und 10 cm	BD Biosciences Falcon, Heidelberg
Zellschaber	Corning Inc., Corning, NY, USA

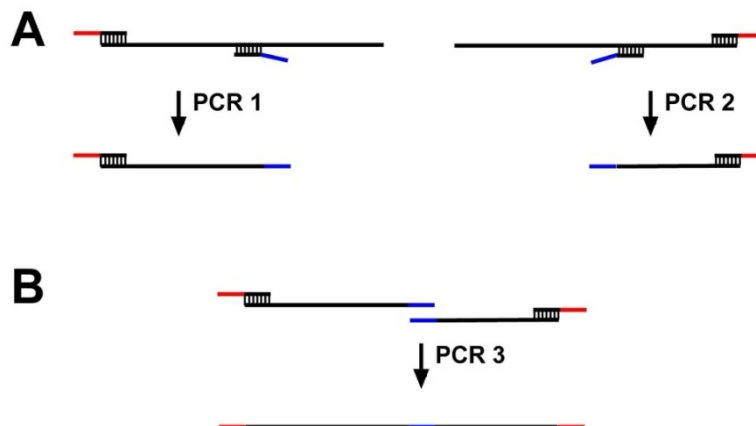
## 6 Methoden

### 6.1 Molekularbiologische Methoden

#### 6.1.1 Rekombinante Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur selektiven Amplifikation von DNA Fragmenten dient die sogenannte Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) (Saiki et al., 1988). Die Generierung der verschiedenen in dieser Arbeit gezeigten DNA-Konstrukte bedingt unter anderem das Verknüpfen verschiedener Genabschnitte ohne das Einfügen von Restriktionsschnittstellen. Dies geschieht mittels der sogenannten rekombinanten PCR (Higuchi, 1990). Dabei werden in zwei getrennten Ansätzen DNA Fragmente mit Oligonukleotiden (Primern) mit überlappender Sequenzhomologie amplifiziert. Diese dienen dann in einer zweiten Reaktion als Matrize und die hybridisierenden Sequenzhomologien als interne Primer (Abb. 48).

Durch die entsprechende Wahl der internen Primer können sowohl Mutationen als auch Insertionen oder Deletionen in ein Genfragment eingefügt werden, während die externen Primer jeweils eine Schnittstelle für eine Restriktionseendonuklease enthalten und der Amplifikation des Produktes dienen.



**Abb 48. Klonierungsstrategie zur Einführung einer Insertation mittels rekombinanter PCR. (A)** Die beiden zu verknüpfenden Fragmente (schwarz) werden separat per PCR amplifiziert (PCR 1 und PCR 2). Dabei enthalten die internen Primer jeweils die einzufügende Sequenz (blau) während die äußeren Primer (rot) die Restriktionsschnittstellen aufweisen. **(B)** In der folgenden PCR-Reaktion (PCR 3) lagern sich die überlappenden Sequenzen aneinander und fungieren somit als interne Primer. Fragmente mit der vollständigen Länge werden durch die externen Primer amplifiziert (rot).

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Ansatz mit je 4 pmol Primer 1 und Primer 2, je 0,25 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP und 100 ng Matrizen-DNA in Reaktionspuffer und autoklaviert destilliertem Wasser durchgeführt. Dazu wurde zum Schluss 2,5 U DNA-Polymerase (Pfu bei 72°C, Taq bei 73°C) zupipettiert, gut gemischt und nach folgendem PCR-Standardprogramm amplifiziert (siehe Tabelle 4). Die Elongationszeit richtet sich nach der Länge des zu amplifizierenden Konstrukts sowie der verwendeten Polymerase.

**Tabelle 4. PCR-Programm für Standard-Klonierungen.**

Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholung
Denaturierung	95°C	3'	
Denaturierung	95°C	30''	28x
Primer-Anlagerung	50-55°C	45''	
Elongation	72/73°C	1-2'	
Finale Elongation	72/73°C	5'	
Ende	4°C	∞	

Die PCR-Produktgröße wurde durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die Fragmente wurden mit dem Qiagen QIAquick beziehungsweise Macherey-Nagel Gelextraktions-Kit isoliert und in den entsprechenden Vektor ligiert.

### 6.1.2 Klonierung der Konstrukte für die Analyse des ER-Imports

Die mutierten PrP-Genfragmente wurden alle in den eukaryontischen Expressions-Vektor pcDNA3.1/ZEO(+), der unter der Kontrolle des CMV (Cytomegalie-Virus)-Promotors steht, ligiert. Als Matrize diente das Plasmid pcDNA3.1-3F4. Dieses enthält den offenen Leserahmen (*open reading frame*, ORF) des Maus-PrP (Genbank™ M18070), jedoch mit zwei Punktmutationen (L108M und L111M). Diese beiden Mutationen entsprechen den AS des menschlichen PrP und erlauben eine Detektion des Proteins mit dem mAb 3F4 (Kascsak et al., 1987). Die Konstrukte S230X (= PrPΔGPI), Δ27-89/S230X, Δ27-156/S230X und Doppel (Dpl) wurde schon früher beschrieben (Winklhofer et al., 2003; Heske et al., 2004, Uelhoff et al., 2005). Das „X“ in den Namen der Konstrukte bezeichnet ein Stopcodon (TAG, TAA oder TGA).

Die Klonierung der PrP-Mutanten wurde ausgehend vom Plasmid pcDNA3.1-3F4 mit Standard PCR-Kloniertechniken durchgeführt und wenn nicht anders angegeben über die

Restriktionsschnittstellen 5'-HindIII und XhoI-3' kloniert (siehe Tabelle 3, Abschnitt 5.1.7). Die folgenden AS-Angaben beziehen sich ausschließlich auf die Sequenz von Maus-PrP. Tabelle 5 zeigt die generierten PrP-Mutanten und chimären Proteine.

**Tabelle 5. Verwendete PrP-Mutanten und Chimäre.** Sofern nicht anders angegeben, ist die Aminosäurenummerierung von PrP gezeigt. Des Weiteren sind die Namen der Vorwärts (*forward*)- und Rückwärts (*reverse*)-Primer mit denen die jeweiligen Konstrukte kloniert wurden aufgelistet.

Name	Aminosäuren (von - bis)	Primer forward	Primer reverse
<b>115<math>\alpha_2\alpha_3</math></b>	1-114 + 171-221	kloniert von S. Kiachopoulos	
<b>115<math>\alpha_2</math></b>	1-114 + 171-196	kloniert von S. Kiachopoulos	
<b>115<math>\alpha_3</math></b>	1-114 + 195-221	HindIII5' $\Delta\alpha_2$ _forw	$\Delta\alpha_2$ _rev 115 $\alpha_2\alpha_3$ -XhoI_rev
<b>a<math>\alpha_3</math>115</b>	1-22 + 171-221 + 23-114	pcDNA-HindIII_forw SS- $\alpha_2\alpha_3$ _forw $\alpha_2\alpha_3$ 115_forw	SS- $\alpha_2\alpha_3$ _rev $\alpha_2\alpha_3$ 115_rev 115 $\alpha_2\alpha_3$ -XhoI_rev
<b>115/31<sup>CHO</sup>+115</b>	1-114 + 23-115	HindIII5' 115-SacII_forw	115-SacII_rev 115115-XhoI_rev
<b>115/31<sup>CHO</sup>GFR</b>	1-114 + GFR (40-89)	HindIII5' 115GFR_forw	115GFR_rev GFR- $\alpha_2$ -XhoI_rev
<b>115/31<sup>CHO</sup>+Tau</b>	1-114 + Tau (103-197) beinhaltet einen AS-Austausch an der Position 108 (I108N)	HindIII5' 115115Tau_forw	115115Tau_rev Tau220-XhoI_rev
<b>115Dpl</b>	1-114 + Dpl (98-149)	HindIII5' 115Dpl_forw	115Dpl_rev Dpl149-XhoI_rev
<b>Dpl115</b>	1-22 + Dpl (98-149) + 23-114	pcDNA-HindIII_forw SSDpl- $\alpha_2\alpha_3$ _forw $\alpha_2\alpha_3$ Dpl_forw	SSDpl- $\alpha_2\alpha_3$ _rev $\alpha_2\alpha_3$ Dpl_rev 115-XhoI_rev
<b>115<math>\alpha_2\alpha_3</math>/31<sup>CHO</sup> N196Q</b>	1-114 + 171-221	HindIII5' N196Q_forw	N196Q_rev 115 $\alpha_2\alpha_3$ -XhoI_rev
<b>115<math>\alpha_2\alpha_3</math>/31<sup>CHO</sup> N196QN180Q</b>	1-114 + 171-221	HindIII5' N180Q_forw	N180Q_rev 115 $\alpha_2\alpha_3$ -XhoI_rev
<b>115<math>\alpha_2\alpha_3</math>C178A</b>	1-114 + 171-221	HindIII5' C178A_forw	C178A_rev 115 $\alpha_2\alpha_3$ -XhoI_rev

Das Plasmid für den GDNF-Rezeptor  $\alpha$  (GFR $\alpha$ , Genbank<sup>TM</sup> CAA05171) aus der Ratte wurde freundlicherweise von Zhe-Yu Chen (Department of Neurobiology, the Second Military Medical University, Shanghai) zur Verfügung gestellt. Das Plasmid für humanes Tau40/P301L wurde von Eva M. Mandelkow bereitgestellt.

In PrP/31<sup>CHO</sup>, Q159X/31<sup>CHO</sup>, W144X/31<sup>CHO</sup>, M133X/31<sup>CHO</sup>, A115X/31<sup>CHO</sup>, 115 $\alpha_2\alpha_3$ /31<sup>CHO</sup>, 115 $\alpha_2\alpha_3$ /31<sup>CHO</sup>N196Q, 115 $\alpha_2\alpha_3$ /31<sup>CHO</sup>N196QN180Q, 115/31<sup>CHO</sup>GFR, 115/31<sup>CHO</sup>+115 und

115/31<sup>CHO</sup>+Tau wurden die Aminosäuren W und N an den Positionen 31 und 32 durch N und F ersetzt, was die Generierung eines zusätzlichen Erkennungsmotivs für die N-Glykosylierung zur Folge hat (N-F-T). Dafür wurden die internen Primer WN31/32NF\_forw und WN31/32NF\_rev verwendet (vgl. Tabelle 3, Abschnitt 5.1.7). Die Konstrukte PrP/31<sup>CHO</sup> und Q159X/31<sup>CHO</sup>, sowie die Konstrukte 115 $\alpha_2\alpha_3$  und 115 $\alpha_2$  wurden von Frau Dr. Sophia Kiachopoulos kloniert.

Die zytosolischen Versionen der PrP-Mutanten wurden durch Deletion der ER-Signalsequenz (AS 2-22) konstruiert, wofür jeweils der Primer zytoPrP-HindIII\_forw verwendet wurde (vgl. Tabelle 3, Abschnitt 5.1.7). Für die Klonierung der Mutanten mit der Hefe-Cre5p- oder Ratten Wachstumshormon- (*growth hormone*, GH-) Signalsequenz wurden die AS 1-27 von PrP, die die endogene ER-SS enthalten, durch die ER-SS von Cre5p (MRLALVLLLLCAPLRA) beziehungsweise GH (MAADSQTPWLLTFSLLCLLWPQEAGA) ersetzt (siehe Tabelle 6).

**Tabelle 6. Verwendete PrP-Mutanten mit heterologem Signalpeptid.** Gezeigt sind die jeweiligen Konstrukte sowie die verwendeten Primerpaare.

Name	Primer forward	Primer reverse
<b>Cre5p-PrP</b>	Cre5p-HindIII_forw	XhoI3'
<b>Cre5p-115<math>\alpha_2\alpha_3</math></b>	Cre5p-HindIII_forw	115 $\alpha_2\alpha_3$ -XhoI_rev
<b>Cre5p-115/31<sup>CHO</sup>+115</b>	Cre5p-WN-HindIII_forw	115115-XhoI_rev
<b>GH-115/31<sup>CHO</sup>+115</b>	GH-HindIII_forw GH-WN_forw	GH-WN_rev 115115-XhoI_rev

Um die Konstrukte von Dpl und GFR mit fehlender GPI-SS zu generieren, wurden die AS 158-179 (Dpl) und AS 426-463 (GFR) deletiert. Das Plasmid für die Expression von p58<sup>IPK</sup> wurde freundlicherweise von David Ron bereitgestellt. In dieses Plasmid wurde ein C-terminales Flag-Epitop (DYKDDDDK) ins Protein eingefügt. Die Plasmide für EYFP-Hsp70, Hdj1 und Hdj2 wurden von Richard I. Morimoto bereitgestellt (Kim und Hegde, 2002). Die Konstrukte für Hamster-BiP (freundlicherweise bereitgestellt von Linda Hendershot) und Hdj2 wurden in pcDNA3.1 subkloniert. Hdj2 wurde mit einem C-terminalen Flag-Epitop versehen (siehe Tabelle 7).

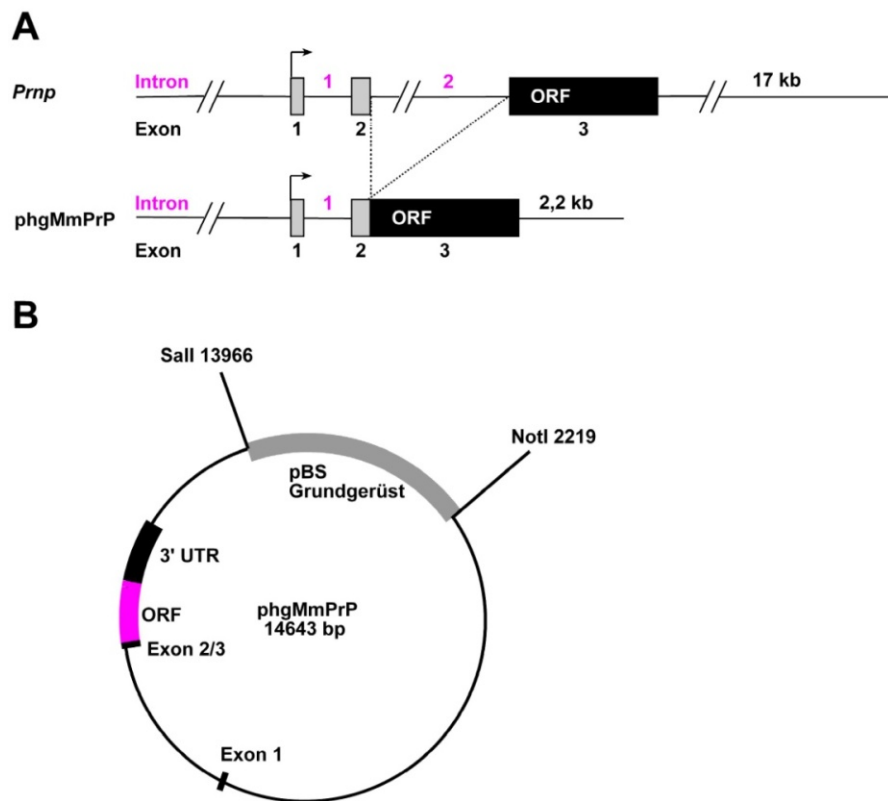
**Tabelle 7. Weitere verwendete Konstrukte.** Gezeigt sind die Namen der Konstrukte sowie die verwendeten Primerpaare.

