

Vergleichende Analyse
der Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom-assoziierten
Mutation A117V mit der neuen pathogenen Mutation G114V
des humanen Prion-Proteins *in vivo* und *in vitro*

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Rüdiger Schmalzbauer
aus
Gaggenau

München, 30.05.2003

Schmalzbauer, Rüdiger:

Vergleichende Analyse der Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom-assoziierten Mutation A117V mit der neuen pathogenen Mutation G114V des humanen Prion-Proteins *in vivo* und *in vitro*

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Neuropathologie (Direktor: Prof. Dr. H. A. Kretzschmar) der Ludwig-Maximilians-Universität München angefertigt.

Gutachter:

1. Gutachter

Prof. Dr. H. MacWilliams

2. Gutachter

Prof. Dr. W. Schartau

Tag der mündlichen Prüfung:

17.12.2003

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungen	VI
1. Einleitung	1
1.1 Prionkrankheiten oder übertragbare spongiforme Enzephalopathien	1
1.2 Zelluläres Prion-Protein (PrP ^C) und die pathogene Isoform PrP ^{Sc}	3
1.3 Genetik und Epidemiologie	9
1.4 Pathogenese der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien	12
1.5 Zellbiologie von PrP ^C und PrP-Mutanten	18
1.6 Fallstudie einer neuen PrP-Mutation	22
1.7 Fragestellung	23
2. Material und Methoden	25
2.1 Material	25
2.1.1 Chemikalien	25
2.1.2 Enzyme und Antibiotika	25
2.1.3 „Kits“ zur Behandlung von DNA	26
2.1.4 DNA- und Protein-„Standards“	26
2.1.5 Verbrauchsmaterialien zum Arbeiten mit Bakterien und eukaryontischen Zellen	26
2.1.6 Verbrauchsmaterial für „WesternBlots“	26
2.1.7 Lösungen und Puffer für Arbeiten mit DNA	27
2.1.8 Lösungen und Puffer für Protein- und Zellkulturarbeiten	27
2.1.9 Nährmedien für die Mikrobiologie	28
2.1.10 Medium für eukaryontische Zellen	29
2.1.11 Medienzusätze und gepufferte Salzlösungen	29
2.1.12 Zellkulturmedium	29
2.1.13 <i>Escherichia coli</i> -Stämme	29

2.1.14	Eukaryontische Zelllinien	29
2.1.15	Plasmide	30
2.1.16	Antikörper	30
2.1.16.1	Herstellung eines polyklonalen anti-PrP-Antikörpers	30
2.1.16.2	Eingesetzte Antikörper	31
2.2	Mikrobiologische und genetische Arbeitsmethoden	32
2.2.1	Stammhaltung von <i>E.coli</i> -Kulturen	32
2.2.2	Anzuchtbedingungen und Wachstumsmessung	32
2.2.3	Präparation von kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	32
2.2.4	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	32
2.2.5	Methoden zu Arbeiten mit DNA	33
2.2.5.1	Fällung von DNA mit Ethanol	33
2.2.5.2	Konzentrationsbestimmung der DNA	33
2.2.5.3	Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen	33
2.2.6	Isolierung von Plasmid-DNA	33
2.2.6.1	Mini- und Midipräparation von Plasmid-DNA	33
2.2.6.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	33
2.2.7	Agarosegelelektrophorese	34
2.2.8	Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren	34
2.2.9	Polymerase-Kettenreaktion	34
2.2.10	Ortsspezifische Mutagenese	35
2.2.11	DNA-Sequenzanalyse	36
2.2.11.1	„Cycle sequencing“-Reaktionen	36
2.2.11.2	Das Sequenziergel	36
2.3	Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen und Proteinarbeiten	37
2.3.1	Trypsinieren von Zellen	37
2.3.2	Einfrieren von Zellen	37
2.3.3	Auftauen und Revitalisieren von Zellen	37

2.3.4	Transiente Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA	38
2.3.5	Generierung stabil exprimierender Zellklone	38
2.3.6	Scrapie-infizierte Neuroblastom-Zellen (ScN2A)	38
2.3.7	Konfokale Laserscanning-Mikroskopie	38
2.3.8	Fixierung und Permeabilisierung von Zellen	39
2.3.9	Immunfluoreszenzanalyse	39
2.3.10	Markierung von zellulären Bestandteilen und Zellorganellen mit Fluoreszenz-Farbstoffen	39
2.3.11	Enzymatische Abtrennung GPI-verankerter Proteine von der Zellmembran	39
2.3.12	Zellyse und Präparation von Proteinextrakten aus Zellkulturen	40
2.3.13	Deglykosylierung von Glykoproteinen	40
2.3.14	Proteinkonzentrationsbestimmung	40
2.3.15	Konzentrierung der Proteinextrakte mittels Methanolfällung	40
2.3.16	Konzentrierung von Proteinen mittels Immunopräzipitation	40
2.3.17	Detergenzlöslichkeits-Test	41
2.3.18	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	41
2.3.19	Tris-Tricine-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	42
2.3.20	Immunologischer Nachweis elektrophoretisch aufgetrennter Proteine („WesternBlot“)	42
2.3.21	„Pulse-Chase-Labeling“-Assay zur radioaktiven Markierung von Proteinen	43
2.4	<i>in vitro</i>-Translations/Translokations-Assay (“Ctm-Assay”)	43
3.	Experimente und Ergebnisse	45
3.1	<i>in vivo</i>-Modellsysteme	45
3.1.1	Konstruktion von Klonierungs- und Expressionsvektoren	45
3.1.2	Expression von wt-PrP und PrP-Mutanten in Neuroblastomzellen	47
3.1.3	Zytotoxische Effekte durch Langzeitexpression von mutiertem PrP	49
3.1.4	Analyse der proteolytischen Spaltung von PrP	50

3.2	Biochemische Charakterisierung von wt-PrP und PrP- Mutanten	53
3.2.1	Analyse der PK-Resistenz	53
3.2.2	Analyse der Detergenzlöslichkeit	54
3.3	Studien zur zellulären Lokalisation	55
3.3.1	Mutiertes PrP zeigt verringerte Expression auf der Zelloberfläche	55
3.3.2	Analyse der enzymatischen Ablösbarkeit von Oberflächen-PrP: keine Unterschiede zwischen wt- und mutiertem PrP	57
3.3.3	Intrazelluläre Akkumulation der PrP-Mutanten	58
3.3.4	Lokalisationsstudien mittels PrP-Chimären mit inseriertem grünem Fluoreszenzprotein (GFP)	59
3.3.4.1	Generierung von GFP-PrP-Chimären	60
3.3.4.2	GFP-PrP-Chimären werden in Neuroblastomzellen exprimiert	61
3.3.4.3	GFP-PrP-Mutanten zeigen eine intrazelluläre Akkumulierung vergleichbar der von PrP-Mutanten	62
3.4	Analyse der zellulären Prozessierung	63
3.4.1	PrP in Zellkompartimenten	63
3.4.1.1	Mutiertes PrP ist verstärkt im Endoplasmatischen Retikulum detektierbar	64
3.4.1.2	Mutiertes PrP zeigt Lokalisation außerhalb des Golgi-Komplexes	65
3.4.1.3	Akkumulation der Mutanten im Zytoplasma	66
3.4.1.4	Kein lysosomaler Abbau von PrP nachweisbar	67
3.5	Die Inhibierung der proteasomalen Degradierung offenbart Unterschiede in der zellulären Prozessierung von wt-PrP und PrP-Mutanten	68
3.5.1	Proteasomeninhibition führt zu starker Translokation von mutiertem PrP ins Zytoplasma	68
3.5.2	Erhöhte Detergenzunlöslichkeit von PrP nach Inhibierung der proteasomalen Degradierung	69
3.5.3	Für den proteasomalen Abbau bestimmtes PrP weist erhöhte PK-Resistenz auf	72

3.6	Expressionsstudien von PrP^C und PrP^{Sc}-Mutanten in infizierten Neuroblastomzellen	73
3.6.1	<i>in vivo</i> -Konvertierung von PrP ^C zu PrP ^{Sc} ist von der Sequenzhomologie abhängig	73
3.6.2	Überführung von murinem PrP ^C in eine PK-resistente Isoform durch Ko-Expression mit PrP ^{Sc}	75
3.6.3	Hinweise auf amyloide Strukturen in Scrapie-infizierten Neuroblastomzellen	76
3.6.3.1	Signalverstärkung der Amyloid-Färbereaktion durch Expression von mutiertem PrP in Scrapie-infizierten Zellen	77
3.7	Analyse des Metabolismus von wt-PrP und Mutanten	79
3.8	<i>in vitro</i>-Translokationsstudien	82
3.8.1	Simulierung der Proteinsynthese und Translokation an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums („Ctm-Assay“)	82
3.8.2	Mutiertes PrP liegt verstärkt in transmembraner Form vor	84
4.	Diskussion	86
5.	Zusammenfassung	100
6.	Literaturverzeichnis	102

Abkürzungen

A	Adenosin, auch Ampère
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
Amp ^r	Ampicillin-Resistenzgen
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BAA	N,N'-Methylenbisacrylamid
BCIP	5-Bromo-4-chlor-3-indolylphosphat
b	Basen
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“)
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
Cys	Cystein
d. h.	das heißt
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
DOC	Desoxycholsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assoziiertes Degradationsweg
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> , und andere
EtOH	Ethanol
FCS	fötale Kälberserum („fetal calf serum“)
g	Gramm, auch Erdbeschleunigung
G	Guanosin
GPI	Phosphatidylinositolglykolipid
h	Stunde/n
HEPES	N-2-Hydroxyethylenpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
i. d. R.	in der Regel
k	Kilo
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
M	molar
mA	Milliampère
MCS	multiple Klonierungsstelle („multiple cloning site“)

VII

min	Minuten
ml	Milliliter
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
Mr	relatives Molekulargewicht
Mr(k)	angegebener Wert x 1000 entspricht relativem Molekulargewicht
mRNA	„messenger“-RNA
mU	Milliunit(s), Enzymeinheit
N	Asparagin
n	Nano (10^{-9})
NBT	Nitroblautetrazolium
ODx	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
Op	Oktapeptide
ORF	offener Leserahmen („open reading frame“)
p	Pico (10^{-12})
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PC	Personalcomputer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PIPLC	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
P/S	Penicillin/Streptomycin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute („revolutions per minute“)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
s.	siehe
SD	Standardabweichung („standard deviation“)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sogn.	so genannte/n
T	Thymidin
t	Zeit
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit(s), Enzymeinheit
u. a.	unter anderem, unter anderen
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
x	Vielfaches von

1. Einleitung

1.1 Prionkrankheiten oder übertragbare spongiforme Enzephalopathien

Als Prionkrankheiten oder übertragbare spongiforme Enzephalopathien bezeichnet man eine Gruppe tödlich verlaufender degenerativer Krankheiten des ZNS (Zentralnervensystem) sowohl von Tieren als auch vom Menschen, die entweder vererbt oder übertragen werden oder auch sporadisch auftreten.

Als Archetyp dieser Krankheiten gilt die seit über 250 Jahren (McGowan, 1922) bekannte und in vielen Ländern auftretende Traberkrankheit (Scrapie, von engl. „to scrape“) von Schafen und Ziegen. Die transmissible Enzephalopathie des Nerzes (TME, „Transmissible Mink Encephalopathy“) (Hartsough & Burger, 1965), die chronisch zehrende Krankheit der Hirschartigen (CWD, „Chronic Wasting Disease“) von Wedelhirschen und Wapiti (Williams & Young, 1980), bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) (Wells *et al.*, 1987), spongiforme Enzephalopathien bei zahlreichen Zootieren (Jeffrey & Wells, 1988) und feline spongiforme Enzephalopathie (Wyatt *et al.*, 1991) sind weitere Prionkrankheiten bei Tieren.

Zu den spongiformen Enzephalopathien des Menschen zählt man die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) (Creutzfeldt, 1920; Jakob, 1921), das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) (Gerstmann *et al.*, 1936), die tödliche familiäre Insomnie (FFI, „fatal familial insomnia“) (Lugaresi *et al.*, 1986), sowie Kuru (Zigas *et al.*, 1957).