Name	Primer forward	Primer reverse
<b>DplΔGPI</b>	Dpl-HindIII_forw	DplΔGPI-XhoI_rev
<b>GFRΔGPI</b>	GFR-BamHI_forw	GFR-ΔGPI-XhoI_rev
<b>p58<sup>IPK</sup>-Cflag</b>	p58 <sup>IPK</sup> -BamHI_forw	p58 <sup>IPK</sup> -Cflag_rev
<b>BiP</b>	BiP-HindIII_forw	BiP-XhoI_rev
<b>Hdj2-Cflag</b>	Hdj2-BamHI_forw	Hdj2-Cflag-XhoI_rev

### 6.1.3 Generierung der transgenen Mäuse PrP-Q159X, Parkin und Parkin-W453X

Der 474 Basenpaar (bp) lange ORF der murinen PrP-Stopmutante Q159X (mit humanem 3F4 Epitop) wurde, um die Restriktionsschnittstellen für die Endonuklease I-Sce I einzufügen, mit den Primern Q159X-SceI\_forw und Q159X-SceI\_rev mittels PCR amplifiziert. Analog wurde humanes Parkin (Genbank<sup>TM</sup>, NM004562) und die Stop-Mutante W453X mit den Primern Parkin-SceI\_forw und Parkin-SceI\_rev beziehungsweise W453X-SceI\_rev kloniert (vgl. Tabelle 3, Abschnitt 5.1.7). Die PCR-Fragmente wurden anschließend in das halbgenomische Maus-PrP-Plasmid (phgMmPrP, Fischer et al., 1996, Abb. 49) ligiert, das freundlicherweise von Herrn Prof. Kretzschmar zur Verfügung gestellt wurde.

Der fertiggestellte Vektor wurde mit Not I und Sal I verdaut um das bakterielle Vektor-Gerüst zu entfernen und über darauffolgende Gel-Elektrophorese und Elektroelution isoliert. Die DNA wurde mittels Elutip-D-Mini-Säulen laut Hersteller aufgereinigt und nach Ethanol-Präzipitation in Injektionspuffer (10 mM TrisHCl, 0.2 mM EDTA, pH 7.5 in Wasser höchster Reinheit) verdünnt. Die Mikroinjektion fand am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt von Herr M. Bösl statt (Zeilhofer et al., 2005).



**Abb. 49. Schematische Darstellung des phgMmPrP-Vektors. (A)** Für die Konstruktion des phgMmPrP-Vektors (Fischer et al., 1996) wurde aus dem murinen *Prnp*-Gen das 6-12 Kilobasen (kb) große Intron 2 (Westaway et al., 1994) deletiert sowie die 3' flankierende Region bis auf 2,2 Kilobasen gekürzt. **(B)** Darstellung des fertigen Vektorkonstrukts, das für die Generierung der transgenen Mäuse eingesetzt wurde. Eingezeichnet ist die Lage der Exons und des ORF von *Prnp* sowie die Lage des bakteriellen Grundgerüsts, das mittels Restriktionsverdau mit Sal I und Not I entfernt wurde. Der so linearisierte und anschließend aufgereinigte Vektor wurde per Mikroinjektion in die Mäuse injiziert.

Im Alter von drei Wochen wurden die Tiere mit einer Ohrmarke markiert und eine Schwanzbiopsie für die Genotypisierung des Transgens (Tg) genommen. Die Genotypisierung erfolgte aus gereinigter DNA mittels PCR bei Standardbedingungen, jedoch bei 65°C Anlagerungstemperatur unter Verwendung der Primer Q159X-Tg\_forw, Q159X-Tg\_rev (vgl. Tabelle 3, Abschnitt 5.1.7) und DMSO als Zusatz. Der Rückwärts-Primer ist spezifisch für das Transgen, da er die Mutationen für das humane 3F4 Epitop, das nur im Transgen und nicht in der genomischen Maus-DNA vorkommt, beinhaltet.



#### 6.1.4 Klonierung der Zebrabärbling PrP-Homologen

Die cDNA der Zebrabärbling-Proteine zePrP1 und zeSho2 (Genbank™ AJ850286 für zePrP1 mit einer zusätzlichen Deletion der AS 199-235 und AJ583089 für zeSho2) wurde von der Gruppe von Michael Baier aus RNA von Zebrabärbling-Gehirnen gewonnen und in das Plasmid pcDNA3.1/ZEO(+) eingefügt. Ausgehend von den erhaltenen Plasmiden im pcDNA3.1-Expressionsvektor wurde bei beiden Konstrukten ein Flag-Epitop (DYKDDDDK) an der AS-Position 24 bei zePrP1 und der AS-Position 26 bei zeSho2 eingefügt. Bei zeSho2 wurde das in der Genbank gefundene Signalpeptid mittels PCR eingefügt (siehe Tabelle 8).

**Tabelle 8. Generierung der Zebrabärbling PrP-Homologen.**

Name	Primer forward	Primer reverse
zeSho2	zeSho2-HindIII_forw zeSho2-SS_forw	zeSho2-SS_rev zeSho2-XhoI_rev

#### 6.1.5 Herstellung kompetenter Bakterien

Um Zellen von *Escherichia coli* (*E.coli*) kompetent, das heisst aufnahmefähig für Plasmid-DNA, zu machen, kann die Zellwand mittels divalenten Kationen destabilisiert werden (Sambrook, 1989). Dafür wurden zunächst 2 mL *Luria Broth* (LB)-Medium als Vorkultur mit einer Bakterienkolonie des *E.coli*-Stammes DH5 $\alpha$  beimpft und 16 h bei 37°C geschüttelt. Der Ansatz wurde anschließend in 250 mL LB-Medium gegeben und 2-3 h lang bis zu einem OD<sub>590</sub>-Wert zwischen 0,4 und 0,6 kultiviert. Die Kultur wurde 5 min bei 4°C und 3750 rpm zentrifugiert und das so entstandene Bakterienpellet in 100 mL kaltem TFB1-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde anschließend 5 min lang auf Eis inkubiert und danach 5 min lang bei 4°C und 3750 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde danach in 10 mL kaltem TFB2-Puffer resuspendiert, 30-60 min auf Eis inkubiert und aliquotiert. Die 100  $\mu$ L-Aliquote wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### 6.1.6 Transformation kompetenter Bakterien

Die Transformation dient der Aufnahme und Amplifikation von Plasmiden durch *E.coli* (Sambrook, 1989). 100  $\mu$ L kompetente Bakterien wurden vorsichtig auf Eis aufgetaut und mit 10  $\mu$ L Ligationsansatz beziehungsweise 1  $\mu$ g Plasmid-DNA vermischt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Suspension 90 Sekunden bei 42°C inkubiert (Hitzeschock) und anschließend 5 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 400  $\mu$ L LB-Medium ohne Zusatz von Antibiotika wurden die Kulturen 60-90 min 37°C geschüttelt und in unterschiedlichen

Konzentrationen auf Antibiotika-haltigen Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden 16-20 h lang bei 37°C inkubiert.

### **6.1.7 DNA-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien**

Zur Herstellung von Plasmid-DNA wurde der Qiagen-Mini/Maxi-Kit beziehungsweise der Macherey-Nagel Mini-Kit verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren.

### **6.1.8 DNA-Präparation aus Mäuseschwanzspitzen (zur Genotypisierung)**

Die Mäusschwanzspitzen wurden mit 500 µL Lysepuffer M versehen und 16 h bei 55°C geschüttelt. Die Lösung wurde mit 500 µL Phenol/Chloroform (1:1) versehen und mehrmals geschwenkt. Nach 5-minütigem Abzentrifugieren bei 15.000 g wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 500 µL Chloroform versehen, geschwenkt und erneut abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand wieder in ein neues Gefäß pipettiert und die DNA mit 500 µL Isopropanol gefällt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 10.000 g wurde der Überstand verworfen, die gefällte DNA getrocknet und in 100 µL H<sub>2</sub>O aufgenommen. Lösen der DNA erfolgte durch Resuspendieren und Schütteln bei 55°C für 60 min.

### **6.1.9 RNA-Präparation**

Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurde der Qiagen RNeasy Minikit verwendet. Dabei wurde nach Angaben des Herstellers verfahren.

### **6.1.10 Sequenzierungen**

Die DNA-Sequenzierungen wurden nach der Kettenabbruchmethode von Sanger (Sanger et al., 1977) von der Firma Medigenomix in Martinsried beziehungsweise GATC in Konstanz durchgeführt.

## **6.2 Zellbiologische Methoden**

### **6.2.1 Zellkultur**

#### **6.2.1.1 Kultivierung von Zellen**

Murine Neuroblastomzellen (N2a) wurden in MEM (*Minimal Essential Medium*) kultiviert. Dem Vollmedium wurde 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (engl. *fetal calf serum*, FCS), 1% Antibiotika-Lösung (Endkonzentration: 1 U/mL Penicillin G, 1 µg/mL Streptomycin)

und 2 mM Glutamin zugesetzt. Die Zelllinie wurden als adhärenter Einzelzellrasen in Zellkulturflaschen beziehungsweise -schalen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### **6.2.1.2 Passagierung**

Nach Absaugen des Kulturmediums wurden die Zellen mit PBS -/- (engl. *phosphate buffered saline*) gespült und anschließend mit Trypsin (0,5 g/L) einige Minuten lang inkubiert. Die Zellen wurden vorsichtig von ihrer Unterlage abgeklopft, in vorgewärmtem Vollmedium sorgfältig resuspendiert und im gewünschten Verhältnis auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Die Passagierung der Zelllinien erfolgte durchschnittlich alle 3 bis 4 Tage.

#### **6.2.1.3 Ausplattieren**

Zum Ausplattieren der Zellen wurde zunächst die vorhandene Zellmenge mit Hilfe einer Neubauer-Kammer bestimmt. N2a-Zellen wurden in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen auf 3,5 cm-Schalen ausplattiert. Für Immunfluoreszenz-Analysen wurden die Zellen dünner ausplattiert, um einzelne Zellen besser erkennen zu können. In diesem Fall wurden  $4 \times 10^5$  N2a Zellen auf 3,5 cm-Schalen, welche sterile Deckgläschen enthielten, ausplattiert.

#### **6.2.1.4 Transfektion**

24 h nach dem Ausplattieren der Zellen wurden diese mit Medium ohne FCS und Antibiotikum gewaschen und mit Plasmid-DNA mit dem Transfektions-Kit *Lipofectamine* nach Angaben des Herstellers Invitrogen in OPTIMEM transfiziert. Nach dreistündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde 1 mL Vollmedium zugesetzt beziehungsweise das Transfektionsmedium vollständig gewechselt.

#### **6.2.1.5 Zellernte**

24 bis 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet. Dazu wurden die Zellen zweimal mit PBS -/- gewaschen und anschließend in PBS -/- mit einem Zellschaber abgeschabt. Die Zellen wurden für 30 sek bei 1000 x g abzentrifugiert, das Zellpellet auf Eis gestellt und entsprechend weiterverarbeitet.

## **6.2.2 Protein- und Nukleinsäureanalytik**

### **6.2.2.1 Gesamtzelllysat**

Die Zellpellets (vgl. Abschnitt 6.2.1.5) wurden in kaltem, ionischem Lysepuffer, welchem Protease-Inhibitor frisch zugegeben wurde, resuspendiert, 10 bis 20 min lang auf Eis inkubiert und zwischendurch kräftig gevortext. Das so entstandene Zelllysat wurde in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und für 10 min bei 95°C inkubiert. Die genomische DNA wurde danach durch mehrmaliges Aufziehen der Probe in eine 1 ml-Einwegspritze mit einer 27G-Kanüle geschert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Proben auf einem SDS-Gel analysiert.

### **6.2.2.2 Nachweis der Löslichkeit (Trennung des Lysats)**

Die Zellpellets (vgl. Abschnitt 6.2.1.5) wurden in kaltem, ionischem Lysepuffer, welchem Protease-Inhibitor frisch zugegeben wurde, resuspendiert, 5 min lang auf Eis inkubiert und für 20 min bei 15.000 g und 4°C zentrifugiert, wodurch das Zelllysat in eine Detergens-lösliche (Überstand, S) und eine Detergens-unlösliche (Pellet, P) Fraktion aufgetrennt wurde. Beide Fraktionen wurden in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und für 10 min bei 95°C inkubiert. Die genomische DNA in der Detergens-unlöslichen Fraktion wurde danach durch mehrmaliges Aufziehen der Probe in eine 1 ml-Einwegspritze mit einer 27G-Kanüle geschert. Die Proben wurden auf einem SDS-Gel analysiert.

### **6.2.2.3 Lysat aus Mäusegehirnen**

Die Gehirne transgener Mäuse und Wildtyp FVB-Mäuse wurden direkt nach dem Tod entnommen und halbiert. Ein Teil wurde in 4% Formalinlösung für Hirnsektionen aufbewahrt. Der zweite Teil wurde in 0,5% T/DOC lysiert. Dafür wurde das 100fache Volumen an Detergens verwendet, sodass ein 10%iges Lysat gewonnen wurde. Die Suspension wurde mit immer dünner werdenden Nadeln lysiert (0,8mm - 21G - 23G - 27G Nadel) und anschließend für 20 min bei 15.000 g und 4°C zentrifugiert. Die Detergens-lösliche (S) und -unlösliche (P) Fraktion wurde mit Laemmli-Probenpuffer versehen, 10 min bei 95°C aufgeköcht und auf einem SDS-Gel analysiert.

### **6.2.2.4 Proteinkonzentration nach Bradford**

Gegebenenfalls wurde nach der Lyse die Gesamtproteinmenge des Zelllysats mit Hilfe des Protein Assay Kits nach der Methode von Bradford entsprechend den Angaben des Herstellers Bio-Rad bestimmt.

#### **6.2.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Durch eindimensionale, diskontinuierliche SDS-PAGE (Laemmli, 1970) erfolgte die Auftrennung der Proteine. Für das Sammelgel wurde eine 4%ige Polyacrylamid-Konzentration, für das Trenngel, je nach der Größe des zu untersuchenden Proteins, eine 8-14%ige Polyacrylamid-Konzentration verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 150-250 V in einer Hoefer-SE600-Kammer durchgeführt.

#### **6.2.2.6 Proteintransfer auf Nitrozellulose (Western Blot)**

Für die anschließende Immundetektion wurden die zuvor aufgetrennten Proteine (vgl. Abschnitt 6.2.2.5) auf eine Nitrozellulose-Membran der Porengröße 0,45 µm transferiert (Towbin et al., 1979). Der zweistündige Transfer erfolgte in Transferpuffer bei einer konstanten Stromstärke von 1000 mA und 4°C.

#### **6.2.2.7 Ponceau S – Färbung**

Nach dem Blotten wurde die Membran 5 min lang in Ponceau S-Lösung geschwenkt und in H<sub>2</sub>O entwickelt. Durch die unspezifische Anfärbung der Proteine kann die Effizienz des Proteintransfers kontrolliert werden. Vor der Immunreaktion wurde die Membran in PBST entfärbt.

#### **6.2.2.8 Immundetektion von Proteinen**

Die Immundetektion der Proteine erfolgte mit dem *Enhanced Chemiluminescence* (ECL)-System beziehungsweise dem Immobilon Western-Chemolumineszenz HRP-Substrat nach Angaben des Herstellers. Dazu wurde die Nitrozellulose-Membran zuerst für 1 h bei Raumtemperatur in PBST mit 5% Milchpulver geschwenkt und danach für 16 h bei 4°C mit dem primären Antikörper beziehungsweise Antiserum inkubiert. Die Membran wurde dreimal 10 min mit PBST gewaschen und für 45 bis 60 min mit dem sekundären Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelten Schaf-anti-Maus- beziehungsweise Esel-anti-Kaninchen-Antikörper in PBST inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut dreimal mit PBST gewaschen und mit HRP-Substrat inkubiert. Die Signale wurden durch Exposition eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

#### **6.2.2.9 Immunpräzipitation (IP)**

Das Zelllysate (vgl. Abschnitt 6.2.1.5) wurde zur Vorreinigung mit 30 µL gewaschenen Protein A-Trisacryl-Matrix beziehungsweise Protein G-Matrix (*beads*) für 1 h bei 4°C inkubiert. Dadurch konnte die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Interaktionen mit den *beads*

gesenkt werden. Der Überstand wurde anschließend mit 1 µL Antikörper beziehungsweise Antiserum über Nacht bei 4°C in einem Überkopf-Mischer inkubiert. Wurde der anti-PrP-Antikörper (3F4) verwendet, wurde zusätzlich noch Sarkosyl (0,5% Endkonzentration) zugegeben. Um die Protein-Antikörper-Komplexe zu isolieren, wurden 30 µL einer gewaschenen Protein A-Trisacryl-Matrix beziehungsweise Protein G-Matrix zupipettiert und die Suspension für weitere 90 min bei 4°C in einem Überkopf-Mischer inkubiert. Die Komplexe wurden kurz abzentrifugiert, zweimal mit IP-Lysepuffer und zuletzt mit PBS -/- gewaschen und in 60 µL Laemmli-Probenpuffer für 10 min bei 95°C inkubiert. Die Proben wurden auf einem SDS-Gel analysiert.

#### **6.2.2.10 Radioaktive Markierung von Proteinen mit [<sup>35</sup>S]-Methionin**

24 bis 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Medium ohne Zusätze gewaschen und 30 bis 45 min in MEM ohne Methionin inkubiert, um vorhandenes Methionin aufzubrechen (Hungern). Für die radioaktive Markierung wurde das Medium abgenommen und durch 500 µL MEM ohne Methionin mit [<sup>35</sup>S]-Methionin (ProMix, 150 µCi/mL) ersetzt. Nach 30 bis 60 min wurden die Schalen, die zur Untersuchung der während der *pulse*-Phase synthetisierten Proteine bestimmt waren, geerntet und die Zellen mit IP-Lysepuffer lysiert (*pulse*-Proben). Die restlichen Schalen wurden für die angegebene Zeit mit frischem, unmarkiertem Vollmedium bei 37°C inkubiert und anschließend wie oben beschrieben lysiert (*chase*-Proben). Die Detergens-lösliche Fraktion wurde auf eine Endkonzentration von 0,5 % Sarkosyl gebracht und mittels einer Immunpräzipitation mit dem mAb 3F4 analysiert. Die Pellet-Fraktion wurde verworfen.

#### **6.2.2.11 Autoradiodiagramme**

Gele mit radioaktiv markierten Proteinen wurden zunächst 30 min in Fixierlösung geschwenkt und danach weitere 30 min mit Amplify<sup>®</sup> inkubiert. Auf einem Whatman-Papier wurden sie dann in einem Geltdrockner für 80 min bei 72°C unter Vakuum getrocknet. Die radioaktiv markierten Proteine wurden durch Exposition eines Röntgenfilms visualisiert.

#### **6.2.2.12 Behandlung mit proteasomalem Inhibitor MG132**

MG132 dient der reversiblen Hemmung des Proteasoms (Tsubuki et al., 1993). Für diese Inhibierung wurden die Zellen vor der Zellernte 3 h mit MG132 (30 µM in DMSO) in Vollmedium inkubiert. Kontrollzellen wurden mit DMSO in Vollmedium inkubiert. Für die Analyse radioaktiv markierter Proteine wurde MG132 in einer Konzentration von 50 µM während des Hungerns, der *pulse*- und der *chase*-Phase zu den Zellen gegeben. Danach wurden die Zellen wie oben beschrieben geerntet.

### **6.2.2.13 Behandlung mit Thapsigargin**

Um die Zellen ER-Stress zu unterziehen wurden sie für die jeweils angegebene Dauer mit Thapsigargin (1  $\mu\text{M}$  in DMSO) bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert und das Zelllysate anschließend mittels Western Blot analysiert.

### **6.2.2.14 Nachweis der Sekretion**

Die Sekretion von Proteinen ins Zellkulturmedium wurde folgendermaßen analysiert. Am Tag der Zellernte wurden die Zellen 3 h in 1 mL Medium ohne FCS bei 37°C inkubiert. Dieses Medium wurde anschließend abgenommen und kurz abzentrifugiert. 900  $\mu\text{L}$  des Überstandes wurden mit 100  $\mu\text{L}$  einer 50%igen Trichloressigsäure (TCA)-Lösung versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde bei 13.000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde zweimal mit Aceton gewaschen, an der Luft getrocknet und in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen. Die sekretierten Proteine wurden anschließend mittels Western Blot analysiert.

### **6.2.2.15 Analyse der Glykosylierung**

Für den Nachweis des Glykosylierungsstatus der Proteine wurden verschiedene Methoden angewandt, die im Folgenden beschrieben werden.

#### **Behandlung mit Tunicamycin**

Um zu analysieren ob eine Kernglykosylierung stattgefunden hat, wurde der Inhibitor Tunicamycin eingesetzt. Dieser hemmt die GlcNAc-1-P-Transferase und somit die Übertragung des Zuckergrundgerüsts auf das Protein. Transfizierte Zellen wurden 16 h mit 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  Tunicamycin bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert und das Zelllysate anschließend mittels Western Blot analysiert.

#### **Behandlung mit Swainsonin**

Um die Umwandlung der Kernglykane in mannosereiche Glykane zu hemmen, wurde der Inhibitor Swainsonin eingesetzt. Dieser hemmt die Mannosidase und somit die Weiterprozessierung der mannosereichen Glykane in komplexe Strukturen (vgl. Abschnitt 1.5.2). Transfizierte Zellen wurden 16 h mit 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  Swainsonin bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert und das Zelllysate anschließend mittels Western Blot analysiert.

#### **Verdau mit Endoglykosidase H (Endo H)**

Um zu unterscheiden, ob eine N-gekoppelte Glykosylierung der Proteine in Form einer mannosereichen oder komplex glykosylierten Struktur vorliegt, wurde ein enzymatischer

Verdau der Zelllysate mit EndoglykosidaseH (EndoH) durchgeführt. Endo H spaltet mannosereiche Glykoformen, jedoch keine komplexen Glykane (Robbins et al., 1984; Maley et al., 1989). Das Zelllysate wurde mit Denaturierungspuffer versetzt, 10 min bei 95°C inkubiert und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von Reaktionspuffer und Enzym wurde die Probe 1 bis 2 h bei 37°C inkubiert, mit Laemmli-Probenpuffer versetzt, auf ein SDS-Gel geladen und mittels Western Blot analysiert.

#### **6.2.2.16 Nachweis von Oberflächenproteinen**

Für Analyse der Lokalisation von Proteinen an der Plasmamembran wurden verschiedene Methoden angewandt.

#### **Verdau mit Trypsin**

Ein extrazellulärer Trypsin-Verdau wurde durchgeführt um alle Proteine, die sich an der Zelloberfläche befinden, abzuspalten. Hierfür wurden die Zellen kurz mit eiskaltem PBS-/- gewaschen und danach mit 0,5 mL Trypsin versetzt. Nachdem die abgelösten Zellen abgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt wurden, wurde die Schale mit 0,5 µL Trypsin-Inhibitor nachgespült. Die Zellen wurden kurz bei 13.000 rpm und 4°C abzentrifugiert und das Zellpellet noch einmal mit Trypsin-Inhibitor gewaschen. Abschließend wurde das Zellpellet in Lysepuffer resuspendiert und wie unter Abschnitt 6.2.2.2 beschrieben weiterverarbeitet.

#### **Untersuchung der Membranverankerung**

Um zu testen ob eine GPI-Verankerung stattgefunden hat, wurde ein Phosphatidylinositol-Phospholipase C (PIPLC)-Verdau durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit eiskaltem PBS-/- gewaschen und mit 0,5 U/ml PIPLC in PBS-/- versetzt. Die Zellkulturschalen wurden 2 h bei 4°C geschwenkt. Der Überstand wurde abgenommen und die mit PIPLC geschnittenen und somit freigesetzten Proteine mit TCA gefällt (siehe 6.2.2.14). Die Zellen wurden zweimal mit PBS-/- gewaschen, geerntet und wie unter 6.2.2.2 beschrieben weiterverarbeitet und mittels Western Blot analysiert.

#### **6.2.2.17 Northern Blotting**

Die für die Northern Blot Analyse benötigte RNA wurde aus Maus-Hirngewebe mittels RNAeasy Kit isoliert. Die so gewonnene RNA wurde zuerst am Agarosegel auf mögliche Degradierung kontrolliert und anschließend für die Analyse gefällt. Dazu wurden 5-30 µg RNA mit 1/10 des Volumens LiCl (4M) und dem 2,5fachen Volumen an Ethanol versehen



und 1 h bei -20°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben 20 min bei 15.000 g und 4°C zentrifugiert und das entstandene RNA-Pellet 2 min getrocknet bevor es wieder in 20,5 µL RNA-Resuspensionspuffer aufgenommen wurde. Nach 10-minütiger Inkubation bei 70°C wurde die RNA mit 2,5 µL Ethidiumbromid (1:5 verdünnt mit Ladepuffer) versehen und auf ein RNA-Gel geladen. Das Gel wurde bei Raumtemperatur 16 h lang in 10x SSC Puffer auf eine Membran geblottet, welche anschließend mit UV quervernetzt und mit einer radioaktivmarkierten (<sup>32</sup>P)-Sonde, die über ProbeQuant G-50 Säulchen aufgereinigt wurde, für 1 h bei 65°C in Churchpuffer hybridisiert. Als Sonde wurde das denaturierte PCR-Produkt von murinem Q159X verwendet. Die Membran wurde schließlich zweimal 20 min in Church-Waschpuffer gewaschen und die Signale durch Exposition eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

#### **6.2.2.18 *In vitro* Transkription/Translation und *in vitro* Import in ER-Mikrosomen**

Die *in vitro* Transkription/Translation wurde mit dem TNT T7 *Quick Coupled Transcription/Translation System* gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach 60-minütiger Transkription/Translation in An- oder Abwesenheit von Mikrosomen wurde die Reaktion gestoppt, die Mikrosomen abzentrifugiert und mit Laemmli-Probenpuffer versehen. Die Proben wurden, sofern angegeben, mit EndoH für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend auf einem SDS-Gel analysiert.