Bereits 1936 gelang Cuillé und Chelle durch experimentelle Übertragung von Scrapie (Cuillé & Chelle, 1936) bei Schafen und Ziegen der Nachweis der infektiösen Natur dieser Erkrankung. Im Jahre 1959 erkannte Hadlow Ähnlichkeiten zwischen Scrapie und Kuru, einer durch rituellen Kannibalismus übertragenen neurologischen Erkrankung (Klatzo *et al.*, 1959; Hadlow 1959). Mit der Übertragung von Kuru (Gajdusek *et al.*, 1966) und CJD (Gibbs *et al.*, 1968) auf Schimpansen durch intrazerebrale Inokulation von Hirnhomogenat konnte das Vorhandensein eines infektiösen Agens auch für humane Prionkrankheiten gezeigt werden. Im Jahre 1981 folgte die Übertragung erblicher spongiformer Enzephalopathien des Menschen auf Primaten (Masters *et al.*, 1981).

Das Mitte der achtziger Jahre des letzten Jahrhunderts massive, sich rasch zu einer Epidemie ausbreitende Auftreten von BSE bei Rindern in Großbritannien (Wilesmith *et al.*, 1988; Anderson *et al.*, 1996) wurde gemeinhin auf die Übertragung von Scrapie auf Rinder in Form von kontaminiertem Tiermehl zurückgeführt. Eine alternative Hypothese geht davon aus, dass

die Epidemie durch Aufarbeitung und Verfütterung von Rindern, welche an einer Form von sporadischer BSE erkrankt waren, ausgelöst wurde (The BSE Inquiry, 2000; Zentek *et al.*, 2002).

Bei zahlreichen weiteren Spezies, wie Großem Kudu, Nyala, Arabischem Spießbock, Säbelantilope, Elanantilope, Bison, Tiger, Gepard, Ozelot, Puma und Hauskatzen, konnten zeitgleich oder nach dem Auftreten von BSE einzelne Fälle von spongiformer Enzephalopathie beobachtet werden - dies deutete darauf hin, dass BSE eine breite Wirtsspezifität hat, was durch erfolgreiche experimentelle Übertragungen auf zahlreiche Säugerspezies, wie z.B. Makaken (Lasmézas *et al.*, 1996) oder Schafe (Houston *et al.*, 2000) bestätigt wurde.

Dem Ausbruch von BSE folgte etwa zehn Jahre später das Auftreten einer neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit („vCJD“ oder „nvCJD“) in Großbritannien (Will *et al.*, 1996) und Frankreich (Chazot *et al.*, 1996; Deslys *et al.*, 1997). Besonderheiten dieser Krankheit sind eine von den klassischen Creutzfeldt-Jakob-Krankheiten abweichende Neuropathologie sowie das auffällig niedrige Durchschnittsalter der Patienten (Ridley & Baker, 1996) von etwa 30 Jahren.

Infektionsstudien zeigten, dass BSE und vCJD, im Gegensatz zu herkömmlichen Prionkrankheiten, identische Transmissionseigenschaften (Bruce *et al.*, 1997; Hill *et al.*, 1997; Scott *et al.*, 1999) und eine nicht voneinander zu unterscheidende molekulare Signatur aufweisen (Priola, 1996; Collinge *et al.*, 1996), was einen direkten Zusammenhang beider Krankheiten nahe legt.

In Großbritannien sind über 180000 bestätigte Fälle von BSE aufgetreten, wobei von einer Gesamtzahl von einer bis zwei Millionen infizierter Rinder ausgegangen wird (Anderson *et al.*, 1996; Donnelly *et al.*, 2002). Das Auftreten von BSE hat sich, wenngleich in deutlich geringerem Ausmaß, auf viele andere Länder weltweit, unter anderem Portugal, Deutschland, Italien, die Niederlande und Japan, ausgeweitet.

Der neuen Variante, vCJD, sind bislang rund 130 Menschen zum Opfer gefallen, wobei der Großteil der Fälle in Großbritannien (über 115 bestätigte Fälle) registriert wurde (Stand Oktober 2002; Quellen: Department of Health, UK www.doh.gov.uk/cjd ; Organic Consumers Association, www.organicconsumers.org).

Zuverlässige Aussagen bezüglich des Infektionsrisikos sowie der zu erwartenden Gesamtzahl an vCJD-Erkrankungen entbehren aufgrund vieler noch ungeklärter Sachverhalte, wie der Länge der Inkubationszeit sowie einer eventuell existierenden genetischen Prädisposition

(Jackson *et al.*, 2001), und einer zu geringen Menge an vorhandenen Daten bislang jeglicher wissenschaftlicher Grundlage.

Die Natur des infektiösen Agens der spongiformen Enzephalopathien ist auch nach vielen Jahren intensiver Forschungsarbeit noch nicht genau bekannt. Die ursprüngliche Annahme, dass es sich bei dem Agens aufgrund der langen Inkubationszeiten um ein langsames Virus handelt (Sigurdsson, 1954), ist aufgrund des fehlenden Nachweises einer viralen Nukleinsäure, bzw. einer immunologischen Reaktion und der bemerkenswerten Resistenz des transmissiblen Agens gegen Nukleinsäure-deaktivierende Behandlungen wie große Hitze, UV-Strahlung, Formaldehyd oder Nukleasen, wissenschaftlich nicht haltbar. Bereits 1966 wurde vermutet, dass das transmissible Agens von Scrapie keine Nukleinsäure enthält (Alper *et al.*, 1966, 1967) - ein Protein wurde als maßgebliche Komponente des infektiösen Partikels vorgeschlagen (Griffith, 1967).

Bolton *et al.* gelang 1982 die Isolierung eines Protease-resistenten Sialoglycoproteins aus Scrapie-infiziertem Hirnhomogenat. Dieses Protein, welches sich im Gehirn betroffener Spezies anreichert und amyloide Ablagerungen bildet (Bendheim *et al.*, 1984; Kitamoto *et al.*, 1986), war der Hauptbestandteil der infektiösen Fraktion. Die Bezeichnung „Prion“ („proteinaceous infectious particle“) wurde vorgeschlagen (Prusiner, 1982), um das infektiöse Agens von Erregern wie Bakterien, Viren oder Viroiden zu unterscheiden. Prionen wurden definiert als „kleine, proteinhaltige, infektiöse Partikel, welche resistent gegenüber Nukleinsäure-modifizierenden Behandlungen sind“ (Prusiner, 1982). Die von Prusiner erstmals 1982 vorgestellte Prion-Hypothese beschreibt einen neuen Übertragungsweg biologischer Information, bei dem eine abnorme, infektiöse Isoform eines zellulären Proteins ihre Information durch Umbildung des normalen, zellulären Pendant überträgt. Die Replikation des transmissiblen Agens, des Prions, wird hierbei nicht durch Nukleinsäuren vermittelt, sondern durch konformationelle Änderung eines endogenen Proteins (Prusiner, 1998).

1.2 Zelluläres Prion-Protein (PrP^C) und die pathogene Isoform PrP^{Sc}

Das zelluläre Prion-Protein (PrP^C) ist ein hochkonserviertes Protein, welches bei Säugetieren (Schätzl *et al.*, 1995; Windl *et al.*, 1995), Vögeln (Gabriel *et al.*, 1992), Reptilien (Simonic *et al.*, 2000), Amphibien (Strumbo *et al.*, 2001) und Fischen (Suzuki *et al.*, 2002) nachgewiesen wurde und möglicherweise von allen Vertebraten exprimiert wird.

Die mRNA von PrP ist bereits während der frühen Phase der Embryogenese im Gehirn nachweisbar (Harris *et al.*, 1993) und der mRNA-Gehalt des Gehirns nimmt mit fortschreitender Entwicklung zu (Manson *et al.*, 1992). Bei ausgewachsenen Individuen wird das Prion-Protein in fast allen Geweben exprimiert (Manson *et al.*, 1992). Im ZNS, insbesondere in Neuronen (Kretzschmar *et al.*, 1986a), ist das Expressionsniveau von PrP^C am höchsten. PrP-Expression findet sich insbesondere auch in Zellen des Immunsystems (Dodelet & Cashman, 1998).

PrP^C durchläuft den sekretorischen Weg eines membranständigen Proteins über den ER/Golgi-Komplex, währenddessen es mehrere posttranslationelle Modifikationen erfährt und mit der Ausbildung mehrerer α -helikaler-Strukturen sowie einer kleinen β -Faltblatt-Struktur und einer Disulfidbrücke (Cys178 - Cys213) im C-terminalen Bereich des Proteins seine korrekte Konformation einnimmt (Abb. 1).

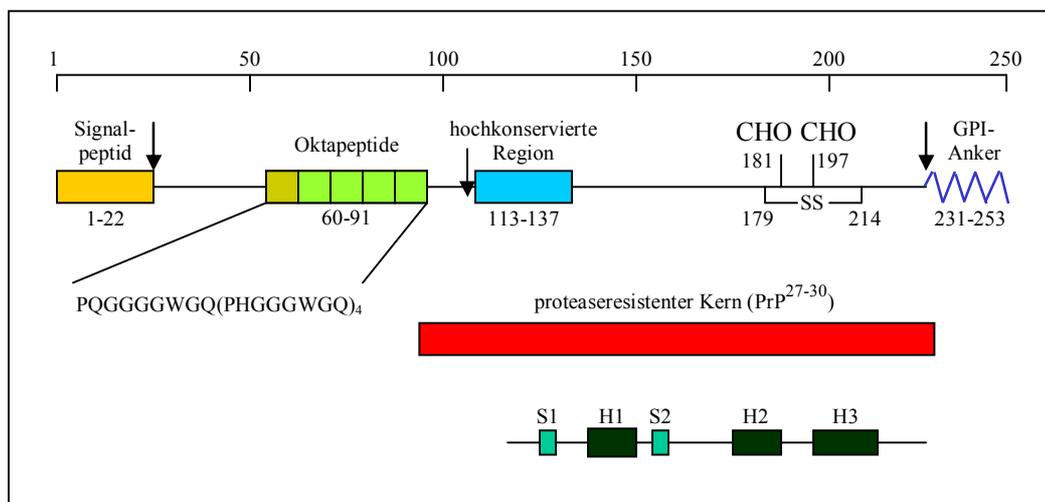


Abb. 1: Strukturelle Charakteristika des humanen Prion-Proteins

Dargestellt sind die zelluläre Isoform (PrP^C), der proteaseresistente Kern von PrP^{Sc} (PrP²⁷⁻³⁰), sowie Charakteristika der sekundären Struktur.

Die Zahlen beziehen sich auf Aminosäurereste.

CHO: Glykosylierungsstellen

SS: Disulfidbrücke

↓: Spaltstellen

H1, H2, H3: α -Helices

S1, S2: β -Faltblattanteile

(modifizierte Abb. nach H. Kretzschmar, 1998)

Die Biogenese von PrP^C beginnt, geleitet durch eine N-terminale Signalsequenz, am Endoplasmatischen Retikulum (ER). Im ER werden an die zwei N-Glykosylierungssequenzen des Proteins (AS-Positionen 181 - 183 und 197 - 199 für humanes PrP) Mannose-Zucker angehängt und PrP^C erhält nach Abtrennung der C-terminalen GPI-Erkennungssequenz einen Phosphatidylinositolglykolipid(GPI)-„Anker“ (Stahl *et al.*, 1987); des Weiteren wird das N-

terminale Signalpeptid abgetrennt. Im Golgi-Apparat erfährt das Prion-Protein anschließend eine Umwandlung der Mannose-Zucker hin zu komplexeren, hybriden Zuckerresten und gelangt schließlich als reifes Molekül an die Zelloberfläche. Neu synthetisiertes PrP^C gelangt innerhalb einer Stunde vom ER an die Oberfläche (Caughey *et al.*, 1989; Borchelt *et al.*, 1990).

Auf der Zelloberfläche liegt der überwiegende Anteil der PrP-Moleküle, verbunden über den GPI-Anker, extrazellulär vor und kann mittels Phospholipasen (z.B. PIPLC) oder Proteasen (z.B. Trypsin) experimentell von der Membran abgetrennt werden (Caughey *et al.*, 1988, 1989, 1991a; Borchelt *et al.*, 1990; Shyng *et al.*, 1993). Die Halbwertszeit von PrP^C liegt zwischen 4 - 6 Stunden (Caughey *et al.*, 1989).

PrP^C wird in unterschiedlich glykosylierten Formen exprimiert, wobei die Glykosylierung Asparagin-gebundenen ist. Die doppelt-glykosylierte Form hat ein Molekulargewicht von 33 - 35 kDa (Oesch *et al.*, 1985). Neben der doppelt-glykosylierten kommt es auch in einer un- sowie einfach-glykosylierten Form vor (Bolton *et al.*, 1985; Endo *et al.*, 1989; Haraguchi *et al.*, 1989). Die glykosylierten Formen enthalten über 50 verschiedene Zucker (DeArmond *et al.*, 1999; Rudd *et al.*, 2001; Pan *et al.*, 2002).

Prion-Proteine besitzen im N-terminalen Bereich Tandem-Wiederholungen eines Peptids, welches Kupferionen binden kann (Hornshaw *et al.*, 1995; Schätzl *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1997; Viles *et al.*, 1999; Wopfner *et al.*, 1999; Kramer *et al.*, 2001). Humanes PrP besitzt vier solcher Wiederholungen einer Sequenz von acht Aminosäuren (Oktapeptid) – diese nehmen den Bereich von AS 60 - 91 ein. Zusätzliche Oktapeptid-Insertionen sind beim Menschen mit einer familiären, vererbaren Form der Prionkrankheiten assoziiert (Goldfarb *et al.*, 1991, 1993; Owen *et al.*, 1990; Cochran *et al.*, 1996; Capellari *et al.*, 1997; Lehmann *et al.*, 1997).

Biochemische Untersuchungen von elektronenmikroskopisch erkennbaren und als Scrapie-assoziierte Fibrillen (SAF) oder „prion rods“ bezeichnete makromolekularen Strukturen in TSE-infizierten Hirngewebspräparationen führten zur Entdeckung des so genannten PrP²⁷⁻³⁰, dessen Bezeichnung sich aus seiner Migration im WesternBlot ableitet (Merz *et al.*, 1981; Bolton *et al.*, 1982). PrP²⁷⁻³⁰ ist der proteaseresistente Kernbereich des krankheitsspezifischen Proteins (PrP^{S^c}), welches, im Gegensatz zum deutlich sensitiveren PrP^C, durch einen definierten Verdau mittels des Enzyms Proteinase K (PK) nicht vollständig degradiert wird (daher wird auch die Bezeichnung PrP-res, für resistent, verwendet).

SAF-angereicherte Präparationen erwiesen sich als hochinfektiös (Prusiner *et al.*, 1983; Diringer *et al.*, 1983). Durch Aufreinigungen infizierter Hirnextakte konnte eine gemeinsame Anreicherung sowohl von PrP²⁷⁻³⁰ als auch der Infektiösität um das mehr als Tausendfache

erreicht werden - dies wurde als Korrelation der Infektiösität mit einer bestimmten Form des Prion-Proteins gedeutet (Prusiner *et al.*, 1983; Gabizon *et al.*, 1988).

Von PrP²⁷⁻³⁰ wurde die NH₂-terminale Aminosäuresequenz bestimmt (Prusiner *et al.*, 1984) und die dazu korrespondierenden Oligonukleotidsonden eingesetzt, um PrP-cDNA-Klone von Hamster (Oesch *et al.*, 1985) und Maus zu identifizieren (Chesebro *et al.*, 1985; Lochter *et al.*, 1986). Die Aminosäuresequenzen von PrP^C und PrP^{Sc} sind völlig identisch. Der mRNA-Spiegel von PrP^C verändert sich im Verlauf einer Scrapie-Infektion kaum und in aufgereinigten Prionpräparationen sind keine PrP-spezifischen Nukleinsäuren auffindbar (Oesch *et al.*, 1985). Der Gehalt an Nukleinsäuren pro Infektionseinheit beträgt weniger als ein Molekül von mindestens 100 bp Länge (Meyer *et al.*, 1991; Kellings *et al.*, 1992, 1993). Des Weiteren konnten zwischen PrP^C und PrP^{Sc} keinerlei Modifikationen durch differierende kovalente Bindungen innerhalb des Proteins festgestellt werden (Stahl *et al.*, 1993). Obwohl mögliche Unterschiede in den komplex arrangierten Glykoformen (Endo *et al.*, 1989; Haraguchi *et al.*, 1989; Stahl *et al.*, 1993; Rudd *et al.*, 1999; Stimson *et al.*, 1999) nicht ausgeschlossen werden können, scheint der essentielle Unterschied zwischen PrP^C und PrP^{Sc} in der Proteinkonformation begründet zu liegen (Pan *et al.*, 1993; Tatzelt *et al.*, 1996).

Strukturanalysen mittels Fourier-Transformations-Spektroskopie ermittelten für PrP^C einen α -helikalen Anteil von ca. 40 % und sehr wenige bis keine β -Faltblattstrukturen (Pan *et al.*, 1993). Durch Untersuchungen der magnetischen Kernresonanzen (NMR) eines sich in Lösung befindlichen PrP^C-Fragmentes (AS 121 - 231) und eines rekombinanten PrPs der Maus (AS 23 - 231) konnte der hohe α -helikale Anteil und der sehr geringe β -Faltblatt-Anteil in der Sekundärstruktur bestätigt werden (Riek *et al.*, 1996, 1997). Weitere NMR-Analysen an rekombinanten Hamster- (Donne *et al.*, 1997; James *et al.*, 1997) sowie humanem PrP (Zahn *et al.*, 1999; Hosszu *et al.*, 1999) zeigten große Übereinstimmungen mit dem PrP^C der Maus.

Im Gegensatz dazu wurde für PrP^{Sc} ein β -Faltblatt-Anteil von ca. 50 % und ein α -Helix-Anteil von nur ca. 20 % beschrieben (Caughey *et al.*, 1991c; Pan *et al.*, 1993; Safar *et al.*, 1993). Die vollständige Aufklärung der posttranslationalen Umwandlung von PrP^C zu PrP^{Sc} konnte noch nicht erbracht werden (Borchelt *et al.*, 1990; Caughey & Raymond, 1991). Bislang ist es nicht gelungen, PrP^{Sc} in eine für die Strukturanalyse obligatorische, gelöste Form zu bringen. Daher ist nicht bekannt, wie PrP^{Sc} auf molekularer Ebene entsteht und nach der Prion-Hypothese als entscheidende Komponente die Konformationsänderung des endogenen PrP^C bewerkstelligt.

Es wurden bislang zwei voneinander abweichende Theorien für die Umfaltung des nativen Proteins in seine pathogene Konformation durch eine bereits umgefaltete Isoform beschrieben (Abb. 2). Das „refolding“- oder „Prusiner-Modell“ schlägt diesbezüglich eine Ent- und anschließende Neufaltung von PrP^{C} unter dem Einfluss von PrP^{Sc} vor, bei der die Überwindung der dazu benötigten, hohen Aktivierungsenergie durch eine Katalyse von bereits existierendem PrP^{Sc} bewerkstelligt wird (Prusiner, 1991). Dieses Modell wurde insoweit noch ausgebaut, als ein zellulärer Faktor, das sog. „Protein X“, und ein metastabiles PrP -Intermediat postuliert wurden und die Bindung von Protein X an PrP , bzw. das metastabile Intermediat der initiale Schritt bei der Entstehung von PrP^{Sc} ist. Beim so genannten „Lansbury-Modell“ (auch als „nucleation“- oder „seeding“- Modell bezeichnet) befindet sich PrP^{C} mit PrP^{Sc} bzw. einem PrP^{Sc} -Vorläufer in einem Gleichgewichtszustand zu Gunsten des stabileren PrP^{C} . Zu einer Stabilisierung und Akkumulation von PrP^{Sc} kommt es nur durch das Vorhandensein eines PrP^{Sc} -Aggregates („seed“), welches aufgrund der Addition von PrP^{Sc} -Molekülen eine fortlaufende Polymerisierung erfährt. Die initiale Bildung des PrP^{Sc} -Aggregates wird dabei als kinetisch kontrolliert und extrem langsam beschrieben; ist jedoch erst einmal ein initiales, stabiles Aggregat entstanden, findet eine schnelle, autokatalytische PrP^{Sc} -Addition und eine Vervielfältigung des pathogenen Agens statt (Jarret & Lansbury, 1993; Come *et al.*, 1993).

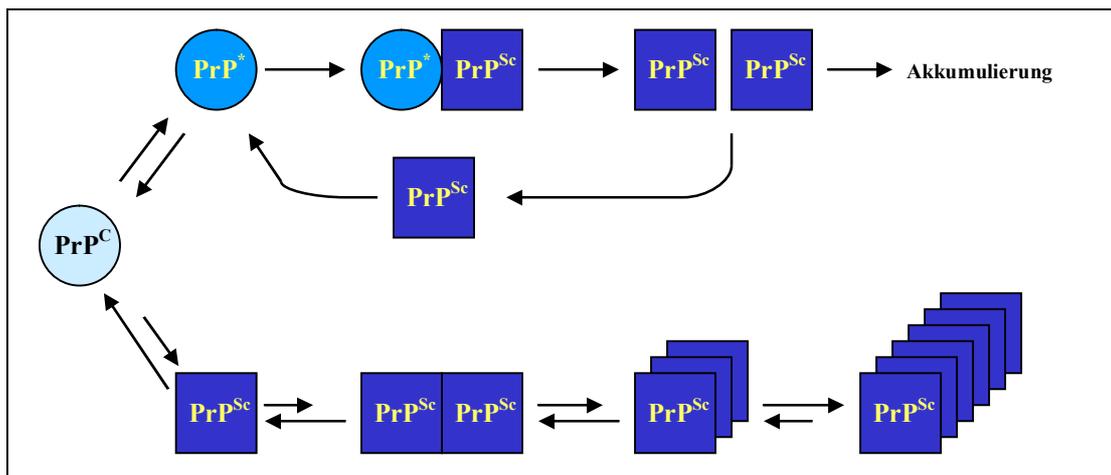


Abb. 2: PrP^{Sc} -Bildung und Akkumulation

Refolding-Modell (oben) und Seeding-Modell (unten)

PrP^* : metastabiles Intermediat

Beide Theorien wurden hinsichtlich ihrer prototypischen Eignung in einer vergleichenden kinetischen Analyse anhand biophysikalischer Kriterien als möglich bzw. gleich wahrscheinlich bewertet (Eigen, 1996). Beide Modelle sind maßgeblich von drei Faktoren

abhängig: die Gesamt-PrP^C-Konzentration, das Gleichgewichts-Verhältnis zwischen der nativen und der selbst-aggregierenden Konformation und die Übereinstimmung der PrP-Moleküle, welche während der Aggregation aufeinandertreffen. Über eine mögliche Korrelation zwischen PrP^{Sc} und Infektiösität im Sinne eines selbstpropagierenden, infektiösen Partikels, ist wenig bekannt. Infektiösität ist nicht zwingend an detektierbares PrP^{Sc} gebunden (Collinge *et al.*, 1995a; Wille *et al.*, 1996; Lasmézas *et al.*, 1997; Shaked *et al.*, 1999). Durch Titrationsversuche wurde ermittelt, dass eine einzelne infektiöse Einheit aus etwa 10⁵ PrP^{Sc}-Molekülen besteht (Bolton *et al.*, 1982). Uneinigkeit besteht darüber, ob ein großes Aggregat für Infektiösität notwendig ist, oder, im anderen Extremfall, bereits ein einzelnes dieser PrP^{Sc}-Moleküle infektiös ist. In reinen *in vitro*-Konversionsexperimenten konnte eine *de novo*-Anreicherung von Infektiösität bislang nicht erreicht werden. In diesen Experimenten wird ein Überschuß an PrP^{Sc} als initiales Aggregat eingesetzt, um rekombinantes PrP^C in eine Protease-resistente Form, PrP-res, zu konvertieren. Die Umwandlung von PrP^C in eine PK-resistente Form ist hierdurch möglich - eine Neubildung infektiöser Einheiten konnte jedoch bislang noch nicht bewiesen werden (Kocisko *et al.*, 1994, 1995; Bessen *et al.*, 1995; DebBurman *et al.*, 1997; Hill *et al.*, 1999a). Dies wurde meist auf eine zu geringe Konversionseffizienz zurückgeführt - eine Begründung, die aufgrund einer in jüngerer Zeit etablierten *in vitro*-Amplifikationsmethode, bei welcher die Bildung von PrP-Aggregaten durch zyklische Sonifizierung stark beschleunigt wird (Saborio *et al.*, 2001), möglicherweise bald widerlegt werden kann. Es ist auch denkbar, dass diese Versuchsansätze nur den initialen Schritt während der Generierung der infektiösen Isoform von PrP simulieren, welche weitere, noch nicht identifizierte Kofaktoren erfordert.