#### **6.2.3 Indirekte Immunfluoreszenz**

Um die zelluläre Lokalisierung von Proteinen in lebenden Zellen zu bestimmen, wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit permeabilisierten Zellen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen auf Glasdeckgläschen ausplattiert (siehe 6.2.1.3) und transfiziert (siehe 6.2.1.4). 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 20 min in 3% Paraformaldehyd fixiert, die Zellmembran gegebenenfalls mit 0,2% Triton-X 100 für 10 min permeabilisiert und anschließend mit dem Erstantikörper (1:200 in PBS -/-, 1% BSA) 45 bis 60 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS -/- gewaschen und mit dem fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper Cy3 oder FITC (1:200 in PBS -/-, 1% BSA) versehen. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Präparate in Mowiol (+ DAPI, 1µg/mL, Kernfärbung) eingebettet und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

## 7 Bibliographie

- Agashe VR, Hartl FU (2000) Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **11**: 15-25
- Aguzzi A, Baumann F, Bremer J (2008) The prion's elusive reason for being. *Annu Rev Neurosci* **31**: 439-477
- Aguzzi A, Glatzel M (2004) vCJD tissue distribution and transmission by transfusion--a worst-case scenario coming true? *Lancet* **363**: 411-412
- Aguzzi A, Weissmann C (1996) A suspicious signature. *Nature* **383**: 666-667
- Alper T, Cramp WA, Haig DA, Clarke MC (1967) Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* **214**: 764-766
- Alpers M, Gajdusek DC (1965) Changing patterns of kuru: epidemiological changes in the period of increasing contact of the Fore people with western civilization. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **14**: 852-879
- Anandatheerthavarada HK, Biswas G, Robin MA, Avadhani NG (2003) Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells. *J Cell Biol* **161**: 41-54
- Anelli T, Sitia R (2008) Protein quality control in the early secretory pathway. *Embo J* **27**: 315-327
- Appel TR, Dumpitak C, Matthiesen U, Riesner D (1999) Prion rods contain an inert polysaccharide scaffold. *Biol Chem* **380**: 1295-1306
- Ban N, Nissen P, Hansen J, Moore PB, Steitz TA (2000) The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**: 905-920
- Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Walchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB, Weissmann C (1986) Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* **46**: 417-428
- Baumann F, Tolnay M, Brabeck C, Pahnke J, Kloz U, Niemann HH, Heikenwalder M, Rulicke T, Burkle A, Aguzzi A (2007) Lethal recessive myelin toxicity of prion protein lacking its central domain. *Embo J* **26**: 538-547
- Bause E (1983) Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. *Biochem J* **209**: 331-336
- Beck E, Daniel P (1976) Kuru. *Psychological medicine* **6**: 343-345
- Beck JA, Campbell TA, Adamson G, Poulter M, Uphill JB, Molou E, Collinge J, Mead S (2008) Association of a null allele of SPRN with variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Journal of medical genetics* **45**: 813-817
- Beckmann R, Spahn CM, Eswar N, Helmers J, Penczek PA, Sali A, Frank J, Blobel G (2001) Architecture of the protein-conducting channel associated with the translating 80S ribosome. *Cell* **107**: 361-372
- Behrens A, Aguzzi A (2002) Small is not beautiful: antagonizing functions for the prion protein PrP(C) and its homologue Dpl. *Trends Neurosci* **25**: 150-154
- Belay ED (1999) Transmissible spongiform encephalopathies in humans. *Annual review of microbiology* **53**: 283-314
- Belay ED, Maddox RA, Williams ES, Miller MW, Gambetti P, Schonberger LB (2004) Chronic wasting disease and potential transmission to humans. *Emerg Infect Dis* **10**: 977-984
- Bendheim PE, Brown HR, Rudelli RD, Scala LJ, Goller NL, Wen GY, Kascsak RJ, Cashman NR, Bolton DC (1992) Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology* **42**: 149-156
- Bernoulli C, Siegfried J, Baumgartner G, Regli F, Rabinowicz T, Gajdusek DC, Gibbs CJ, Jr. (1977) Danger of accidental person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by surgery. *Lancet* **1**: 478-479
- Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D (2000) Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* **2**: 326-332
- Besnoit MM, C. (1898) Note sur les lésions nerveuses de la tremblante du mouton. *Revue Vétérinaire* **23**: 397-400

- Blobel G, Dobberstein B (1975a) Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol* **67**: 835-851
- Blobel G, Dobberstein B (1975b) Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J Cell Biol* **67**: 852-862
- Blochberger TC, Cooper C, Peretz D, Tatzelt J, Griffith OH, Baldwin MA, Prusiner SB (1997) Prion protein expression in Chinese hamster ovary cells using a glutamine synthetase selection and amplification system. *Protein Eng* **10**: 1465-1473
- Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB (1982) Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* **218**: 1309-1311
- Borchelt DR, Taraboulos A, Prusiner SB (1992) Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J Biol Chem* **267**: 16188-16199
- Brandner S, Isenmann S, Raeber A, Fischer M, Sailer A, Kobayashi Y, Marino S, Weissmann C, Aguzzi A (1996) Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* **379**: 339-343
- Breckenridge DG, Germain M, Mathai JP, Nguyen M, Shore GC (2003) Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* **22**: 8608-8618
- Bresjanac M, Smid LM, Vovko TD, Petric A, Barrio JR, Popovic M (2003) Molecular-imaging probe 2-(1-[6-[(2-fluoroethyl)(methyl) amino]-2-naphthyl]ethylidene) malononitrile labels prion plaques in vitro. *J Neurosci* **23**: 8029-8033
- 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, 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**: 1-5
- Brown P (1992) The phenotypic expression of different mutations in transmissible human spongiform encephalopathy. *Revue neurologique* **148**: 317-327
- Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttie A, McCardle L, Chree A, Hope J, Birkett C, Cousens S, Fraser H, Bostock CJ (1997) Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* **389**: 498-501
- Budka H (1997) The human prion diseases: from neuropathology to pathobiology and molecular genetics. Final report of an EU concerted action. *Neuropathology and applied neurobiology* **23**: 416-422
- Büeler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner R-A, Autenried P, Aguet M, Weissmann C (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* **73**: 1339-1347
- Büeler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp H-P, 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
- Burda P, Aepli M (1999) The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochim Biophys Acta* **1426**: 239-257
- Cabral CM, Liu Y, Sifers RN (2001) Dissecting glycoprotein quality control in the secretory pathway. *Trends Biochem Sci* **26**: 619-624
- Calzolari L, Lysek DA, Perez DR, Guntert P, Wuthrich K (2005) Prion protein NMR structures of chickens, turtles, and frogs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 651-655
- Cannon KS, Or E, Clemons WM, Jr., Shibata Y, Rapoport TA (2005) Disulfide bridge formation between SecY and a translocating polypeptide localizes the translocation pore to the center of SecY. *J Cell Biol* **169**: 219-225
- 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

- Chau V, Tobias JW, Bachmair A, Marriott D, Ecker DJ, Gonda DK, Varshavsky A (1989) A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* **243**: 1576-1583
- Chesebro B, Race R, Wehrly K, Nishio J, Bloom M, Lechner D, Bergstrom S, Robbins K, Mayer L, Keith JM (1985) Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* **315**: 331-333
- Chesebro B, Trifilo M, Race R, Meade-White K, Teng C, LaCasse R, Raymond L, Favara C, Baron G, Priola S, Caughey B, Masliah E, Oldstone M (2005) Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science* **308**: 1435-1439
- Chiesa R, Piccardo P, Ghetti B, Harris DA (1998) Neurological illness in transgenic mice expressing a prion protein with an insertional mutation. *Neuron* **21**: 1339-1351
- Chiesa R, Piccardo P, Quaglio E, Drisaldi B, Si-Hoe SL, Takao M, Ghetti B, Harris DA (2003) Molecular distinction between pathogenic and infectious properties of the prion protein. *J Virol* **77**: 7611-7622
- Christen B, Wuthrich K, Hornemann S (2008) Putative prion protein from Fugu (*Takifugu rubripes*). *FEBS J* **275**: 263-270
- Ciechanover A, Brundin P (2003) The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron* **40**: 427-446
- Colacino S, Tiana G, Colombo G (2006) Similar folds with different stabilization mechanisms: the cases of Prion and Doppel proteins. *BMC structural biology* **6**: 17
- Collinge J (2001) Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci* **24**: 519-550
- Collinge J, Sidle KC, Meads J, Ironside J, Hill AF (1996) Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD [see comments]. *Nature* **383**: 685-690
- Collinge J, Whittington MA, Sidle KC, Smith CJ, Palmer MS, Clarke AR, Jefferys JGR (1994) Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* **370**: 295-297
- Collins S, McLean CA, Masters CL (2001) Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia, and kuru: a review of these less common human transmissible spongiform encephalopathies. *J Clin Neurosci* **8**: 387-397
- Conner MM, Ebinger MR, Blanchong JA, Cross PC (2008) Infectious disease in cervids of North America: data, models, and management challenges. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1134**: 146-172
- Connolly T, Gilmore R (1989) The signal recognition particle receptor mediates the GTP-dependent displacement of SRP from the signal sequence of the nascent polypeptide. *Cell* **57**: 599-610
- Cotto E, Andre M, Forgue J, Fleury HJ, Babin PJ (2005) Molecular characterization, phylogenetic relationships, and developmental expression patterns of prion genes in zebrafish (*Danio rerio*). *FEBS J* **2**: 500-513
- Credle JJ, Finer-Moore JS, Papa FR, Stroud RM, Walter P (2005) On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 18773-18784
- Creutzfeldt HG (1920) Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z Gesamte Neurol Psychiatrie* **57**: 1-18
- Crowley KS, Liao S, Worrell VE, Reinhart GD, Johnson AE (1994) Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore. *Cell* **78**: 461-471
- Cuillé J, Chelle PL (1939) Experimental transmission of trembling to the goat. *CR Seances Acad Sci* **208**: 1058-1060
- Daniel CJ, Conti B, Johnson AE, Skach WR (2008) Control of translocation through the Sec61 translocon by nascent polypeptide structure within the ribosome. *J Biol Chem* **283**: 20864-20873
- Davanipour Z, Goodman L, Alter M, Sobel E, Asher D, Gajdusek DC (1984) Possible modes of transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *The New England journal of medicine* **311**: 1582-1583

- Ding Q, Dimayuga E, Keller JN (2006) Proteasome regulation of oxidative stress in aging and age-related diseases of the CNS. *Antioxidants & redox signaling* **8**: 163-172
- Dlouhy SR, Hsiao K, Farlow MR, Foroud T, Conneally PM, Johnson P, Prusiner SB, Hodes ME, Ghetti B (1992) Linkage of the Indiana kindred of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease to the prion protein gene. *Nature genetics* **1**: 64-67
- Dorner AJ, Wasley LC, Raney P, Haugejorden S, Green M, Kaufman RJ (1990) The stress response in Chinese hamster ovary cells. Regulation of ERp72 and protein disulfide isomerase expression and secretion. *J Biol Chem* **265**: 22029-22034
- Drisaldi B, Stewart RS, Adles C, Stewart LR, Quaglio E, Biasini E, Fioriti L, Chiesa R, Harris DA (2003) Mutant PrP Is Delayed in Its Exit from the Neither Wild-type nor Mutant PrP Undergoes Proteasomal Degradation. *J Biol Chem* **278**: 21732-21743
- Duffy P, Wolf J, Collins G, DeVoe AG, Streeten B, Cowen D (1974) Letter: Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *The New England journal of medicine* **290**: 692-693
- Dumpitak C, Beekes M, Weinmann N, Metzger S, Winklhofer KF, Tatzelt J, Riesner D (2005) The polysaccharide scaffold of PrP 27-30 is a common compound of natural prions and consists of alpha-linked polyglucose. *Biol Chem* **386**: 1149-1155
- Eberl H, Glockshuber R (2002) Folding and intrinsic stability of deletion variants of PrP(121-231), the folded C-terminal domain of the prion protein. *Biophys Chem* **96**: 293-303
- Ellis RJ, Hartl FU (1999) Principles of protein folding in the cellular environment. *Current opinion in structural biology* **9**: 102-110
- Endo T, Groth D, Prusiner SB, Kobata A (1989) Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. *Biochemistry* **28**: 8380-8388
- Englund PT (1993) The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Annu Rev Biochem* **62**: 121-138
- Favre-Krey L, Theodoridou M, Boukouvala E, Panagiotidis CH, Papadopoulos AI, Sklaviadis T, Krey G (2007) Molecular characterization of a cDNA from the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) encoding a fish prion protein. *Comparative biochemistry and physiology* **147**: 566-573
- Ferguson MAJ, Williams AF (1988) Cell-surface anchoring of protein via glycosyl-phosphatidylinositol structures. *Annu Rev Biochem* **57**: 285-320
- Finckh U, Muller-Thomsen T, Mann U, Eggers C, Marksteiner J, Meins W, Binetti G, Alberici A, Hock C, Nitsch RM, Gal A (2000) High prevalence of pathogenic mutations in patients with early-onset dementia detected by sequence analyses of four different genes. *American journal of human genetics* **66**: 110-117
- Finley D, Ciechanover A, Varshavsky A (1984) Thermolability of ubiquitin-activating enzyme from the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell* **37**: 43-55
- Fioriti L, Dossena S, Stewart LR, Stewart RS, Harris DA, Forloni G, Chiesa R (2005) Cytosolic prion protein (PrP) is not toxic in N2a cells and primary neurons expressing pathogenic PrP mutations. *J Biol Chem* **280**: 11320-11328
- Fischer M, Rulicke T, Raeber A, Sailer A, Moser M, Oesch B, Brandner S, Aguzzi A, Weissmann C (1996) Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J* **15**: 1255-1264
- Flechsigg E, Hegyi I, Leimeroth R, Zuniga A, Rossi D, Cozzio A, Schwarz P, Rulicke T, Gotz J, Aguzzi A, Weissmann C (2003) Expression of truncated PrP targeted to Purkinje cells of PrP knockout mice causes Purkinje cell death and ataxia. *Embo J* **22**: 3095-3101
- Fons RD, Bogert BA, Hegde RS (2003) Substrate-specific function of the translocon-associated protein complex during translocation across the ER membrane. *J Cell Biol* **160**: 529-539
- Fournier JG, Escaig-Haye F, Billette de Villemeur T, Robain O (1995) Ultrastructural localization of cellular prion protein (PrP<sub>C</sub>) in synaptic boutons of normal hamster hippocampus. *C R Acad Sci III* **318**
- Frenkel Z, Gregory W, Kornfeld S, Lederkremer GZ (2003) Endoplasmic reticulum-associated degradation of mammalian glycoproteins involves sugar chain trimming to Man6-5GlcNAc2. *J Biol Chem* **278**: 34119-34124