Trotz zahlreicher Versuchsansätze gibt es bezüglich der normalen Funktion von PrP^C bislang nur indirekte Hinweise. Die Lokalisation von PrP^C auf der Oberfläche von Neuronen des ZNS deutet auf eine Aufgabe bei der Zelladhäsion (Stahl *et al.*, 1987; Graner *et al.*, 2000a,b) oder die Beteiligung an der Signalübertragung hin (Kretzschmar *et al.*, 1986; Shmerling *et al.*, 1998; Herms *et al.*, 2000; Mouillet-Richard *et al.*, 2000; Spielhauer & Schätzl, 2001). Die Fähigkeit des Proteins zur Kupferbindung (Hornshaw *et al.*, 1995a,b; Brown *et al.*, 1997; Stöckel *et al.*, 1998) könnte als Hinweis auf eine Rolle in der Kupfer-Homöostase gedeutet werden (Brown *et al.*, 1997; Pauly & Harris, 1998). Das Prion-Protein besitzt möglicherweise Superoxid-Dismutase-Aktivität (SOD) (Brown *et al.*, 1999) und dadurch antioxidative Eigenschaften (Brown *et al.*, 2001).

Transgene Mäuse mit inaktiviertem PrP-Gen, sog. PrP-„knock-out“- oder PrP^{0/0}-Mäuse (Büeler *et al.*, 1992; Manson *et al.*, 1994; Sakaguchi *et al.*, 1995) entwickeln sich normal

ohne Hinweise auf gravierende neuronale Defekte oder Verhaltensstörungen. Die beobachteten Phänotypen beschränken sich auf Veränderungen in der synaptischen Übertragung (Collinge *et al.*, 1994; Whittington *et al.*, 1995; Sakaguchi *et al.*, 1996), dem zirkadianen Aktivitätsrhythmus und Schlafmuster (Tobler *et al.*, 1996, 1997), einer erhöhten Neigung der Mäuse zu Schlaganfällen (Walz *et al.*, 1999) und einer Sensibilisierung gegenüber oxidativem Stress (Brown *et al.*, 2002). Aufgrund der unbefriedigenden Reproduzierbarkeit einiger dieser Befunde ließen sich daraus jedoch keine verlässlichen Rückschlüsse auf die Funktion von PrP^C ziehen (Herms *et al.*, 1995; Lledo *et al.*, 1996).

Der Mangel an phänotypischen Veränderungen wurde darauf zurückgeführt, dass Mäuse, die vom frühesten Stadium der Embryogenese an nicht über PrP^C verfügen, kompensatorische Mechanismen ausbilden (Kühn *et al.*, 1995). Durch Generierung temporaler „knock-out“-Mäuse sollte die Ausbildung von Kompensationsmechanismen für die fehlende PrP-Expression verhindert werden. Hierbei wurden bislang zwei Strategien verfolgt. Tremblay *et al.* entwickelten ein Tetrazyklin-abhängiges Expressionssystem (Gossen & Bujard, 1992), bei welchem sich die Menge an exprimiertem PrP durch Gabe unterschiedlicher Mengen an Tetrazyklin über das Trinkwasser der Mäuse regeln ließ (Tremblay *et al.*, 1998). Ein anderer Ansatz ermöglichte mittels eines Cre-LoxP-Systems (Sauer & Henderson, 1988) das kontrollierte Ausschalten der gesamten PrP-Expression in Mäusen zu einem definierten Zeitpunkt (Mallucci *et al.*, 2002). Mit Ausnahme einer Störung der späten Nachhyperpolarisationsströme (AHPs, afterhyperpolarization potentials) in den Neuronen dieser Cre-LoxP-Mäuse, welche auf eine Involvierung von PrP in die Modulierung der Erregbarkeit von Neuronen hindeutet, lieferten auch diese Versuchsansätze keine endgültigen Hinweise auf die Funktion von PrP^C.

1.3 Genetik und Epidemiologie

Das Prion-Protein-Gen des Menschen (*PRNP*) befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 20, das der Maus (*Prnp*) auf der korrespondierenden Region von Chromosom 2. Der offene Leserahmen aller bisher bekannten Prion-Protein-Gene befindet sich innerhalb eines Exons, so dass die Möglichkeit eines alternativen RNA-Spleißens zur Entstehung von PrP^{Sc} ausgeschlossen werden kann (Basler *et al.*, 1986; Westaway *et al.*, 1987; Gabriel *et al.*, 1992). Die vom PrP-Gen transkribierte mRNA ist 2,1 bis über 4 kb groß. PrP-cDNAs kodieren für Prion-Proteine von 253 (Mensch), bzw. 254 Aminosäuren (Maus und Hamster)

Länge, unabhängig davon, ob sie von einem infizierten oder nicht-infizierten Individuum stammen (Oesch *et al.*, 1985; Chesebro *et al.*, 1985; Basler *et al.*, 1986; Lochter *et al.*, 1986; Kretzschmar *et al.*, 1986b).

Bei Säugetieren sind bislang die PrP-Gene von über 70 Arten analysiert worden (Schätzl *et al.*, 1995; Wopfner *et al.*, 1999). Innerhalb der untersuchten Säugetiere ergaben sich für das zellulär prozessierte PrP (ohne dabei Polymorphismen zu berücksichtigen) AS-Homologien von 84,7 – 99,6 %.

Dieser hohe Grad der Konservierung findet sich auch in die Expression regelnden Promotor des PrP-Gens, welcher keine TATA-Box enthält und Ähnlichkeiten mit sog. „Housekeeping-Genen“ zeigt. Bemerkenswerterweise treten an jenen Positionen des Prion-Proteins, die beim Menschen von krankheitsauslösenden Mutationen sowie bei Mensch, Schaf und Maus von Polymorphismen betroffen sind, keine Interspezies-Variationen auf (Schätzl *et al.*, 1995). Gleiches gilt für funktionelle Positionen wie z.B. die Glykosylierungs-Stellen, die Disulfid-Brücke und die Aminosäure Serin an Position 230/231, welche als Anheftungsstelle für den GPI-Anker fungiert. Auf die im Bereich von AS 90 - 100 zwischen den verschiedenen Spezies sehr variable Region folgt der am besten konservierte Bereich: in allen untersuchten Säuger-PrPs sind AS 113 - 137 identisch; Teile dieser Region sind sogar zwischen Säugern und Vögeln konserviert. Die außergewöhnliche Homologie dieser Region sowie der allgemein sehr hohe Grad der Konservierung des PrP-Gens werden als Indizien für eine wichtige biologische Funktion des zellulären Prion-Proteins betrachtet (Shmerling *et al.*, 1998).

Prionkrankheiten des Menschen können idiopathischen, erworbenen oder hereditären Ursprungs sein. CJD tritt in den meisten Fällen (80 - 90 %) sporadisch auf – in diesen Fällen ist weder die Infektionsquelle noch der Modus der Krankheitsentstehung bekannt (idiopathisch). Zu den erworbenen Prionkrankheiten zählt man neben Kuru und vCJD auch durch iatrogene, d.h. im Rahmen ärztlicher Tätigkeiten akzidentell erfolgte, Übertragungen verursachte Krankheitsfälle. Die Übertragungen erfolgten unter anderem über kontaminierte chirurgische Operationsinstrumente, durch die Im- bzw. Transplantation infektiöser Gewebe (Dura mater, Cornea) und durch Injektionen kontaminierter hypophysärer Hormone (Brown, 1988; Cochius *et al.*, 1992; Farrington, 1995; Gibbs *et al.*, 1985; Hogan *et al.*, 1995; Koch *et al.*, 1985; Tintner *et al.*, 1986; Weber *et al.*, 1993).

Die familiäre CJD (fCJD), das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) und die tödliche familiäre Schlaflosigkeit (FFI, „fatal familial insomnia“) bilden die Gruppe der

vererbaren Formen humaner TSEs, welche zusammen etwa 10 % der gesamten Erkrankungsfälle von Prionkrankheiten ausmachen. Diese Krankheiten werden mit nahezu vollständiger Penetranz autosomal-dominant vererbt. Bislang konnten in allen untersuchten Fällen erblicher Prionerkrankungen Punktmutationen oder Insertionen im Prion-Protein-Gen des Menschen (*PRNP*) identifiziert werden (Abb. 3).

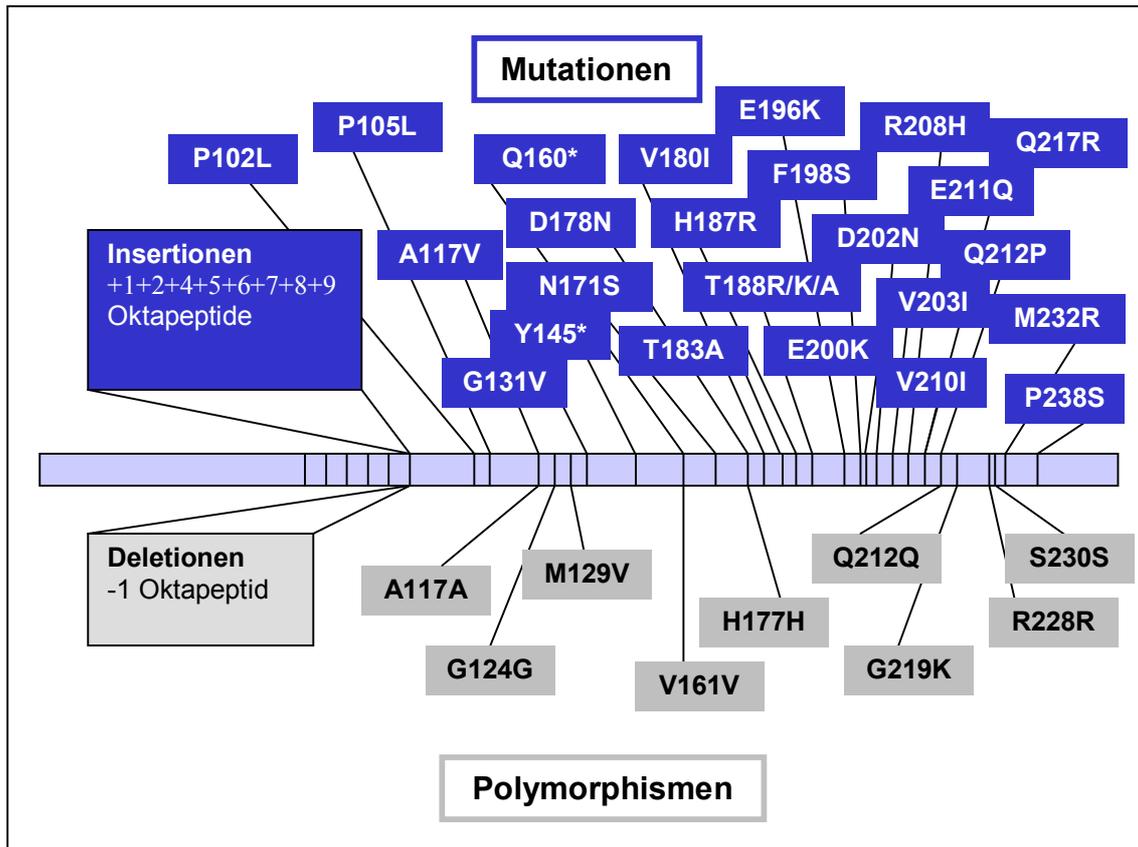


Abb. 3: Erbliche Prionerkrankungen des Menschen
Mutationen und Polymorphismen von humanem PrP^C

Die bisher gefundenen, Krankheits-assoziierten Mutationen befinden sich, mit Ausnahme der Insertmutationen der Oktapeptidregion, im zentralen und C-terminalen Bereich von PrP und führen entweder zum Austausch einzelner Aminosäuren oder zu Kettenabbrüchen (Kretzschmar & Windl, 1998).

Das Auftreten der BSE im Jahre 1986 und die Befürchtung einer durch ihre Übertragung auf den Menschen drohenden Epidemie gab Anlass für europaweite epidemiologische Untersuchungen. Die bei Aminosäure-Sequenzierungen des *PRNP*-Gens von vCJD-Opfern gemachte Entdeckung, dass alle bislang erfassten Fälle an der polymorphen Aminosäureposition 129 homozygot für Methionin waren (Collinge *et al.*, 1996; Hill *et al.*,

1999b), zeigt, dass nicht nur bei familiären, sondern auch bei übertragenen Prion-Krankheiten genetische Faktoren von entscheidender Bedeutung sind und belegt die Unerlässlichkeit genetischer Analysen für ein umfassendes Verständnis von Prion-Krankheiten.

1.4 Pathogenese der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien

Neuropathologische Kennzeichen aller TSEs sind in unterschiedlich starkem Maße auftretende schwammartige Läsionen, Nervenzellverluste, Astrogliose und Ablagerungen von Prion-Protein im Gehirn.