- Gabizon R, Rosenmann H, Meiner Z, Kahana I, Kahana E, Shugart Y, Ott J, Prusiner SB (1993) Mutation and polymorphism of the prion protein gene in Libyan Jews with Creutzfeldt-Jakob disease (CJD). *American journal of human genetics* **53**: 828-835
- Gabriel JM, Oesch B, Kretzschmar H, Scott M, Prusiner SB (1992) Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 9097-9101
- Gahmberg CG, Tolvanen M (1996) Why mammalian cell surface proteins are glycoproteins. *Trends Biochem Sci* **21**: 308-311
- Gajdusek DC, Gibbs CJ (1964) Attempts to Demonstrate a Transmissible Agent in Kuru, Amyotrophic Lateral Sclerosis, and Other Sub-Acute and Chronic Nervous System Degenerations of Man. *Nature* **204**: 257-259
- Gajdusek DC, Gibbs CJJ, Alpers M (1966) Experimental transmission of a kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* **209**: 794-796
- Gajdusek DC, Zigas V (1957) Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. *The New England journal of medicine* **257**: 974-978
- Gallo M, Paludi D, Cicero DO, Chiovitti K, Millo E, Salis A, Damonte G, Corsaro A, Thellung S, Schettini G, Melino S, Florio T, Paci M, Aceto A (2005) Identification of a conserved N-capping box important for the structural autonomy of the prion alpha 3-helix: the disease associated D202N mutation destabilizes the helical conformation. *Int J Immunopathol Pharmacol* **18**: 95-112
- Garnett AP, Viles JH (2003) Copper binding to the octarepeats of the prion protein. Affinity, specificity, folding, and cooperativity: insights from circular dichroism. *J Biol Chem* **278**: 6795-6802
- Gasset M, Baldwin MA, Fletterick RJ, Prusiner SB (1993) Perturbation of the secondary structure of the scrapie prion protein under conditions that alter infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 1-5
- Gauczynski S, Peyrin JM, Haik S, Leucht C, Hundt C, Rieger R, Krasemann S, Deslys JP, Dormont D, Lasmezas CI, Weiss S (2001) The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *Embo J* **20**: 5863-5875
- Gething MJ, Sambrook J (1992) Protein folding in the cell. *Nature* **355**: 33-45
- Gibbs CJ, Jr., Bolis CL (1997) Normal isoform of amyloid protein (PrP) in brains of spawning salmon. *Mol Psychiatry* **2**: 146-147
- Gilch S, Nunziante M, Ertmer A, Wopfner F, Laszlo L, Schatzl HM (2004) Recognition of luminal prion protein aggregates by post-ER quality control mechanisms is mediated by the preoctarepeat region of PrP. *Traffic* **5**: 300-313
- Gilmore R, Blobel G, Walter P (1982a) Protein translocation across the endoplasmic reticulum. I. Detection in the microsomal membrane of a receptor for the signal recognition particle. *J Cell Biol* **95**: 463-469
- Gilmore R, Walter P, Blobel G (1982b) Protein translocation across the endoplasmic reticulum. II. Isolation and characterization of the signal recognition particle receptor. *J Cell Biol* **95**: 470-477
- Glatzel M, Aguzzi A (2001) The shifting biology of prions. *Brain Res Brain Res Rev* **36**: 241-248
- Görlich D, Hartmann E, Prehn S, Rapoport TA (1992) A protein of the endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation. *Nature* **357**: 47-52
- Görlich D, Prehn S, Hartmann E, Kalies KU, Rapoport TA (1992) A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. *Cell* **71**: 489-503
- Görlich D, Rapoport TA (1993) Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* **75**: 615-630
- Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Forlenza OV, Cabral AL, Veiga SS, Juliano MA, Roesler R, Walz R, Minetti A, Izquierdo I, Martins VR, Brentani RR (2000) Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Brain Res Mol Brain Res* **76**: 85-92
- Griffith JS (1967) Self-replication and scrapie. *Nature* **215**: 1043-1044

- Gu Y, Singh A, Bose S, Singh N (2008) Pathogenic mutations in the glycosylphosphatidylinositol signal peptide of PrP modulate its topology in neuroblastoma cells. *Mol Cell Neurosci* **37**: 647-656
- Gumbart J, Schulten K (2006) Molecular dynamics studies of the archaeal translocon. *Biophys J* **90**: 2356-2367
- Hadlow WJ (1959) Scrapie and kuru. *Lancet* **2**: 289-290
- Haider S, Hall BA, Sansom MS (2006) Simulations of a protein translocation pore: SecY. *Biochemistry* **45**: 13018-13024
- Haigh CL, Brown DR (2006) Prion protein reduces both oxidative and non-oxidative copper toxicity. *J Neurochem* **98**: 677-689
- Hainfellner JA, Liberski PP, Guiroy DC, Cervenakova L, Brown P, Gajdusek DC, Budka H (1997) Pathology and immunocytochemistry of a kuru brain. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* **7**: 547-553
- Hamir AN, Kunkle RA, Cutlip RC, Miller JM, O'Rourke KI, Williams ES, Miller MW, Stack MJ, Chaplin MJ, Richt JA (2005) Experimental transmission of chronic wasting disease agent from mule deer to cattle by the intracerebral route. *J Vet Diagn Invest* **17**: 276-281
- Hamir AN, Kunkle RA, Miller JM, Greenlee JJ, Richt JA (2006) Experimental second passage of chronic wasting disease (CWD(mule deer)) agent to cattle. *Journal of comparative pathology* **134**: 63-69
- Hamir AN, Miller JM, Kunkle RA, Hall SM, Richt JA (2007) Susceptibility of cattle to first-passage intracerebral inoculation with chronic wasting disease agent from white-tailed deer. *Veterinary pathology* **44**: 487-493
- Hamman BD, Chen JC, Johnson EE, Johnson AE (1997) The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane. *Cell* **89**: 535-544
- Hamman BD, Hendershot LM, Johnson AE (1998) BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell* **92**: 747-758
- Hammond C, Helenius A (1994) Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus. *J Cell Biol* **126**: 41-52
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *Journal of molecular biology* **166**: 557-580
- Hanein D, Matlack KE, Jungnickel B, Plath K, Kalies KU, Miller KR, Rapoport TA, Akey CW (1996) Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation. *Cell* **87**: 721-732
- Haraguchi T, Fisher S, Olofsson S, Endo T, Groth D, Tarentino A, Borchelt DR, Teplow D, Hood L, Burlingame A, Lycke E, Kobata A, Prusiner SB (1989) Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Arch Biochem Biophys* **274**: 1-13
- Hardesty B, Kramer G (2001) Folding of a nascent peptide on the ribosome. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **66**: 41-66
- Harding HP, Zhang Y, Ron D (1999) Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* **397**: 271-274
- Harmey JH, Doyle D, Brown V, Rogers MS (1995) The cellular isoform of the prion protein, PrP<sup>c</sup>, is associated with caveolae in mouse neuroblastoma (N2a) cells. *Biochem Biophys Res Commun* **210**: 753-759
- Harris DA, Falls DL, Johnson FA, Fischbach GD (1991) A prion-like protein from chicken brain copurifies with an acetylcholine receptor-inducing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 7664-7668
- Hartl FU (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**: 571-579
- Hartl FU, Hayer-Hartl M (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* **295**: 1852-1858
- Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K (1999) Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* **10**: 3787-3799

- Hebert DN, Foellmer B, Helenius A (1996) Calnexin and calreticulin promote folding, delay oligomerization and suppress degradation of influenza hemagglutinin in microsomes. *Embo J* **15**: 2961-2968
- Hegde RS, Bernstein HD (2006) The surprising complexity of signal sequences. *Trends Biochem Sci* **31**: 563-571
- Hegde RS, Kang SW (2008) The concept of translocational regulation. *J Cell Biol* **182**: 225-232
- Hegde RS, Mastrianni JA, Scott MR, DeFea KA, Tremblay P, Torchia M, DeArmond SJ, Prusiner SB, Lingappa VR (1998a) A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science* **279**: 827-834
- Hegde RS, Tremblay P, Groth D, DeArmond SJ, Prusiner SB, Lingappa VR (1999) Transmissible and genetic prion diseases share a common pathway of neurodegeneration [see comments]. *Nature* **402**: 822-826
- Hegde RS, Voigt S, Lingappa VR (1998b) Regulation of protein topology by trans-acting factors at the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* **2**: 85-91
- Helenius A (1994) How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* **5**: 253-265
- Heller U, Winklhofer KF, Heske J, Reintjes A, Tatzelt J (2003) Post-translational import of the prion protein into the endoplasmic reticulum interferes with cell viability: a critical role for the putative transmembrane domain. *J Biol Chem* **278**: 36139-36147
- 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
- Heske J, Heller U, Winklhofer KF, Tatzelt J (2004) The C-terminal domain of the prion protein is necessary and sufficient for import into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **279**: 5435-5443
- Higuchi R (1990) Recombinant PCR. *PCR Protocols A Guide to Methods and Applications* (MA Innis, DH Gelfand, JJ Sninsky, TJ White, eds) Academic Press, San Diego, CA: 177-183
- Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, Sidle KC, Gowland I, Collinge J, Doey LJ, Lantos P (1997) The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* **389**: 448-450, 526
- Hipkiss AR (2006) Accumulation of altered proteins and ageing: causes and effects. *Experimental gerontology* **41**: 464-473
- Holscher C, Bach UC, Dobberstein B (2001) Prion protein contains a second endoplasmic reticulum targeting signal sequence located at its C terminus. *J Biol Chem* **276**: 13388-13394
- Hosokawa N, Wada I, Hasegawa K, Yorihuzi T, Tremblay LO, Herscovics A, Nagata K (2001) A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation. *EMBO Rep* **2**: 415-422
- Hourrigan J, Kingspan, A., Clark, W. and de Camp, M. (1979) Epidemiology of Scrapie in the United States. *Slow Transmissible Diseases of the Nervous System*, New York, Academy Press **1**: 339-343
- Houston F, Foster JD, Chong A, Hunter N, Bostock CJ (2000) Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. *Lancet* **356**: 999-1000
- Hsiao K, Baker HF, Crow TJ, Poulter M, Owen F, Terwilliger JD, Westaway D, Ott J, Prusiner SB (1989) Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Sträussler syndrome. *Nature* **338**: 342-345
- Hsiao K, Prusiner SB (1990) Inherited human prion diseases. *Neurology* **40**: 1820-1827
- Hsiao KK, Scott M, Foster D, Groth DF, DeArmond SJ, Prusiner SB (1990) Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein. *Science* **250**: 1587-1590
- Hunter N, Houston F (2002) Can prion diseases be transmitted between individuals via blood transfusion: evidence from sheep experiments. *Developments in biologicals* **108**: 93-98
- Hurtley SM, Helenius A (1989) Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Biol* **5**: 277-307



- Hutter G, Heppner FL, Aguzzi A (2003) No superoxide dismutase activity of cellular prion protein in vivo. *Biol Chem* **384**: 1279-1285
- Jakob A (1921) Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen Befunde (spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Z Gesamte Neurol Psychiatrie* **64**: 147-228
- Jakob CA, Burda P, Roth J, Aebi M (1998) Degradation of misfolded endoplasmic reticulum glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by a specific oligosaccharide structure. *J Cell Biol* **142**: 1223-1233
- Jarrett JT, Lansbury PT, Jr. (1993) Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* **73**: 1055-1058
- Jensen TJ, Loo MA, Pind S, Williams DB, Goldberg AL, Riordan JR (1995) Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell* **83**: 129-135
- Jentsch S, McGrath JP, Varshavsky A (1987) The yeast DNA repair gene RAD6 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Nature* **329**: 131-134
- Johnson AE, van Waes MA (1999) The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annual review of cell and developmental biology* **15**: 799-842
- Johnson RT (2005) Prion diseases. *Lancet neurology* **4**: 635-642
- Johnson RT, Gibbs CJ, Jr. (1998) Creutzfeldt-Jakob disease and related transmissible spongiform encephalopathies. *The New England journal of medicine* **339**: 1994-2004
- Kang SW, Rane NS, Kim SJ, Garrison JL, Taunton J, Hegde RS (2006) Substrate-specific translocational attenuation during ER stress defines a pre-emptive quality control pathway. *Cell* **127**: 999-1013
- Kascsak RJ, Rubenstein R, Merz PA, Tonna-DeMasi M, Fersko R, Carp RI, Wisniewski HM, Dinger H (1987) Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins. *J Virol* **61**: 3688-3693
- Khosravani H, Zhang Y, Tsutsui S, Hameed S, Altier C, Hamid J, Chen L, Villemare M, Ali Z, Jirik FR, Zamponi GW (2008) Prion protein attenuates excitotoxicity by inhibiting NMDA receptors. *J Cell Biol* **181**: 551-565
- Kim SJ, Hegde RS (2002) Cotranslational partitioning of nascent prion protein into multiple populations at the translocation channel. *Mol Biol Cell* **13**: 3775-3786
- Kim SJ, Rahbar R, Hegde RS (2001) Combinatorial control of prion protein biogenesis by the signal sequence and transmembrane domain. *J Biol Chem* **276**: 26132-26140
- Kitamoto T, Iizuka R, Tateishi J (1993) An amber mutation of prion protein in Gerstmann-Sträussler syndrome with mutant PrP plaques. *Biochem Biophys Res Commun* **192**: 525-531
- Klatzo I, Gajdusek DC, Zigas V (1959) Pathology of Kuru. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **8**: 799-847
- Klausner RD, Sitia R (1990) Protein degradation in the endoplasmic reticulum. *Cell* **62**: 611-614
- Klein TR, Kirsch D, Kaufmann R, Riesner D (1998) Prion rods contain small amounts of the two host sphingolipids as revealed by thin-layer chromatography and mass spectrometry. *Biol Chem* **379**: 655-666
- Klitzman R, Alpers, M. P., Gajdusek, D. C. (1984) The natural incubation period of kuru and the episodes of transmission in three clusters of patients. *Neuroepidemiology* **3**: 3-20
- Kocisko DA, Come JH, Priola SA, Chesebro B, Raymond GJ, Lansbury PT, Jr., Caughey B (1994) Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* **370**: 471-474
- Kodukula K, Gerber LD, Amthauer R, Brink L, Udenfriend S (1993) Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane proteins in intact cells: specific amino acid requirements adjacent to the site of cleavage and GPI attachment. *J Cell Biol* **120**: 657-664
- Kondo K, Kuroiwa Y (1982) A case control study of Creutzfeldt-Jakob disease: association with physical injuries. *Ann Neurol* **11**: 377-381