Zahlreiche Hypothesen versuchen den Mechanismus, welcher zum neuronalen Zellverlust führt, zu erklären. Einige Studien kommen zu dem Schluss, dass PrP^C eine Rolle innerhalb der Regulierung von Apoptose spielen könnte und dass eine Störung des normalen zellulären PrP-Gehaltes zum Zelltod führt (Kurschner & Morgan, 1995, 1996). Im neuronalen Gewebe von Scrapie-infizierten Maushirnen lassen sich apoptotische Zellen nachweisen (Giese *et al.*, 1995+1998; Williams *et al.*, 1997). Die Expression von zellulärem PrP^C ist für die Entstehung von Prion-Krankheiten essentiell. Dies konnte durch transgene Mäuse, welche aufgrund einer homozygoten Zerstörung des endogenen PrP-Gens (*Prnp*^{0/0}) kein PrP^C exprimieren, nachgewiesen werden – PrP^C-defiziente Mäuse sind resistent gegenüber TSEs (Büeler *et al.*, 1993). Für PrP^{Sc} wurden direkte neurotoxische Effekte postuliert (Forloni *et al.*, 1993; Tagliavini *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1994). Es gibt jedoch auch zahlreiche Hinweise, die gegen eine direkte Neurotoxizität von PrP^{Sc}, bzw. Prionen sprechen. Bei manchen Prionkrankheiten sind nur geringe Mengen oder überhaupt kein PrP^{Sc} detektierbar (Medori *et al.*, 1992; Collinge *et al.*, 1995a; Hsiao *et al.*, 1990; Lasmézas *et al.*, 1997). In Mäusen mit verringerter zellulärer PrP^C-Expression (*Prnp*-hemizygote Mäuse oder *Prnp*^{0/+}) sind nach Prion-Infektion sehr große Mengen PrP^{Sc} nachweisbar – trotzdem haben diese Mäuse eine um mehrere Monate längere Inkubationszeit als Mäuse mit natürlichem PrP^C-Expressionsniveau (*Prnp*^{+/+}) (Büeler *et al.*, 1994). Umgekehrt zeigen Mäuse mit erhöhter zellulärer PrP^C-Expression nach Inokulation mit Mäuseprionen zwar verkürzte Inkubationszeiten, aber nur geringe Mengen an nachweisbarem PrP^{Sc} (Fischer *et al.*, 1996). Nach Implantation von stark PrP^{Sc}-haltigem Gewebe in das Gehirn („brain graft“) von PrP^C-defizienten Mäusen (*Prnp*^{0/0}) kommt es zu keinen Schädigungen der angrenzenden Gewebe (Brandner *et al.*, 1996).

Die Prion-Hypothese proklamiert eine gänzlich neue Klasse von Infektionserregern, in welcher das pathologische Prion-Protein (PrP^{Sc}) selbst den Hauptbestandteil des infektiösen

Agens darstellt. Für die Richtigkeit dieser Hypothese fehlt bislang allerdings der letzte Beweis. Offen bleibt die Frage, wie ein- und dasselbe Protein ganz verschiedene Krankheitssymptome hervorrufen kann. Bereits 1961 stellten Pattison und Millson fest, dass Scrapie bei Ziegen mit deutlich unterschiedlichen Erkrankungsformen einhergehen kann. In verschiedenen Prion-infizierten Tieren der gleichen Spezies treten multiple Isoformen, sog. Prionen-„Stämme“ auf. Diese Erregerstämme lassen sich durch ihre biologischen Eigenschaften voneinander unterscheiden: nach experimenteller Infektion zeigen sie unterschiedliche Inkubationszeiten, verursachen definierte PrP^{Sc}-Verteilungsmuster (Läsionsprofile) im Gehirn und zeigen Unterschiede in der klinischen Symptomatik (Fraser & Dickinson, 1968; Dickinson & Meikle, 1971; Kimberlin *et al.*, 1986, 1989; Kitamoto *et al.*, 1990; Bruce *et al.*, 1992; DeArmond *et al.*, 1993).

Auch auf molekularer Ebene finden sich bei den verschiedenen Stämmen spezifische Unterschiede (Safar *et al.*, 1998). Die Übertragung der TME („transmissible mink encephalopathy“) auf Hamster führte zu zwei verschiedenen Stämmen, „hyper“ und „drowsy“. Diese gingen mit unterschiedlichen PrP^{Sc}-Formen einher, welche nach einem limitierten PK-Verdau gelelektrophoretisch nachweisbar waren (Bessen & Marsh, 1992, 1994) und auf unterschiedliche Proteinkonformationen von „hyper“- und „drowsy“-PrP^{Sc} hindeuten. Vergleichbare Eigenschaften fanden sich bei verschiedenen Prion-Isolaten, von Schafen, Mäusen und auch des Menschen. So konnte bei transgenen Mäusen, die genetisch identisch waren, nach einer Infektion mit verschiedenen humanen Prionen die Bildung von PrP^{Sc}-Molekülen gezeigt werden, die nach PK-Verdau den PrP^{Sc}-Moleküle des Inokulats entsprachen (Telling *et al.*, 1996). Eine besondere Bedeutung erfuhren solche Analysen bei der Untersuchung der PrP^{Sc}-Muster aus Hirnpräparationen Verstorbener, die entweder von sporadischer bzw. iatrogener CJD oder der neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit betroffen waren. Durch einen Vergleich der Größe nach PK-Verdau sowie des quantitativen Verhältnisses der un-, einfach- und zweifach glykosylierten Prion-Proteine zueinander, konnten Unterschiede mittels WesternBlot-Analysen festgestellt und eine Typisierung der PrP^{Sc}-Moleküle vorgestellt werden (Collinge *et al.*, 1996; Parchi *et al.*, 1996, 1997, 1999; Wadsworth *et al.*, 1999). Es zeigte sich, dass das PrP^{Sc}-Muster der neuen Variante sich zwar von denen der anderen CJD-Formen unterschied, jedoch eine Übereinstimmung mit dem PrP^{Sc}-Muster BSE-infizierter Tiere (Rinder, Makaken und Katzen) aufwies, welches als ein Indiz für die Entstehung von vCJD aus der Übertragung von BSE auf den Menschen angesehen wurde (Collinge *et al.*, 1996).

Der Einfluss der sog. „Speziesbarriere“ auf die Übertragbarkeit und Pathogenese der TSEs konnte durch zahlreiche Studien mit transgenen Tieren näher beschrieben werden. Der Begriff „Speziesbarriere“ beschreibt dabei das Phänomen, dass die Übertragung einer TSE zwischen verschiedenen Spezies oft nur eingeschränkt möglich ist und mit verlängerten Inkubationszeiten bei der Erstübertragung auf eine neue Spezies einhergeht. Die Hauptdeterminante bei der Kodierung der Speziesbarriere ist die Aminosäure-Ähnlichkeit der Prion-Proteine (PrP-Aminosäuresequenz-Homologie) von Donor- und Empfänger-Spezies (Prusiner, 1997; Scott *et al.*, 1989, 1993). Wird das infektiöse Agens in der Empfänger-Spezies weiter passagiert, geschieht dies in der Regel mit einer weitaus höheren Effizienz und konstanten Inkubationszeiten.

In transgenen Mäusen, welche neben Maus-PrP^C auch Hamster-PrP^C exprimieren, konnte die bezüglich der Infektion mit bestimmten Hamster-Prionen existierende Speziesbarriere aufgehoben werden (Scott *et al.*, 1989; Prusiner *et al.*, 1990). Diese Mäuse zeigten nach intrazerebraler Inokulation mit Hamster-Prionen die speziesspezifische Neuropathologie und die Bildung neuer Hamster-Prionen. Infektion dieser transgenen Mäuse mit Maus-Prionen führte zu einer für die Maus charakteristischen Neuropathologie und zu Inkubationszeiten, die denen nicht transgener Mäuse entsprach.

Dass der Infektionsvorgang jedoch einzig von der Homologie des umzufaltenden PrP^C abhängig ist, wurde durch die Beobachtung in Frage gestellt, dass die Synthese von humanem PrP in transgenen Mäusen auch bei vielfacher Überexpression keinen Effekt auf die Speziesbarriere zwischen Maus und Mensch bei einer Infektion mit humanen Prionen zu haben scheint. Erst die Expression eines Chimären-Transgens, welches im zentralen Teil für die humane und an den Enden für die murine PrP-Sequenz kodiert, erhöhte die Empfänglichkeit dieser transgenen Mäuse für humane Prionen erheblich und wurde als Indiz für die Notwendigkeit eines zusätzlichen, bislang nicht identifizierten, zellulären Faktors (auch als „Protein X“ bezeichnet) bei der Umfaltung von PrP^C zu PrP^{Sc} gedeutet (Telling *et al.*, 1995; Kaneko *et al.*, 1997; Cohen *et al.*, 1998; Prusiner *et al.*, 1998). Möglicherweise fungiert Protein X als Chaperon und bindet dabei eventuell an eine Bindungsstelle, welche von den AS 168, 172, 215 und 219 des Prionproteins gebildet wird. Selektive Substitution einer dieser Aminosäuren resultiert in einer dominant-negativen Inhibition der PrP^{Sc}-Formation (Kaneko *et al.*, 1997; Zulianello *et al.*, 2000). Im NMR-Modell sind diese vier Aminosäuren eng benachbart und bilden dadurch möglicherweise ein Epitop. Weitere wichtige Positionen scheinen die AS 184, 186, 203 und 205 zu sein (Scott *et al.*, 1997).

Zur Erforschung der interzellulären Übertragungswege von Prionen wurde *Prnp*-überexprimierendes, nicht-infektiöses Nervengewebe in das Gehirn von *Prnp*^{0/0}-Mäusen implantiert. Intrazerebrale Inokulation mit Scrapie-Prionen resultierte in einer starken Akkumulation von PrP^{Sc}, der Anreicherung von Infektiösität und den für Scrapie charakteristischen, pathologischen Veränderungen innerhalb des Implantats. Es kam zwar zur Diffusion von PrP^{Sc} in das umgebende, PrP^C-freie Gewebe; eine PrP^{Sc}-Anreicherung konnte dort jedoch nicht nachgewiesen werden (Brandner *et al.*, 1996a).

Eine Infektionsausbreitung entlang der Nervenbahnen des ZNS erfolgt nur bei Anwesenheit von PrP^C. *Prnp*^{0/0}-Mäuse, die ein PrP-exprimierendes Implantat aus Nervengewebe im Gehirn trugen, wurden intraokular mit Scrapie-Prionen inokuliert. Diese Mäuse entwickelten, im Gegensatz zu Wildtyp-Kontrollmäusen, keinerlei neuropathologische Anzeichen einer TSE bzw. Akkumulationen von PrP^{Sc}. Die Übertragung der Scrapie-Infektion auf das Implantat entlang PrP^C-freier Zellen des ZNS wurde nicht erreicht (Brandner *et al.*, 1996b). Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass eine extrazelluläre Exposition von PrP^{Sc} allein für die Entstehung bzw. Verbreitung der TSE-spezifischen Pathologie nicht ausreicht. Hierfür scheint die nur bei Expression von endogenem PrP mögliche Neubildung von PrP^{Sc} essentiell zu sein.

In vielen tierexperimentellen Studien erwies sich die intrazerebrale Prionen-Inokulation als der effektivste Verbreitungsweg von TSEs. BSE und vCJD, aber auch andere Prionkrankheiten wie Kuru oder iatrogen übertragene CJD, werfen die Frage auf, wie die Invasion der Prionen aus der Peripherie nach oraler oder intraperitonealer Exposition ins ZNS verläuft. Es konnte gezeigt werden, dass die Übertragung der Prionen nach einer peripheren Inokulation mit großer Wahrscheinlichkeit über Zellen des lymphoretikulären Systems stattfindet (Kitamoto *et al.*, 1991; Lasmézas *et al.*, 1996b). Wurden immundefiziente Mäuse intraperitoneal mit Scrapie-Prionen inokuliert, so reagierten zwar Mäuse, deren T-Lymphozyten-Funktion zerstört war, mit der Ausbildung der TSE, nicht jedoch Tiere, die einen B-Lymphozyten-Defekt aufwiesen. Auf Grund der Notwendigkeit dieses Zelltyps bei der Ausbildung der Krankheit wurde den differenzierten B-Lymphozyten zunächst eine entscheidende Rolle bei der Neuroinvasion des infektiösen Agens zugesprochen (Klein *et al.*, 1997). Nachdem aber gezeigt wurde, dass eine Neuroinvasion auch mit PrP^C-defizienten B-Zellen möglich ist, muß man davon ausgehen, dass dieser Zelltyp eher eine indirekte Rolle beim Transfer der Prionen von der Peripherie zum ZNS einnimmt (Klein *et al.*, 1998). Dass zelluläres PrP^C überhaupt in diversen Blutzellen synthetisiert wird, konnte anhand humaner PBMCs („peripheral blood mononuclear cells“) gezeigt werden, die eine PrP-Expression in

B- und T-Lymphozyten, Monozyten und Dendritenzellen aufweisen (Dürig *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001).

Als möglicher Interaktionspartner von PrP^{Sc} wurde die in Blut nachweisbare Protease-Vorstufe Plasminogen beschrieben (Fischer *et al.*, 2000). Anhand von WesternBlot-Analysen und *in vitro*-Assays konnte gezeigt werden, dass Plasminogen selektiv sowohl PrP^{Sc} als auch Infektiösität bindet, jedoch nicht mit der zellulären Isoform, PrP^C, interagiert. Plasminogen ist der bislang einzige bekannte endogene Faktor, der eine Unterscheidung zwischen PrP^C und PrP^{Sc} ermöglicht, und somit möglicherweise von diagnostischem Nutzen sein könnte.

Hoffnungen auf eine verbesserte *in vivo*-Frühdiagnostik entstanden durch den Nachweis einer PK-resistenten Isoform von PrP im Urin TSE-betroffener Hamster, Rinder und Menschen (Shaked *et al.*, 2001). Bei den infizierten Hamstern gelang dieser Nachweis lange vor dem Auftauchen klinischer Anzeichen. Weitere Studien, welche diesen Befund bestätigen, stehen bislang (Stand: September 2002) jedoch noch aus.

Aufsehen erregte eine neu veröffentlichte Studie, in welcher erstmals Prionen im Skelettmuskelgewebe von infizierten Mäusen nachgewiesen wurden (Bosque *et al.*, 2002). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch eine Replikation von Prionen im Muskelgewebe stattfinden kann. Ungeklärt blieb allerdings die Frage, ob auch eine orale Inokulation zur Anreicherung und Replikation von Prionen in Muskelgewebe führt.

Die Pathogenese der familiären Prionkrankheiten wird im Rahmen der Prion-Hypothese dahingehend interpretiert, dass durch die Mutationen im *PRNP*-Gen eine α -Helix destabilisiert wird und dadurch „instabilere“ Prion-Proteine entstehen, die mit einer geringeren Aktivierungsenergie leichter in eine oder mehrere pathogene Formen übergehen und eine autokatalytische Kettenreaktion auslösen können. In Zellkulturstudien konnte für eine ganze Reihe von Mutationen, die mit vererbaren Formen humaner Prionkrankheiten assoziiert sind, biochemische Eigenschaften der PrP-Mutanten beschrieben werden, die charakteristisch für PrP^{Sc} sind, wie erhöhte PK-Resistenz oder verringerte Detergenz-Löslichkeit (Rogers *et al.*, 1993; Lehmann & Harris, 1995, 1996a, 1996b, 1997; Petersen *et al.*, 1996; Daude *et al.*, 1997; Priola & Chesebro, 1998; Zanusso *et al.*, 1999; Lorenz *et al.*, 2002).

Allerdings liegen zahlreiche humanpathogene Mutationen außerhalb der vorgeschlagenen α -Helices von PrP^C, was eine α -Helix-destabilisierende Wirkung schwer vorstellbar macht und bei einigen Prionkrankheiten kann Neurodegeneration ohne das Auftreten von detektierbarem PrP^{Sc} beobachtet werden, was die Suche nach anderen Auslösern als PrP^{Sc} für die

Pathogenese angeregt hat (Brown *et al.*, 1994; Tateishi *et al.*, 1990, 1995; Tateishi & Kitamoto 1995; Tateishi 1996; Collinge *et al.*, 1995a; Hayward *et al.*, 1994).

Weitere Aspekte der PrP-Expression, wie Faltung und Transport, spielen eventuell bei den pathophysiologischen Mechanismen, welche schließlich zur Krankheit führen, eine wichtige Rolle. Studien mittels Zell-freier Translationssysteme zur Erforschung der Translokation von PrP^C an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) haben gezeigt, dass PrP, im Gegensatz zu den meisten Glykoproteinen, nicht in einer einzigen Orientierung relativ zur ER-Membran gebildet wird, sondern in mehreren topologischen Formen vorkommt (Hay *et al.*, 1987a,b; Yost *et al.*, 1990; Lopez *et al.*, 1990). Die meisten PrP^C-Moleküle sind komplett im ER-Lumen lokalisiert und nur durch den GPI-Anker mit der ER-Membran verbunden. Diese Fraktion repräsentiert die sekretorische (^{Sec}PrP), an die Zelloberfläche transportierte Form von PrP^C. Neben ^{Sec}PrP können noch zwei weitere Topologieformen von PrP^C nachgewiesen werden, ^{Ctm}PrP und ^{Ntm}PrP, welche die ER-Membran in unterschiedlicher Orientierung durchdringen (Abb. 4).

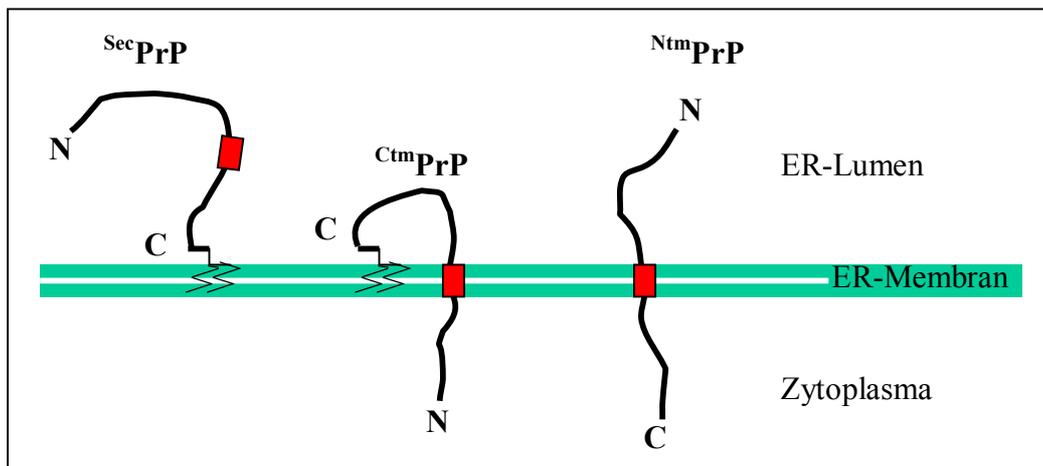


Abb. 4: Topologieformen von PrP^C an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums

 : GPI-Anker  : transmembraner Bereich

In vitro-Versuche haben ergeben, dass bei bestimmten Mutationen vermehrt ^{Ctm}PrP auftritt. Auch in transgenen Mäusen konnten Hegde *et al.* einen Zusammenhang zwischen verschiedenen, die Neigung zur Bildung von ^{Ctm}PrP erhöhenden Mutationen und deren Fähigkeit, neurodegenerative Erkrankungen auszulösen, nachweisen (Hegde *et al.*, 1998). Außerdem ergaben sich Hinweise darauf, dass es bei diesen Mäusen im Verlauf einer Scrapie-

Infektion zu einer starken Erhöhung des Ctm PrP-Anteils kommt (Hegde *et al.*, 1999). Die bislang identifizierten Ctm PrP-begünstigenden Mutationen liegen ausnahmslos innerhalb der angenommenen transmembranen, hydrophoben Domäne (AS 110 - 135) von PrP (De Fea *et al.*, 1994; Hegde *et al.*, 1998). Hierzu zählt auch die humanpathogene, GSS verursachende Mutation A117V (Doh-ura *et al.*, 1989; Hsiao *et al.*, 1991).

Peptide, welche große Bereiche der angenommenen transmembranen Domäne von PrP beinhalten (PrP105 - 132 und PrP118 - 135), induzieren den Tod kortikaler Neurone (Haik *et al.*, 2000). Dieser Effekt tritt erstaunlicherweise nicht nur bei *Prnp*^{+/+}-, sondern auch bei *Prnp*^{0/0}-Mäusen auf, was auf die Existenz eines alternativen, PrP^C-unabhängigen neurotoxischen Mechanismus hindeutet. Die nach Applikation der Peptide PrP105 - 132 und PrP118 - 135 beobachtete Neurotoxizität basiert vermutlich auf der stark ausgeprägten Neigung dieser Peptide, durch Insertion in die Zellmembran die Funktionalität der Lipid-Doppelschicht zu beeinträchtigen (Pillot *et al.*, 1997; Salmona *et al.*, 1997). Dieser Mechanismus entspricht mit großer Wahrscheinlichkeit dem der transmembranen Insertion von Ctm PrP in die Plasmamembran. Sowohl die Peptidbefunde als auch *in vivo*-Versuche deuten darauf hin, dass die Bildung von Ctm PrP bei einer Reihe Prion-induzierter Neurodegenerationen eine Schlüsselrolle spielt (Hegde *et al.*, 1998, 1999; Haik *et al.*, 2000; diese Arbeit).

1.5 Zellbiologie von PrP^C und PrP-Mutanten

Das Prion-Protein verbleibt nach seiner Synthese nicht permanent an der Zelloberfläche, sondern unterliegt einem konstitutiven zellulären Zyklus, dem sog. „recycling pathway“, zwischen Plasmamembran und einem intrazellulären Kompartiment (Shyng *et al.*, 1993). Durch Iodinierungs- und Biotinylierungsversuche konnte die Aufnahme von PrP^C ins Zellinnere sowie der erneute Transport zur Zelloberfläche gezeigt werden (Lehmann *et al.*, 1999). Ein PrP^C-Molekül verbleibt mit einer Halbwertszeit von etwa 20 Minuten an der Zelloberfläche und folgt dann wiederholt dem etwa 60 Minuten dauernden Kreislauf durch die Zelle (Taraboulos *et al.*, 1992).

Innerhalb seines normalen Metabolismus unterliegt ein geringer Teil der synthetisierten PrP^C-Moleküle posttranslationalen Spaltungen. Eine dieser Spaltungen findet innerhalb des GPI-Ankers statt und löst das Protein von der Zellmembran ab (Borchelt *et al.*, 1993). Die zelluläre Lokalisation dieser Spaltung ist nicht bekannt, wahrscheinlich ist jedoch, wie bei

anderen GPI-verankerten Proteinen, eine an der Zelloberfläche lokalisierte Phosphatase dafür verantwortlich (Low, 1989). Diesem Prozeß unterliegen etwa 10 % der PrP^C-Moleküle (Caughey *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1995; Taraboulos *et al.*, 1992).

Die zweite Spaltung ist proteolytischer Natur und findet innerhalb der zentralen Region des Prion-Proteins statt (Pan *et al.*, 1992; Harris *et al.*, 1993; Jiménez-Huete *et al.*, 1998). Durch N-terminale Sequenzierung des C-terminalen Spaltproduktes wurde die Spaltstelle des humanen PrP^C zwischen Aminosäure 110 bis 112 determiniert (Chen *et al.*, 1995). Über den zellulären Ort dieser Spaltung gibt es widersprüchliche Aussagen. Die Inhibierung der Spaltung durch lysosomotrophe Amine, Leupeptin und Brefeldin A deutet darauf hin, dass diese in einem sauren Kompartiment innerhalb der Zelle stattfindet (Caughey, 1991). Die Ergebnisse anderer Versuchsansätze favorisieren Cholesterol-reiche Domänen der Plasmamembran als Ort der Spaltung (Taraboulos *et al.*, 1995). Während jedem Durchlaufen des „recycling pathways“ werden 1 - 5 % der Moleküle proteolytisch gespalten (Shyng *et al.*, 1993). Das N-terminale Spaltprodukt wird freigesetzt und das C-terminale Spaltprodukt verbleibt an der Zelloberfläche und wird nur äußerst langsam wieder internalisiert (Shyng *et al.*, 1995). Die physiologische Bedeutung der zellulären Spaltung des Prion-Proteins ist bislang ungeklärt. Das N-terminale Spaltprodukt von etwa 10 kDa, welches die kupferbindenden Oktapeptidregion enthält, könnte einen biologisch aktiven Liganden mit Signalfunktion darstellen. Alternativ dazu könnte die Spaltung auch zur Regulation der physiologischen Funktion des Proteins dienen. Es ist auch nicht ausgeschlossen, dass die zelluläre Spaltung des Prion-Proteins Teil der Degradation des Proteins ist, da der PrP^C-Katabolismus weitestgehend unbekannt ist.