- Kornfeld R, Kornfeld S (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* **54**: 631-664
- Kosolapov A, Tu L, Wang J, Deutsch C (2004) Structure acquisition of the T1 domain of Kv1.3 during biogenesis. *Neuron* **44**: 295-307
- Kowarik M, Kung S, Martoglio B, Helenius A (2002) Protein folding during cotranslational translocation in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* **10**: 769-778
- Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, Gething MJ, Sambrook J (1988) The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* **332**: 462-464
- Kretzschmar HA, Stowring LE, Westaway D, Stubblebine WH, Prusiner SB, Dearmond SJ (1986) Molecular cloning of a human prion protein cDNA. *DNA (Mary Ann Liebert, Inc)* **5**: 315-324
- Kyte J, Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of molecular biology* **157**: 105-132
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. *Nature* **227**: 680-685
- Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH (2003) XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* **23**: 7448-7459
- Legname G, Baskakov IV, Nguyen HO, Riesner D, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB (2004) Synthetic mammalian prions. *Science* **305**: 673-676
- Leopoldt JG (1759) Von denen mancherley Krankheiten des Schaafviehes, und was vor Euren damit vorgenommen werden. In *Nützliche und auf die Erfahrung gegründete Einleitung zu der Landwirthschaft. Fünf Theile*, pp 344-360. Berlin und Glogau: Christian Friedrich Günthern
- Leppanen VM, Bernalov MM, Runeberg-Roos P, Puurand U, Merits A, Saarma M, Goldman A (2004) The structure of GFRalpha1 domain 3 reveals new insights into GDNF binding and RET activation. *EMBO J* **23**: 1452-1462
- Levine CG, Mitra D, Sharma A, Smith CL, Hegde RS (2005) The efficiency of protein compartmentalization into the secretory pathway. *Mol Biol Cell* **16**: 279-291
- Li A, Christensen HM, Stewart LR, Roth KA, Chiesa R, Harris DA (2007) Neonatal lethality in transgenic mice expressing prion protein with a deletion of residues 105-125. *Embo J* **26**: 548-558
- Liao S, Lin J, Do H, Johnson AE (1997) Both luminal and cytosolic gating of the aqueous ER translocon pore are regulated from inside the ribosome during membrane protein integration. *Cell* **90**: 31-41
- Liao YC, Lebo RV, Clawson GA, Smuckler EA (1986) Human prion protein cDNA: molecular cloning, chromosomal mapping, and biological implications. *Science* **233**: 364-367
- Lilley BN, Ploegh HL (2004) A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* **429**: 834-840
- Little E, Lee AS (1995) Generation of a mammalian cell line deficient in glucose-regulated protein stress induction through targeted ribozyme driven by a stress-inducible promoter. *J Biol Chem* **270**: 9526-9534
- Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS, Amar K, Cousens S, Mackenzie J, Will RG (2004) Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* **363**: 417-421
- Lobao-Soares B, Walz R, Carlotti CG, Jr., Sakamoto AC, Calvo F, Terzian AL, da Silva JA, Wichert-Ana L, Coimbra NC, Bianchin MM (2007) Cellular prion protein regulates the motor behaviour performance and anxiety-induced responses in genetically modified mice. *Behavioural brain research* **183**: 87-94
- Lobao-Soares B, Walz R, Prediger RD, Freitas RL, Calvo F, Bianchin MM, Leite JP, Landemberger MC, Coimbra NC (2008) Cellular prion protein modulates defensive attention and innate fear-induced behaviour evoked in transgenic mice submitted to an agonistic encounter with the tropical coral snake *Oxyrhopus guibei*. *Behavioural brain research* **194**: 129-137

- Locht C, Chesebro B, Race R, Keith JM (1986) Molecular cloning and complete sequence of prion protein cDNA from mouse brain infected with the scrapie agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 6372-6376
- Lopez CD, Yost CS, Prusiner SB, Myers RM, Lingappa VR (1990) Unusual topogenic sequence directs prion protein biogenesis. *Science* **248**: 226-229
- Lopez Garcia F, Zahn R, Riek R, Wuthrich K (2000) NMR structure of the bovine prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8334-8339
- Lu J, Deutsch C (2005a) Folding zones inside the ribosomal exit tunnel. *Nature structural & molecular biology* **12**: 1123-1129
- Lu J, Deutsch C (2005b) Secondary structure formation of a transmembrane segment in Kv channels. *Biochemistry* **44**: 8230-8243
- Luhrs T, Riek R, Guntert P, Wuthrich K (2003) NMR structure of the human doppel protein. *Journal of molecular biology* **326**: 1549-1557
- Lysek DA, Schorn C, Nivon LG, Esteve-Moya V, Christen B, Calzolari L, von Schroetter C, Fiorito F, Herrmann T, Guntert P, Wuthrich K (2005) Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 640-645
- Ma J, Lindquist S (2001) Wild-type PrP and a mutant associated with prion disease are subject to retrograde transport and proteasome degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 14955-14960
- Ma J, Wollmann R, Lindquist S (2002) Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. *Science* **298**: 1781-1785
- Ma Y, Hendershot LM (2004) The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe? *Nat Rev Cancer* **4**: 966-977
- Maley F, Trimble RB, Tarentino AL, Plummer TH, Jr. (1989) Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Anal Biochem* **180**: 195-204
- Malhotra JD, Kaufman RJ (2007) The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin Cell Dev Biol* **18**: 716-731
- Mallucci G, Dickinson A, Linehan J, Klohn PC, Brandner S, Collinge J (2003) Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science* **302**: 871-874
- 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
- 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. *Molecular neurobiology* **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
- 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
- Mast SW, Diekman K, Karaveg K, Davis A, Sifers RN, Moremen KW (2005) Human EDEM2, a novel homolog of family 47 glycosidases, is involved in ER-associated degradation of glycoproteins. *Glycobiology* **15**: 421-436
- Mathiason CK, Powers JG, Dahmes SJ, Osborn DA, Miller KV, Warren RJ, Mason GL, Hays SA, Hayes-Klug J, Seelig DM, Wild MA, Wolfe LL, Spraker TR, Miller MW, Sigurdson CJ, Telling GC, Hoover EA (2006) Infectious prions in the saliva and blood of deer with chronic wasting disease. *Science* **314**: 133-136
- Matlack KE, Mothes W, Rapoport TA (1998) Protein translocation: tunnel vision. *Cell* **92**: 381-390
- McCracken AA, Brodsky JL (1996) Assembly of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin, and ATP. *J Cell Biol* **132**: 291-298
- McGowan JP (1922) Scrapie in sheep. *Journal of Agriculture* **5**: 365-375

- McLennan NF, Brennan PM, McNeill A, Davies I, Fotheringham A, Rennison KA, Ritchie D, Brannan F, Head MW, Ironside JW, Williams A, Bell JE (2004) Prion protein accumulation and neuroprotection in hypoxic brain damage. *Am J Pathol* **165**: 227-235
- Mead S (2006) Prion disease genetics. *Eur J Hum Genet* **14**: 273-281
- Medori R, Tritschler H-J, LeBlanc A, Villare F, Manetto V, Chen HY, Xue R, Leal S, Montagna P, Cortelli P, Tinuper P, Avoni P, Mochi M, Baruzzi A, Hauw JJ, Ott J, Lugaresi E, Autilio-Gambetti L, 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
- Menendez-Benito V, Verhoef LG, Masucci MG, Dantuma NP (2005) Endoplasmic reticulum stress compromises the ubiquitin-proteasome system. *Hum Mol Genet* **14**: 2787-2799
- Menetret JF, Hegde RS, Heinrich SU, Chandramouli P, Ludtke SJ, Rapoport TA, Akey CW (2005) Architecture of the ribosome-channel complex derived from native membranes. *Journal of molecular biology* **348**: 445-457
- Menetret JF, Neuhof A, Morgan DG, Plath K, Radermacher M, Rapoport TA, Akey CW (2000) The structure of ribosome-channel complexes engaged in protein translocation. *Mol Cell* **6**: 1219-1232
- Meyer DI, Dobberstein B (1980) Identification and characterization of a membrane component essential for the translocation of nascent proteins across the membrane of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **87**: 503-508
- Milhavet O, Lehmann S (2002) Oxidative stress and the prion protein in transmissible spongiform encephalopathies. *Brain Res Brain Res Rev* **38**: 328-339
- Miller JD, Walter P (1993) A GTPase cycle in initiation of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *Ciba Found Symp* **176**: 147-159; discussion 159-163
- Miller MW, Williams ES (2003) Prion disease: horizontal prion transmission in mule deer. *Nature* **425**: 35-36
- Miller MW, Williams ES, Hobbs NT, Wolfe LL (2004) Environmental sources of prion transmission in mule deer. *Emerg Infect Dis* **10**: 1003-1006
- Mingarro I, Nilsson I, Whitley P, von Heijne G (2000) Different conformations of nascent polypeptides during translocation across the ER membrane. *BMC Cell Biol* **1**: 3
- Mironov AJ, Latawiec D, Wille H, Bouzamondo-Bernstein E, Legname G, Williamson RA, Burton D, DeArmond SJ, Prusiner SB, Peters PJ (2003) Cytosolic prion protein in neurons. *J Neurosci* **23**: 7183-7193
- Mitteregger G, Vosko M, Krebs B, Xiang W, Kohlmannspurger V, Nolting S, Hamann GF, Kretzschmar HA (2007) The role of the octarepeat region in neuroprotective function of the cellular prion protein. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* **17**: 174-183
- Molinari M, Helenius A (1999) Glycoproteins form mixed disulphides with oxidoreductases during folding in living cells. *Nature* **402**: 90-93
- 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 AFA, 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
- Moran P, Raab H, Kohr WJ, Caras IW (1991) Glycophospholipid membrane anchor attachment. Molecular analysis of the cleavage/attachment site. *J Biol Chem* **266**: 1250-1257
- Moremen KW, Trimble RB, Herscovics A (1994) Glycosidases of the asparagine-linked oligosaccharide processing pathway. *Glycobiology* **4**: 113-125
- Morgan DG, Menetret JF, Neuhof A, Rapoport TA, Akey CW (2002) Structure of the mammalian ribosome-channel complex at 17A resolution. *Journal of molecular biology* **324**: 871-886
- Mori K, Sant A, Kohno K, Normington K, Gething MJ, Sambrook JF (1992) A 22 bp cis-acting element is necessary and sufficient for the induction of the yeast KAR2 (BiP) gene by unfolded proteins. *Embo J* **11**: 2583-2593

- Morimoto RI (2008) Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes Dev* **22**: 1427-1438
- Mothes W, Prehn S, Rapoport TA (1994) Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER membrane. *Embo J* **13**: 3973-3982
- 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
- Muchowski PJ, Schaffar G, Sittler A, Wanker EE, Hayer-Hartl MK, Hartl FU (2000) Hsp70 and hsp40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 7841-7846
- Muramoto T, DeArmond SJ, Scott M, Telling GC, Cohen FE, Prusiner SB (1997) Heritable disorder resembling neuronal storage disease in mice expressing prion protein with deletion of an  $\alpha$ -helix. *Nat Med* **3**: 750-755
- Nakatsukasa K, Brodsky JL (2008) The recognition and retrotranslocation of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum. *Traffic* **9**: 861-870
- Netzer WJ, Hartl FU (1998) Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and -independent mechanisms. *Trends Biochem Sci* **23**: 68-73
- Ng DT, Spear ED, Walter P (2000) The unfolded protein response regulates multiple aspects of secretory and membrane protein biogenesis and endoplasmic reticulum quality control. *J Cell Biol* **150**: 77-88
- Nishikawa S, Brodsky JL, Nakatsukasa K (2005) Roles of molecular chaperones in endoplasmic reticulum (ER) quality control and ER-associated degradation (ERAD). *Journal of biochemistry* **137**: 551-555
- Oesch B, Westaway D, Wälchli M, McKinley MP, Kent SBH, 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
- Oidtmann B, Simon D, Holtkamp N, Hoffmann R, Baier M (2003) Identification of cDNAs from Japanese pufferfish (*Fugu rubripes*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) coding for homologues to tetrapod prion proteins. *FEBS Lett* **538**: 96-100
- Okamura K, Kimata Y, Higashio H, Tsuru A, Kohno K (2000) Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* **279**: 445-450
- Olivari S, Galli C, Alanen H, Ruddock L, Molinari M (2005) A novel stress-induced EDEM variant regulating endoplasmic reticulum-associated glycoprotein degradation. *J Biol Chem* **280**: 2424-2428
- Oliver JD, van der Wal FJ, Bulleid NJ, High S (1997) Interaction of the thiol-dependent reductase ERp57 with nascent glycoproteins. *Science* **275**: 86-88
- Orsi A, Fioriti L, Chiesa R, Sitia R (2006) Conditions of endoplasmic reticulum stress favor the accumulation of cytosolic prion protein. *J Biol Chem* **281**: 30431-30438
- Ou WJ, Cameron PH, Thomas DY, Bergeron JJ (1993) Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation. *Nature* **364**: 771-776
- Oyadomari S, Yun C, Fisher EA, Kreglinger N, Kreibich G, Oyadomari M, Harding HP, Goodman AG, Harant H, Garrison JL, Taunton J, Katze MG, Ron D (2006) Cotranslocational degradation protects the stressed endoplasmic reticulum from protein overload. *Cell* **126**: 727-739
- Paisley D, Banks S, Selfridge J, McLennan NF, Ritchie AM, McEwan C, Irvine DS, Saunders PT, Manson JC, Melton DW (2004) Male infertility and DNA damage in Doppel knockout and prion protein/Doppel double-knockout mice. *Am J Pathol* **164**: 2279-2288
- Pan K-M, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, Prusiner SB (1993) Conversion of  $\alpha$ -helices into  $\beta$ -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 10962-10966
- Parodi AJ (2000) Protein glucosylation and its role in protein folding. *Annu Rev Biochem* **69**: 69-93

- Paulson JC, Colley KJ (1989) Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *J Biol Chem* **264**: 17615-17618
- Pauly PC, Harris DA (1998) Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J Biol Chem* **273**: 33107-33110
- Peden AH, Head MW, Ritchie DL, Bell JE, Ironside JW (2004) Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet* **364**: 527-529
- Peters PJ, Mironov AJ, Peretz D, Van Donselaar E, Leclerc E, Erpel S, DeArmond SJ, Burton DR, Williamson RA, Vey M, Prusiner SB (2003) Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *J Cell Biol* **162**: 703-717
- Petersen RB, Tabaton M, Berg L, Schrank B, Torack RM, Leal S, Julien J, Vital C, Deleplanque B, Pendlebury WW, et al. (1992) Analysis of the prion protein gene in thalamic dementia. *Neurology* **42**: 1859-1863
- Plempner RK, Bohmler S, Bordallo J, Sommer T, Wolf DH (1997) Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature* **388**: 891-895
- Pohlschroder M, Prinz WA, Hartmann E, Beckwith J (1997) Protein translocation in the three domains of life: variations on a theme. *Cell* **91**: 563-566
- Poulter M, Baker HF, Frith CD, Leach M, Lofthouse R, Ridley RM, Shah T, Owen F, Collinge J, Brown J, et al. (1992) Inherited prion disease with 144 base pair gene insertion. 1. Genealogical and molecular studies. *Brain* **115 ( Pt 3)**: 675-685
- Premzl M, Gready JE, Jermini LS, Simonic T, Marshall Graves JA (2004) Evolution of vertebrate genes related to prion and Shadoo proteins--clues from comparative genomic analysis. *Molecular biology and evolution* **21**: 2210-2231
- Premzl M, Sangiorgio L, Strumbo B, Marshall Graves JA, Simonic T, Gready JE (2003) Shadoo, a new protein highly conserved from fish to mammals and with similarity to prion protein. *Gene* **314**: 89-102
- Prince LA, Mann D, Reilly T (2006) Creutzfeldt-Jakob disease: an emergency department presentation of a rare disease. *The Journal of emergency medicine* **31**: 41-44
- 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 (1995) The prion diseases. *Scientific American* **272**: 48-51, 54-47
- Prusiner SB, Groth DF, Bolton DC, Kent SB, Hood LE (1984) Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell* **38**: 127-134
- Prusiner SB, McKinley MP, Groth DF, Bowman KA, Mock NI, Cochran SP, Masiarz FR (1981) Scrapie agent contains a hydrophobic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 6675-6679
- Prusiner SB, Scott M, Foster D, Pan K-M, Groth D, Mirenda C, Torchia M, Yang S-L, Serban D, Carlson GA, Hoppe PC, Westaway D, DeArmond SJ (1990) Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell* **63**: 673-686
- Prusiner SB, Scott MR, DeArmond SJ, Cohen FE (1998) Prion protein biology. *Cell* **93**: 337-348
- 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
- Rambold AS, Miesbauer M, Rapaport D, Bartke T, Baier M, Winklhofer KF, Tatzelt J (2006) Association of Bcl-2 with misfolded prion protein is linked to the toxic potential of cytosolic PrP. *Mol Biol Cell* **17**: 3356-3368
- Rambold AS, Müller V, Ron U, Ben-Tal N, Winklhofer KF, Tatzelt J (2008) Stress-protective activity of prion protein is corrupted by scrapie-prions. *Embo J* **27**: 1974-1984
- Rane NS, Kang SW, Chakrabarti O, Feigenbaum L, Hegde RS (2008) Reduced translocation of nascent prion protein during ER stress contributes to neurodegeneration. *Dev Cell* **15**: 359-370

- Rane NS, Yonkovich JL, Hegde RS (2004) Protection from cytosolic prion protein toxicity by modulation of protein translocation. *Embo J* **23**: 4550-4559
- Rangel A, Burgaya F, Gavin R, Soriano E, Aguzzi A, Del Rio JA (2007) Enhanced susceptibility of Prnp-deficient mice to kainate-induced seizures, neuronal apoptosis, and death: Role of AMPA/kainate receptors. *J Neurosci Res* **85**: 2741-2755
- Rapoport TA (2007) Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* **450**: 663-669
- 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
- Riek R, Hornemann S, Wider G, Billeter M, Glockshuber R, Wuthrich K (1996) NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature* **382**: 180-182
- Riek R, Hornemann S, Wider G, Glockshuber R, Wuthrich K (1997) NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett* **413**: 282-288
- Riek R, Wider G, Billeter M, Hornemann S, Glockshuber R, Wuthrich K (1998) Prion Protein Nmr Structure and Familial Human Spongiform Encephalopathies. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 11667-11672
- Rivera-Milla E, Stuermer CA, Malaga-Trillo E (2003) An evolutionary basis for scrapie disease: identification of a fish prion mRNA. *Trends Genet* **19**: 72-75
- Robbins PW, Trimble RB, Wirth DF, Hering C, Maley F, Maley GF, Das R, Gibson BW, Royal N, Biemann K (1984) Primary structure of the Streptomyces enzyme endo-beta-N-acetylglucosaminidase H. *J Biol Chem* **259**: 7577-7583
- Rogers M, Yehiely F, Scott M, Prusiner SB (1993) Conversion of truncated and elongated prion proteins into the scrapie isoform in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 3182-3186
- Rossi D, Cozzio A, Flechsig E, Klein MA, Rulicke T, Aguzzi A, Weissmann C (2001) Onset of ataxia and Purkinje cell loss in PrP null mice inversely correlated with Dpl level in brain. *Embo J* **20**: 694-702
- Roucou X, Guo Q, Zhang Y, Goodyer CG, LeBlanc AC (2003) Cytosolic prion protein is not toxic and protects against Bax-mediated cell death in human primary neurons. *J Biol Chem* **278**: 40877-40881
- Rudd PM, Endo T, Colominas C, Groth D, Wheeler SF, Harvey DJ, Wormald MR, Serban H, Prusiner SB, Kobata A, Dwek RA (1999) Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 13044-13049
- Rutkowski DT, Kang SW, Goodman AG, Garrison JL, Taunton J, Katze MG, Kaufman RJ, Hegde RS (2007) The role of p58IPK in protecting the stressed endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* **18**: 3681-3691
- Rutkowski DT, Lingappa VR, Hegde RS (2001) Substrate-specific regulation of the ribosome-translocon junction by N-terminal signal sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 7823-7828
- Rutkowski DT, Ott CM, Polansky JR, Lingappa VR (2003) Signal sequences initiate the pathway of maturation in the endoplasmic reticulum lumen. *J Biol Chem* **278**: 30365-30372
- Saborio GP, Permanne B, Soto C (2001) Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* **411**: 810-813
- Safar JG, Kellings K, Serban A, Groth D, Cleaver JE, Prusiner SB, Riesner D (2005) Search for a prion-specific nucleic acid. *J Virol* **79**: 10796-10806
- Saiki RK, Gelfand 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
- Sailer A, Büeler H, Fischer M, Aguzzi A, Weissmann C (1994) No propagation of prions in mice devoid of PrP. *Cell* **77**: 967-968
- Sakaguchi S, Katamine S, Nishida N, Moriuchi R, Shigematsu K, Sugimoto T, Nakatani A, Kataoka Y, Houtani T, Shirabe S, Okada H, Hasegawa S, Miyamoto T, Noda T (1996) Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* **380**: 528-531

- Sambrook J, Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 2nd Edition. *Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York*
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467
- Saparov SM, Erlandson K, Cannon K, Schaletzky J, Schulman S, Rapoport TA, Pohl P (2007) Determining the conductance of the SecY protein translocation channel for small molecules. *Mol Cell* **26**: 501-509
- Schatzl HM, Da Costa M, Taylor L, Cohen FE, Prusiner SB (1995) Prion protein gene variation among primates. *Journal of molecular biology* **245**: 362-374
- Schlesinger DH, Goldstein G, Niall HD (1975) The complete amino acid sequence of ubiquitin, an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells. *Biochemistry* **14**: 2214-2218
- Schneider B, Mutel V, Pietri M, Ermonval M, Mouillet-Richard S, Kellermann O (2003) NADPH oxidase and extracellular regulated kinases 1/2 are targets of prion protein signaling in neuronal and nonneuronal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 13326-13331
- Shamu CE, Walter P (1996) Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *Embo J* **15**: 3028-3039
- Shmerling D, Hegyi I, Fischer M, Blättler T, Brandner S, Götz J, Rülcke T, Flechsig E, Cozzio A, von Mehning 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
- Shyu WC, Harn HJ, Saeki K, Kubosaki A, Matsumoto Y, Onodera T, Chen CJ, Hsu YD, Chiang YH (2002) Molecular modulation of expression of prion protein by heat shock. *Molecular neurobiology* **26**: 1-12
- Shyu WC, Lin SZ, Chiang MF, Ding DC, Li KW, Chen SF, Yang HI, Li H (2005) Overexpression of PrPC by adenovirus-mediated gene targeting reduces ischemic injury in a stroke rat model. *J Neurosci* **25**: 8967-8977
- Sigurdsson B (1954) Rida, a chronic encephalitis of sheep with general remarks in infections which develop slowly and some of their special characteristics. *BrVetJ* **110**: 341-354
- Silberstein S, Gilmore R (1996) Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase. *Faseb J* **10**: 849-858
- Simonc T, Duga S, Strumbo B, Asselta R, Cecilian F, Ronchi S (2000) cDNA cloning of turtle prion protein. *FEBS Lett* **469**: 33-38
- Sommer T, Jentsch S (1993) A protein translocation defect linked to ubiquitin conjugation at the endoplasmic reticulum. *Nature* **365**: 176-179
- Sousa MC, Ferrero-Garcia MA, Parodi AJ (1992) Recognition of the oligosaccharide and protein moieties of glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase. *Biochemistry* **31**: 97-105
- Sparkes RS, Simon M, Cohn VH, Fournier RE, Lem J, Klisak I, Heinzmann C, Blatt C, Lucero M, Mohandas T, et al. (1986) Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 7358-7362
- Spudich A, Frigg R, Kilic E, Kilic U, Oesch B, Raeber A, Bassetti CL, Hermann DM (2005) Aggravation of ischemic brain injury by prion protein deficiency: role of ERK-1/-2 and STAT-1. *Neurobiol Dis* **20**: 442-449
- Stahl N, Baldwin MA, Teplow 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 protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* **51**: 229-240
- Stevens FJ, Argon Y (1999) Protein folding in the ER. *Semin Cell Dev Biol* **10**: 443-454



- Stewart RS, Piccardo P, Ghetti B, Harris DA (2005) Neurodegenerative illness in transgenic mice expressing a transmembrane form of the prion protein. *J Neurosci* **25**: 3469-3477
- Stimson E, Hope J, Chong A, Burlingame AL (1999) Site-specific characterization of the N-linked glycans of murine prion protein by high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and exoglycosidase digestions. *Biochemistry* **38**: 4885-4895
- Stöckel J, Safar J, Wallace AC, Cohen FE, Prusiner SB (1998) Prion protein selectively binds copper(II) ions. *Biochemistry* **37**: 7185-7193
- Strumbo B, Ronchi S, Bolis LC, Simonic T (2001) Molecular cloning of the cDNA coding for *Xenopus laevis* prion protein. *FEBS Lett* **508**: 170-174
- Suh K, Bergmann JE, Gabel CA (1989) Selective retention of monoglucosylated high mannose oligosaccharides by a class of mutant vesicular stomatitis virus G proteins. *J Cell Biol* **108**: 811-819
- Sumudhu W, Perera S, Hooper NM (2001) Ablation of the metal ion-induced endocytosis of the prion protein by disease-associated mutation of the octarepeat region. *Cur Biol* **11**: 519-523
- Sunyach C, Jen A, Deng J, Fitzgerald KT, Frobert Y, Grassi J, McCaffrey MW, Morris R (2003) The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *EMBO J* **22**: 3591-3601
- Suzuki T, Kurokawa T, Hashimoto H, Sugiyama M (2002) cDNA sequence and tissue expression of *Fugu rubripes* prion protein-like: a candidate for the teleost orthologue of tetrapod PrPs. *Biochem Biophys Res Commun* **294**: 912-917
- Taraboulos A, Scott M, Semenov A, Avrahami D, Laszlo L, Prusiner SB (1995) Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J Cell Biol* **129**: 121-132
- Tian P, Andricioaei I (2006) Size, motion, and function of the SecY translocon revealed by molecular dynamics simulations with virtual probes. *Biophys J* **90**: 2718-2730
- Tobler I, Gaus SE, Deboer T, Achermann P, Fischer M, Rülicke 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
- Toni M, Spisni E, Griffoni C, Santi S, Riccio M, Lenaz P, Tomasi V (2006) Cellular prion protein and caveolin-1 interaction in a neuronal cell line precedes fyn/erk 1/2 signal transduction. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2006**: 69469
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 4350-4354
- Trombetta ES, Simons JF, Helenius A (1996) Endoplasmic reticulum glucosidase II is composed of a catalytic subunit, conserved from yeast to mammals, and a tightly bound noncatalytic HDEL-containing subunit. *J Biol Chem* **271**: 27509-27516
- Tsubuki S, Kawasaki H, Saito Y, Miyashita N, Inomata M, Kawashima S (1993) Purification and characterization of a Z-Leu-Leu-Leu-MCA degrading protease expected to regulate neurite formation: a novel catalytic activity in proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* **196**: 1195-1201
- Uboldi C, Paulis M, Guidi E, Bertoni A, Meo GP, Perucatti A, Iannuzzi L, Raimondi E, Brunner RM, Eggen A, Ferretti L (2006) Cloning of the bovine prion-like Shadoo (SPRN) gene by comparative analysis of the predicted genomic locus. *Mamm Genome* **17**: 1130-1139
- Uelhoff A, Tatzelt J, Aguzzi A, Winklhofer KF, Haass C (2005) A pathogenic PrP mutation and doppel interfere with polarized sorting of the prion protein. *J Biol Chem* **280**: 5137-5140
- Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D (2000) Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* **287**: 664-666