Der zelluläre Ort der postulierten Interaktion zwischen PrP^C und PrP^{Sc} konnte bislang nicht zweifelsfrei identifiziert werden. Die Interaktion findet mit großer Wahrscheinlichkeit erst nach dem Verlassen des ER und der Passage des mid-Golgi statt, was durch Einsatz spezifischer Inhibitoren dieser Zellkompartimente demonstriert werden konnte (Taraboulos *et al.*, 1990, 1992; Caughey *et al.*, 1991b). Durch biochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden sogenannte „rafts“ bzw. Glykolipid-reiche Mikrodomänen oder CLDs („caveolae-like domains“) als potentielle Domänen der PrP^C-Umwandlung zu PrP^{Sc} identifiziert. Die anschließende Akkumulation von PrP^{Sc} entlang eines endozytotischen Transportweges konnte sowohl in CLDs als auch in Lysosomen und sogn. „späten“ Endosomen nachgewiesen werden (Caughey *et al.*, 1991b; McKinley *et al.*, 1991; Borchelt *et al.*, 1992; Laszlo *et al.*, 1992; Taraboulos *et al.*, 1992, 1995; Arnold *et al.*, 1995; Harmeý *et al.*, 1995; Vey *et al.*, 1996).

Um Hinweise auf die für die Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} bedeutsamen Sequenzmotive zu bekommen, wurden unterschiedlichste PrP-Mutanten generiert. Zum einen wurden Mutationen in die Bereiche von PrP eingefügt, welche mit großer Wahrscheinlichkeit in die Ausbildung von Sekundärstrukturen involviert sind. Prion-Proteine, die Deletionen in α -helikalen Bereichen aufwiesen bzw. aufgrund definierter Zerstörung der Konsensusmotive keine Disulfidbrücke mehr ausbilden konnten, verloren ihre Fähigkeit, PK-resistentes PrP in Scrapie-infizierten Neuroblastomzellen (ScN2A) zu bilden (Muramoto *et al.*, 1996; Yanai *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu zeigten Deletionen in nicht bzw. kaum strukturierten Bereichen von PrP keinerlei Auswirkungen auf die Umwandelbarkeit von PrP^C zu PrP^{Sc}. So führte sowohl die Deletion der Aminosäuren 23 - 88 als auch das Entfernen der GPI-Erkennungssequenz (Aminosäuren 231 - 254) von Maus-PrP in ScN2a-Zellen zu PK-resistentem PrP (Rogers *et al.*, 1993). In transgenen Studien mit PrP-, „knockout“-Mäusen konnte gezeigt werden, dass durch die Einbringung verkürzter PrPs, denen die Aminosäuren 69 - 84 und 32 - 80 (Fischer *et al.*, 1996) bzw. 32 - 93 (Flehsig *et al.*, 2000) fehlten, die Empfänglichkeit für Scrapie wieder hergestellt werden konnte und es nach einer Prion-Infektion zur Akkumulation von PrP^{Sc} in den Hirnen der Tiere kam. Aus diesen Daten wurde gefolgert, dass der Amino-proximale Bereich des reifen Prion-Proteins für die Bildung von PrP^{Sc} bzw. die Entstehung von TSEs nicht von Bedeutung zu sein scheint. Der Bereich von AS 90 - 121, d.h. der C-terminale Teil des unstrukturierten Bereiches von PrP^C, hingegen scheint sowohl für die *in vitro*-Aggregation (Stöckel & Hartl, 2001) als auch für die Bildung von PrP^{Sc} *in vivo* (Shmerling *et al.*, 1998) essentiell zu sein.

Um die Prozessierung von mutiertem PrP mit der von wt-PrP vergleichen zu können, wurden Zellkultur-Studien durchgeführt. Bei einigen humanpathogenen PrP-Mutationen, wie Y145X oder D178N, wurde eine Proteasomen-vermittelte Degradierung beschrieben, welche auf gestörte post-translationelle Prozessierung zurückzuführen ist (Zanusso *et al.*, 1999; Ma & Lindquist, 2001). Obwohl diese Mutanten die N-terminale Signalsequenz tragen, werden sie nicht, bzw. nur in eingeschränktem Maße entlang des sekretorischen Weges an die Zelloberfläche transportiert, sondern höchstwahrscheinlich von den Qualitäts-Kontrollmechanismen des Endoplasmatischen Retikulums entlang eines proteasomalen Pfades ins Zytoplasma aussortiert (Ellgaard *et al.*, 1999; Zanusso *et al.*, 1999; Ma & Lindquist, 2001).

Protein-Degradation kann in unterschiedlichen Zellkompartimenten, wie den Lysosomen oder dem Zytoplasma, stattfinden. Der Großteil (80 - 90 %) aller zellulären Proteine wird proteasomal im Zytoplasma abgebaut (Rock *et al.*, 1994; Craiu *et al.*, 1997). Als

Abbaumechanismus für aberrante, fehlgefaltete Proteine des sekretorischen Pfades konnte der sog. ER-assoziierte Degradationsweg („ERAD“) identifiziert werden (Bonifacino & Klausner, 1994). ERAD beginnt mit der sog. „Qualitätskontrolle“, dem Prozess des Konformations-abhängigen molekularen Sortierens neu synthetisierter Proteine innerhalb des Endoplasmatischen Retikulums. Die zur Familie der Hitzeschock-Proteine gehörenden Chaperone sind sowohl an der Faltung und Qualitätskontrolle von Proteinen im ER (Gething & Sambrook, 1992) als auch an der Selektion der zur Degradation bestimmten Proteine beteiligt (Gottesman & Maurizi, 1992; Craig *et al.*, 1993; Wagner *et al.*, 1994). Das ER-Chaperon BiP bindet an PrP, und es konnte nachgewiesen werden, dass eine bestimmte humanpathogene Mutation (Q217R) diese Interaktion beeinflusst (Zanusso *et al.*, 1999; Jin *et al.*, 2000). Zum Abbau ausselektierte Proteine werden retrograd ins Zytoplasma transportiert. Hier werden die Proteine deglykosyliert und anschließend ubiquitiniert. Durch das kovalente Anheften von Ubiquitin-Ketten sind die Proteine für den Abbau durch das sog. „26S Proteasom“, der zentralen Protease des Zytoplasmas, markiert (Hochstrasser, 1996; Coux *et al.*, 1996; Hershko & Ciechanover, 1998). Da ins Zytoplasma ausselektierte Proteine zur Aggregation neigen, kann der proteasomale Abbau durch zu starke Protein-Aggregation beeinträchtigt werden (Kopito, 1997; Johnston *et al.*, 1998).

Durch Einsatz von Proteasomen-Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass etwa 10 % aller naszierenden PrP^C-Moleküle über ERAD degradiert werden (Yedidia *et al.*, 2001). Dies bedeutet, dass auch PrP^C, welches keine Mutation trägt, zu einem gewissen Anteil Fehlfaltungen unterliegt. Für zahlreiche hereditäre humanpathogene PrP-Mutationen konnte eine starke Erhöhung von falsch prozessiertem PrP nachgewiesen werden (Negro *et al.*, 2001; Ivanova *et al.*, 2001; Ma & Lindquist, 2001; Lorenz *et al.*, 2002). Ungeklärt ist, ob auch die eine vermehrte Bildung von transmembranem PrP verursachenden Mutationen zu einem erhöhten Anteil von über ERAD degradierte PrP-Moleküle führen.

1.6 Fallstudie einer neuen PrP-Mutation

Im Rahmen einer epidemiologischen Studie der Prionerkrankungen in Deutschland wird die kodierende Region des Prion-Protein-Gens aller Verdachtspatienten mittels Nukleinsäure-Sequenzierungen untersucht. Diese diagnostische Analyse führte bei einem symptomatisch auffällig gewordenen jungen Mann (26 Jahre) zur Entdeckung einer neuen Punktmutation im zentralen hydrophoben Bereich von PrP: eine an Aminosäureposition 114 veränderte Basenfolge (GTT statt GGT), welche zum Austausch von Glycin gegen Valin (G114V) führt. Die genetische Analyse weiterer Familienmitglieder (Abb. 5) ergab Anzeichen für einen familiären Hintergrund (Windl *et al.*, unpublizierte Daten).

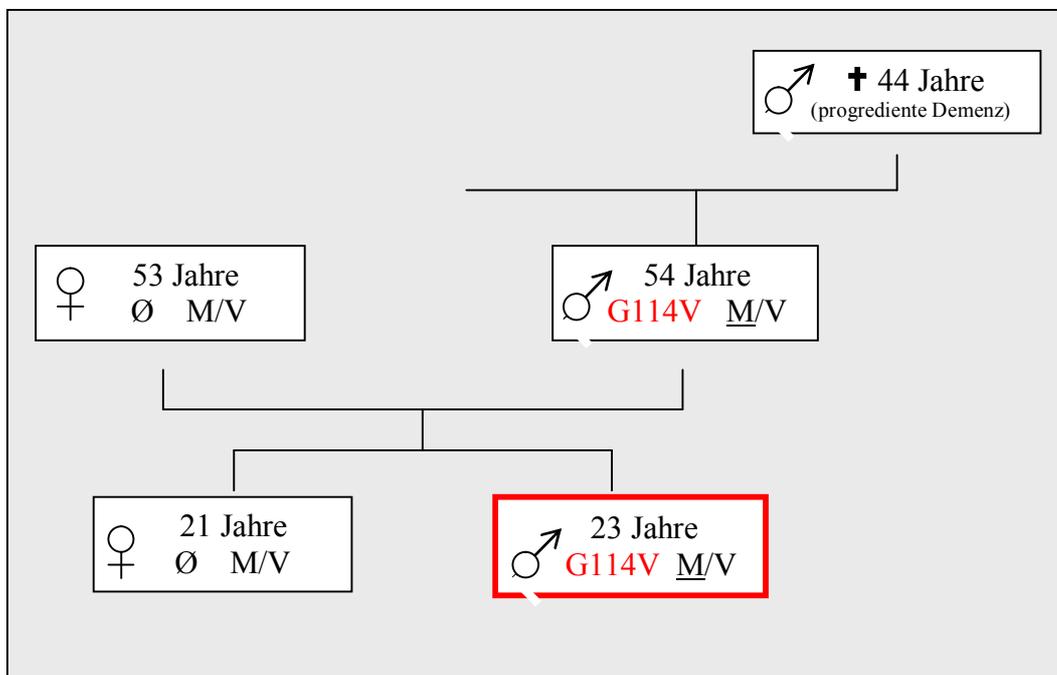


Abb. 5: Die Mutation G114V

Stammbaum der betroffenen Familie aus Deutschland. Der für diese Arbeit maßgebliche Indexpatient ist rot eingrahmt.

∅ : nicht mutationsbehaftet M/V : Die an der polymorphen Position 129 von *PRNP* kodierten Aminosäuren beider Allele. Unterstrichen ist die auf dem mutierten Allel kodierte Aminosäure.

Die Mutation G114V konnte auch in einer Familie aus Uruguay nachgewiesen werden. Hier ist ein 21-jähriges weibliches Familienmitglied betroffen und zeigt ähnliche klinische Symptome. Mit großer Wahrscheinlichkeit liegt ebenfalls eine hereditäre Situation vor.

Auffällig ist bei beiden erfassten Patienten das junge Alter, die Kopplung der Mutation mit Methionin an der polymorphen Aminosäureposition 129, die dem Gerstmann-Sträussler-

Scheinker-Syndrom (GSS) ähnelnden phänotypischen Symptome und die möglicherweise unvollständige Penetranz.

Der im August 1978 geborene Indexpatient wurde erstmals im Januar 1999 auffällig. Sein Verhalten wurde zunehmend durch wechselnde Phasen von sowohl depressiven Stimmungen als auch Ruhelosigkeit geprägt. Im Laufe der folgenden Monate zeigte er eine Verlangsamung der Motorik und entwickelte einen Tremor der Hände. Weitere Symptome waren zunehmende Vergesslichkeit, ein Nachlassen der Sprachgewandtheit sowie gesteigerte Transpiration. Im Oktober 1999 traten erstmals Myoklonien auf. Der Zustand des Patienten verschlechterte sich so weit, dass im August 2000 ein akinetischer Mutismus vorlag und die diagnostischen Kriterien für eine „mögliche CJD“ erfüllt waren.