- Valent QA, Kendall DA, High S, Kusters R, Oudega B, Luirink J (1995) Early events in preprotein recognition in *E. coli*: interaction of SRP and trigger factor with nascent polypeptides. *Embo J* **14**: 5494-5505
- van Anken E, Braakman I (2005) Versatility of the endoplasmic reticulum protein folding factory. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **40**: 191-228
- Van den Berg B, Clemons WM, Jr., Collinson I, Modis Y, Hartmann E, Harrison SC, Rapoport TA (2004) X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* **427**: 36-44. Epub 2003 Dec 2003
- van Huizen R, Martindale JL, Gorospe M, Holbrook NJ (2003) P58IPK, a novel endoplasmic reticulum stress-inducible protein and potential negative regulator of eIF2alpha signaling. *J Biol Chem* **278**: 15558-15564
- Varki A (1993) Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **3**: 97-130
- Vassallo N, Herms J (2003) Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse. *J Neurochem* **86**: 538-544
- Vembar SS, Brodsky JL (2008) One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 944-957
- Vernace VA, Schmidt-Glenewinkel T, Figueiredo-Pereira ME (2007) Aging and regulated protein degradation: who has the UPPer hand? *Aging cell* **6**: 599-606
- 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
- Villmann C, Becker CM (2007) On the hypes and falls in neuroprotection: targeting the NMDA receptor. *Neuroscientist* **13**: 594-615
- Voges D, Zwickl P, Baumeister W (1999) The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* **68**: 1015-1068
- Voigt S, Jungnickel B, Hartmann E, Rapoport TA (1996) Signal sequence-dependent function of the TRAM protein during early phases of protein transport across the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* **134**: 25-35
- von Heijne G (1985) Signal sequences. The limits of variation. *Journal of molecular biology* **184**: 99-105
- Wadsworth JD, Collinge J (2007) Update on human prion disease. *Biochim Biophys Acta* **1772**: 598-609
- Waggoner DJ, Drisaldi B, Bartnikas TB, Casareno RL, Prohaska JR, Gitlin J, Harris DA (2000) Brain copper content and cuproenzyme activity do not vary with prion protein expression level. *J Biol Chem* **275**: 7455-7458
- Walmsley AR, Zeng FN, Hooper NM (2001) Membrane topology influences N-glycosylation of the prion protein. *Embo J* **20**: 703-712
- Walter P, Blobel G (1980) Purification of a membrane-associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: 7112-7116
- Walter P, Blobel G (1982) Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Nature* **299**: 691-698
- Walter S, Buchner J (2002) Molecular chaperones--cellular machines for protein folding. *Angewandte Chemie (International ed)* **41**: 1098-1113
- Watts JC, Balachandran A, Westaway D (2006) The expanding universe of prion diseases. *PLoS pathogens* **2**: e26
- Watts JC, Drisaldi B, Ng V, Yang J, Strome B, Horne P, Sy MS, Yoong L, Young R, Mastrangelo P, Bergeron C, Fraser PE, Carlson GA, Mount HT, Schmitt-Ulms G, Westaway D (2007) The CNS glycoprotein Shadoo has PrP(C)-like protective properties and displays reduced levels in prion infections. *Embo J* **26**: 4038-4050
- Watts JC, Westaway D (2007) The prion protein family: diversity, rivalry, and dysfunction. *Biochim Biophys Acta* **1772**: 654-672

- Weise J, Crome O, Sandau R, Schulz-Schaeffer W, Bahr M, Zerr I (2004) Upregulation of cellular prion protein (PrP<sup>c</sup>) after focal cerebral ischemia and influence of lesion severity. *Neurosci Lett* **372**: 146-150
- Weise J, Sandau R, Schwarting S, Crome O, Wrede A, Schulz-Schaeffer W, Zerr I, Bahr M (2006) Deletion of cellular prion protein results in reduced Akt activation, enhanced postischemic caspase-3 activation, and exacerbation of ischemic brain injury. *Stroke* **37**: 1296-1300
- Wells GAH, Scott AC, Johnson CT, Gunning RF, Hancock RD, Jeffrey M, Dawson M, Bradley R (1987) A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec* **121**: 419-420
- Westaway D, Cooper C, Turner S, Da Costa M, Carlson GA, Prusiner SB (1994) Structure and polymorphism of the mouse prion protein gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 6418-6422
- Whitley P, Nilsson I, Vonheijne G (1996) A Nascent Secretory Protein May Traverse the Ribosome Endoplasmic Reticulum Translocase Complex As an Extended Chain. *J Biol Chem* **271**: 6241-6244
- Wiertz EJ, Tortorella D, Bogyo M, Yu J, Mothes W, Jones TR, Rapoport TA, Ploegh HL (1996) Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* **384**: 432-438
- Wilesmith JW (1988) Bovine spongiform encephalopathy. *Vet Rec* **122**: 614
- Wilesmith JW, Ryan JB, Hueston WD (1992) Bovine spongiform encephalopathy: case-control studies of calf feeding practices and meat and bonemeal inclusion in proprietary concentrates. *Research in veterinary science* **52**: 325-331
- Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, Smith PG (1996) A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* **347**: 921-925
- Williams ES (2005) Chronic wasting disease. *Veterinary pathology* **42**: 530-549
- Williams ES, Miller MW (2002) Chronic wasting disease in deer and elk in North America. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* **21**: 305-316
- Williams ES, Young S (1980) Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *Journal of wildlife diseases* **16**: 89-98
- Williams ES, Young S (1982) Spongiform encephalopathy of Rocky Mountain elk. *Journal of wildlife diseases* **18**: 465-471
- Williams ES, Young S (1992) Spongiform encephalopathies in Cervidae. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* **11**: 551-567
- Winklhofer KF, Heske J, Heller U, Reintjes A, Muranji W, Moarefi I, Tatzelt J (2003) Determinants of the in vivo-folding of the prion protein: a bipartite function of helix 1 in folding and aggregation. *J Biol Chem* **278**: 14961-14970
- Winklhofer KF, Tatzelt J, Haass C (2008) The two faces of protein misfolding: Gain and loss of function in neurodegenerative diseases. *EMBO J* **27**: 336-349
- Woolhead CA, McCormick PJ, Johnson AE (2004) Nascent membrane and secretory proteins differ in FRET-detected folding far inside the ribosome and in their exposure to ribosomal proteins. *Cell* **116**: 725-736
- Wopfner F, Weidenhöfer G, Schneider R, von Brunn A, Gilch S, Schwarz TF, Werner T, Schätzl HM (1999) Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *Journal of molecular biology* **289**: 1163-1178
- Wroe SJ, Pal S, Siddique D, Hyare H, Macfarlane R, Joiner S, Linehan JM, Brandner S, Wadsworth JD, Hewitt P, Collinge J (2006) Clinical presentation and pre-mortem diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease associated with blood transfusion: a case report. *Lancet* **368**: 2061-2067
- Wuthrich K, Riek R (2001) Three-dimensional structures of prion proteins. *Advances in protein chemistry* **57**: 55-82

- Yan W, Frank CL, Korth MJ, Sopher BL, Novoa I, Ron D, Katze MG (2002) Control of PERK eIF2 $\alpha$  kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58IPK. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 15920-15925
- Ye Y, Shibata Y, Yun C, Ron D, Rapoport TA (2004) A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* **429**: 841-847
- Yedidia Y, Horonchik L, Tzaban S, Yanai A, Taraboulos A (2001) Proteasomes and ubiquitin are involved in the turnover of the wild-type prion protein. *Embo J* **20**: 5383-5391
- Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, Tohyama M (2001) Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem* **276**: 13935-13940
- Yost CS, Lopez CD, Prusiner SB, Myers RM, Lingappa VR (1990) Non-hydrophobic extracytoplasmic determinant of stop transfer in the prion protein. *Nature* **343**: 669-672
- Zanata SM, Lopes MH, Mercadante AF, Hajj GN, Chiarini LB, Nomizo R, Freitas AR, Cabral AL, Lee KS, Juliano MA, De Oliveira E, Jachieri SG, Burlingame A, Huang L, Linden R, Brentani RR, Martins VR (2002) Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *Embo J* **21**: 3307-3316
- Zanusso G, Petersen RB, Jin T, Jing Y, Kanoush R, Ferrari S, Gambetti P, Singh N (1999) Proteasomal degradation and N-terminal protease resistance of the codon 145 mutant prion protein. *J Biol Chem* **274**: 23396-23404
- Zapun A, Jakob CA, Thomas DY, Bergeron JJ (1999) Protein folding in a specialized compartment: the endoplasmic reticulum. *Structure* **7**: R173-182
- Zeilhofer HU, Studler B, Arabadzisz D, Schweizer C, Ahmadi S, Layh B, Bosl MR, Fritschy JM (2005) Glycinergic neurons expressing enhanced green fluorescent protein in bacterial artificial chromosome transgenic mice. *The Journal of comparative neurology* **482**: 123-141
- Zhou M, Schekman R (1999) The engagement of Sec61p in the ER dislocation process. *Mol Cell* **4**: 925-934

## 8 Glossar

Abb.	Abbildung
APP	Amyloid-Vorläufer-Protein ( <i>amyloid precursor protein</i> )
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATF6	<i>activating transcription factor-6</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAX	Bcl-assoziertes X-Protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BiP	Immunglobulin Schwere-Kette bindendes Protein
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie
Ci	Curie
CJK	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
CWD	Chronisch zehrende Hirschkrankheit ( <i>chronic wasting disease</i> )
Da	Dalton
DAPI	4', 6-Diamidino-2- phenylindoldihydrochlorid
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
dCTP	Deoxycytosintriphosphat
dGTP	Deoxyguanosintriphosphat
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Desoxycholat
DRM	Detergens-resistente Membranen
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhances Chemiluminescence</i>
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EndoH	Endo- $\beta$ -N-Acetylglucosamidase, Endoglykosidase H
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assozierte Degradierung
FCS	Fötale Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FFI	Fatale Familiäre Insomnie
FSE	Feline spongiforme Enzephalopathie
Glc	Glukose
GlucNAc	N-Acetyl-Glucosamin
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
Grp	Glukose-reguliertes Protein
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom
HD	hydrophobe Domäne
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)Piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure)
hP	humanes Parkin
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
Hsp	Hitzeschockprotein
IF	Immunfluoreszenz
IP	Immunpräzipitation
IRE1	<i>Inositol-requiring protein-1</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasenpaare
kDa	Molekulargewicht von Proteinen(Kilodalton)

Man	Mannose
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MG132	Carboxybenzoyl-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucinal
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
NMR	Kernspinresonanz-Spektroskopie ( <i>nuclear magnetic resonance</i> )
OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei $\lambda = x \text{ nm}$
OR	Oktarepeat
ORF	offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
OST	Oligosaccharyltransferase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte physiologische Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PERK	<i>protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase</i>
PK	Proteinase K
PrP	Prion-Protein
pH	negativer dekadischer Logarithmus der $\text{H}_3\text{O}^+$ -Ionenkonzentration
Ponceau S	3-Hydroxy-4-[2-sulfo-4-(4-sulfophenylazo)-phenylazo]-2,7naphthalendisulfonsäure
QC	Qualitätskontrolle
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
SAP	Alkalische Phosphatase ( <i>shrimp alkaline phosphatase</i> )
Sarkosyl	N-Lauroylsarkosin
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecylsulfate</i> )
SOD	Superoxid-Dismutase
SRP	Signal-Erkennungspartikel ( <i>signal recognition particle</i> )
SS	Signalsequenz
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
Tg	Transgen
TG	Thapsigargin
TE	Tris-EDTA
TRAM	<i>translocating chain associating membrane</i>
TRAP	Translokon-assoziiertes Protein
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	t-Octyl-Phenoxy-Polyethoxyethanol
TSE	Transmissible spongiforme Enzephalopathien
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
U	Enzymaktivität, Umsetzung von 1 $\mu\text{mol}$ Substanz/min
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UPR	zelluläre Antwort auf ungefaltete Proteine ( <i>unfolded protein response</i> )
wt	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

Aminosäuren wurden nach dem Einbuchstaben-Code bezeichnet. Gewichts- und andere Einheiten wurden nach dem internationalen SI-System benannt.

## 9 Lebenslauf

### PERSÖNLICHE DATEN

Name	Margit Miesbauer, Dipl.-Ing.
Kontakt	Lindwurmstraße 169 80337 München, Deutschland margit.miesbauer@med.uni-muenchen.de
Geburtsort	Schärding, Österreich
Geburtsdatum	07.07.1980
Nationalität	Österreich
Familienstand	ledig

### AUSBILDUNG

Seit 01/2006	Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE) - Standort München, Adolf Butenandt-Institut, Ludwig-Maximilians-Universität München, Institut für Neurobiochemie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. J. Tatzelt <b>Promotion</b>
09/2004-12/2005	Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried Abteilung Zelluläre Biochemie, Prof. Dr. F.U. Hartl, Nachwuchsarbeitsgruppe Dr. J. Tatzelt <b>Promotion</b>
09/2003-08/2004	Technische Universität Graz, Österreich Institut für Biochemie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. A. Hermetter <b>Diplomarbeit</b> - Effekte oxidierter Etherlipide auf intrazelluläre Signalvorgänge in vaskulären glatten Muskelzellen
09/2001- 08/2003	Technische Universität Graz, Österreich <b>Diplomstudium - 2. Studienabschnitt</b> - Schwerpunkte in Biochemie, Biotechnologie und Lebensmittelchemie
10/1998 – 08/2001	Technische Universität Graz, Österreich <b>Studium der Technischen Chemie, Grundstudium</b>
06/1998	Bundesrealgymnasium Schärding, Österreich <b>Matura</b>

## 10 Veröffentlichungen

- Miesbauer M**, Pfeiffer NV, Rambold AS, Müller V, Kiachopoulos S, Winklhofer KF, Tatzelt J. Alpha-helical domains promote translocation of intrinsically disordered polypeptides into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 2009 Jun 26. [Epub ahead of print]
- Rambold AS\*, **Miesbauer M**\*, Olschewski D, Seidel R, Riemer C, Smale L, Brumm L, Levy M, Gazit E, Oesterhelt D, Baier M, Becker CF, Engelhard M, Winklhofer KF, Tatzelt J. Green tea extracts interfere with the stress-protective activity of PrP(C) and the formation of PrP(Sc). *J Neurochem*. 2008 Oct;107(1):218-29. (\*authors contributed equally).
- Wegmann S, **Miesbauer M**, Winklhofer KF, Tatzelt J, Muller DJ. Observing fibrillar assemblies on scrapie-infected cells. *Pflugers Arch*. 2008 Apr;456(1):83-93.
- Olschewski D, Seidel R, **Miesbauer M**, Rambold AS, Oesterhelt D, Winklhofer KF, Tatzelt J, Engelhard M, Becker CFW. Semisynthetic murine Prion protein equipped with a GPI anchor mimic incorporates into cellular membranes. *Chem Biol*. 2007 Sep;14(9):994-1006.
- Rambold AS, **Miesbauer M**, Rapaport D, Bartke T, Baier M, Winklhofer KF, Tatzelt J. Association of Bcl-2 with misfolded prion protein is linked to the toxic potential of cytosolic PrP. *Mol Biol Cell*. 2006 Aug;17(8):3356-68.
- Miesbauer M**, Bamme T, Riemer C, Oidtmann B, Winklhofer KF, Baier M, Tatzelt J. Prion protein-related proteins from zebrafish are complex glycosylated and contain a glycosylphosphatidylinositol anchor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Mar 3;341(1):218-24.