1.7 Fragestellung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die neue humanpathogene *PRNP*-Mutation G114V *in vivo* sowie *in vitro* untersucht. Diese Mutation liegt innerhalb einer bei allen bislang untersuchten Spezies perfekt konservierten Region des Prion-Proteins. Gleichzeitig befindet sie sich innerhalb der postulierten transmembranen Domäne von PrP und in unmittelbarer Nähe der physiologischen Spaltstelle.

Die humanpathogene *PRNP*-Mutation A117V liegt drei AS C-terminal von G114V und resultiert ebenfalls in einem falschen Einbau der AS Valin (Abb. 6). A117V führt zur Ausbildung des Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndroms. Über die Zellbiologie dieser Krankheit liegen bislang keinerlei Daten vor.

	110	115	120
wt	K H M A G A A A G A		
G114V	K H M A V A A A G A		
A117V	K H M A G A A V A G A		

Abb. 6: Aminosäure-Sequenz des zentralen, hochkonservierten Bereichs von *PRNP*
Dargestellt ist die AS-Sequenz 110 - 120 von humanem PrP^C. Die Mutationen G114V und A117V sind rot hervorgehoben.

Aufgrund der Ähnlichkeit der Mutationen G114V und A117V wurden vergleichende Analysen gegen Wildtyp-PrP durchgeführt. Es wurden murine und humane Zellkulturmodelle

etabliert, um den Metabolismus dieser PrP-Mutanten untersuchen zu können. Neben der Untersuchung biochemischer Eigenschaften sollten durch Generierung von GFP („green fluorescent protein“)-PrP-Chimären und deren Analyse mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie Informationen über den intrazellulären Transport gewonnen werden. Experimente zur Klärung des Abbaus der verschiedenen PrP-Proteine sollten die *in vivo*-Studien komplettieren. Unterschiedliche *in vitro*-Versuchsansätze sollten Einblicke in die Syntheserate, die Kinetik des intrazellulären Transportes sowie die Lokalisationsverhältnisse an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums ermöglichen.

Darüber hinaus sollte die umfassende Analyse zahlreicher biochemischer und zellulärer Parameter Hinweise zur Aufklärung des durch die Mutationen G114V und A117V hervorgerufenen pathogenen Mechanismus liefern.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Acrylamid	Bio-Rad, München
Agar	Difco, Detroit, USA
Agarose	Difco, Detroit, USA
Amplify™ Fluorographic Reagent	Amersham, Freiburg
APS	Sigma, Taufkirchen
Bacto-Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
BCIP	Roche, Mannheim
Bradford-Reagenz	Bio-Rad, München
BSA	Paesel & Lorei, Hanau
Desoxyribonukleotide	Promega, Heidelberg
DMSO	Sigma, Taufkirchen
Harnstoff	Merck, Darmstadt
I-Block™	Tropix, Bedford, USA
Long Ranger™ (Acrylamid)	AT Biochem, Malvern, USA
NBT	Roche, Mannheim
Nonidet P-40	Sigma, Taufkirchen
Phenol	Amresco, Ohio, USA
TEMED	Amresco, Ohio, USA

Alle weiteren Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma (Taufkirchen) und Bio-Rad (München) bezogen.

2.1.2 Enzyme und Antibiotika

ALLN (MG-101)	Calbiochem, Bad Soden
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
Brefeldin A	Sigma, Taufkirchen
Doxyzyklin	Sigma, Taufkirchen
Geneticin® (G418)	Gibco BRL, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Seromed, Biochrom KG, Berlin
<i>Pfu</i> -Turbo-DNA-Polymerase	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Phosphatidylinositol-spezifische	
Phospholipase C (PIPLC)	Sigma, Taufkirchen
PMSF	Sigma, Taufkirchen
PNGase F	New England Biolabs, Bad Schwalbach
Proteinase K	Roche, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Promega, Heidelberg; New England Biolabs, Bad Schwalbach
T4-DNA-Ligase	Promega, Heidelberg

2.1.3 „Kits“ zur Behandlung von DNA

Plasmid Mini + Midi Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAEX [®] II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Thermo Sequenase fluorescent labeled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP	Amersham/Pharmacia Biotech, Freiburg
QuickChange [™] Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg

2.1.4 DNA- und Protein-„Standards“

DNA-Längenstandard

1-kb-DNA-Leiter
 Fragmentlängen (bp): 12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 506 sowie 8 kleinere Fragmente.

Die DNA-Längenstandardlösung wurde mit TE-Puffer und 1 x DNA-Auftragspuffer auf eine DNA-Konzentration von 0,1 µg/µl eingestellt.

SDS-PAGE + Tris-Tricine-PAGE Protein-Molekularstandard

„Broad Range“, vorgefärbt Bio-Rad, München

Der Protein-Standard lieferte folgende Molekulargrößen:

Myosin, Mr 202000; β-Galaktosidase, Mr 116000; Rinderserum Albumin, Mr 84000; Ovalbumin, Mr 50100; Carbonische Anhydrase, Mr 35400; Sojabohnen Trypsininhibitor, Mr 29000; Lysozym, Mr 21700; Aprotinin, Mr 7300

2.1.5 Verbrauchsmaterialien zum Arbeiten mit Bakterien und eukaryontischen Zellen

Einfrierröhrchen (1 + 2 ml) für Zellen	Nunc, Wiesbaden
(Steril-)Filter	Schleicher & Schüll, Dassel
Kulturgefäße, Plastikwaren	Sarstedt, Braunschweig; Nunc, Wiesbaden; Greiner, Solingen
Pipetten 2,5; 5; 10; 25 ml	Sarstedt, Braunschweig
Reaktionsgefäße 0,5; 1,5; 2,0 ml	Sarstedt, Braunschweig; Biozym, Hess. Oldendorf
Skalpelle	Aesculap, Tuttlingen
Zellschaber	Sarstedt, Braunschweig
Zentrifugiergefäße 15 + 50 ml	Sarstedt, Braunschweig

2.1.6 Verbrauchsmaterial für „WesternBlots“

PVDF-Immobilon [™] -P	Millipore, Molsheim
Transfer-Membran	Schleicher & Schüll, Dassel
Whatman 3MM Filterpapier	

2.1.7 Lösungen und Puffer für Arbeiten mit DNA

6 x DNA-Auftragspuffer

0,05 % (w/v) Bromphenolblau; 0,05 % (w/v) Xylencyanol; 30 % (v/v) Glycerin; 100 mM EDTA; pH 8,0

Lösung B

LB-Medium mit 12 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; 36 % (v/v) Glycerin; 12 % (v/v) PEG (MW 7500); sterilfiltriert

Medium A

LB-Medium mit 10 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ und 0,2 % (v/v) Glucose

10 x TBE-Puffer

0,89 M Tris; 0,89 M Borsäure; 0,025 M EDTA

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl; pH 8,0; 0,5 mM EDTA

Tris-Puffer

Trishydroxymethylaminomethan wurde in bidestilliertem Wasser aufgelöst und der pH mit Säure eingestellt. Hierfür wurde bei Tris/HCl Salzsäure, bei Tris/Acetat Essigsäure verwendet.

2.1.8 Lösungen und Puffer für Protein- und Zellkulturarbeiten

Alkalische Phosphatase-Puffer

100 mM Tris/HCl; pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl_2

10 % APS

0,1 g Ammoniumpersulfat in 1 ml H_2O

BCIP-Lösung

50 mg BCIP pro ml in 100 % DMF

Blocking-Puffer

1 x PBS; 0,2 % (w/v) I-BlockTM (Tropix); 0,1 % (v/v) Tween 20

Blotting-Puffer

0,025 M Tris; 0,192 M Glycin; 0,1 % (w/v) SDS; 20 % Methanol

Detergenz-Löslichkeits-Test-Puffer

150 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl; pH 7,5; 0,5 % TritonX-100; 0,5 % DOC

Fixierungs-Lösung

25 % Isopropanol; 65 % Wasser; 10 % Eisessig

IP-Hochsalz-Puffer

50 mM HEPES; pH 7,5; 500 mM NaCl; 0,1 % (w/v) SDS; 0,2 % TritonX-100

IP-Niegrigsalz-Puffer

20 mM HEPES; pH 7,5; 150 mM NaCl; 10 % (v/v) Glycerin; 0,1 % TritonX-100

Laufpuffer für SDS-PAGE

0,025 M Tris; pH 8,3; 0,192 M Glycin; 0,1 % (w/v) SDS

NBT-Lösung

50 mg NBT pro ml in 70 % DMF

1 x Phosphatgepufferte Saline (PBS)

9,55 g Instamed PBS Dulbecco (Seromed, Biochrom KG, Berlin) / 1 bidest. H₂O

PBS(+)

PBS; 1,0 mM Ca²⁺; 0,5 mM Mg²⁺

PBS-Tween

PBS; 0,05 % (v/v) Tween 20

2 x Proteinprobenpuffer

0,125 M Tris/HCl; pH 6,8; 4 % (w/v) SDS; 20 % (v/v) Glycerin; 0,2 M DTT; 0,02 % (w/v) Bromphenolblau

RIPA-Puffer

50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl; 1% NP-40; 0.5% DOC; 0.1 % SDS

4 x Sammelgelpuffer (SDS-PAGE)

0,5 M Tris/HCl; pH 6,8

10 % SDS

1 g SDS in 10 ml H₂O

TNE-Puffer

50 mM Tris/HCl; pH 7,5; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA

4 x Trenngelpuffer (SDS-PAGE)

1,5 M Tris/HCl; pH 8,8

Tris-Tricine-Anodenpuffer

0,2 M Tris/HCl; pH 8,9

Tris-Tricine-Gelpuffer

3 M Tris/HCl; pH 8,45; 0,3 % (w/v) SDS

Tris-Tricine-Kathodenpuffer

0,1 M Tris/HCl; pH 8,25; 0,1 M Tricine; 0,1 % SDS

Zell-Lysispuffer

TNE-Puffer; 0,2 % (w/v) Sarcosyl

2.1.9 Nährmedien für die Mikrobiologie**LB-Medium**

10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; H₂O ad 1 Liter

LB-Agar

LB-Medium mit zusätzlich 15 g Agar/Liter

Die Medien wurden 20 min bei 121°C autoklaviert. Danach wurde nach Bedarf das Antibiotikum Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml) dem zuvor abgekühlten (auf ca. 40°C) Medium zugesetzt.

LB-Platten

LB-Agar wurde durch Erhitzen verflüssigt und nach Abkühlung auf ca. 40°C mit Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml) versetzt, dünn in Petrischalen ausgegossen und erkalten lassen.

2.1.10 Medium für eukaryontische Zellen

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
mit 1,0 g/l Glucose, ohne L-Glutamin Bio Whittaker, Belgien

2.1.11 Medienzusätze und gepufferte Salzlösungen

FCS (fötales Kälberserum)	Seromed, Biochrom KG, Berlin; Clontech, Palo Alto, USA
L-Glutamin (200 mM)	Seromed, Biochrom KG, Berlin
HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)	Bio Whittaker, Belgien
Phosphatgepufferte Saline (PBS), Instamed PBS Dulbecco	Seromed, Biochrom KG, Berlin
Trypsin/EDTA (10 x), (0,2 % (w/v) in PBS, ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	Seromed, Biochrom KG, Berlin

2.1.12 Zellkulturmedium

DMEM (komplett):
DMEM
+ 10 % (v/v) Hitze-inaktiviertes (56°C, 1 h) FCS
+ 1 % (v/v) L-Glutamin
+ 1 % (v/v) P/S

Zellkulturmedien für radioaktives Labeling:

Starve-Medium: DMEM (komplett) ohne L-Methionin

Pulse-Medium: Starve-Medium mit 200 µCi L-[³⁵S]Methionin/ml

Chase-Medium: DMEM (komplett) mit 5 x Überschuß an nicht radioaktivem L-Methionin

2.1.13 *Escherichia coli*-Stämme

GM2163 (Woodcock *et al.*, 1989)

F⁻ *ara-14 leuB6 thi-1 fhuA31 lacY1 tsx-78 galK2 galT22 supE44 hisG4 rpsL136 (Str^r) xyl-5 mtl-1 dam13::Tn9 (Cam^r) dcm-6 mcrB1 hsdR2 (r_K-m_K⁺) mcrA*

XL1-Blue (Bullock *et al.*, 1987)

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r)]^c

2.1.14 Eukaryontische Zelllinien

N2A (Neuro-2A, ATCC CCL-131, American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA)

SH-SY5Y (human neuroblastoma, Reference: Biedler *et al.*, *Cancer Res.* 33:2643-52 (1973), Depositor: J. Heikkilä, University of Turku, Finland)

2.1.15 Plasmide

Tabelle 1: Vektoren und generierte Konstrukte

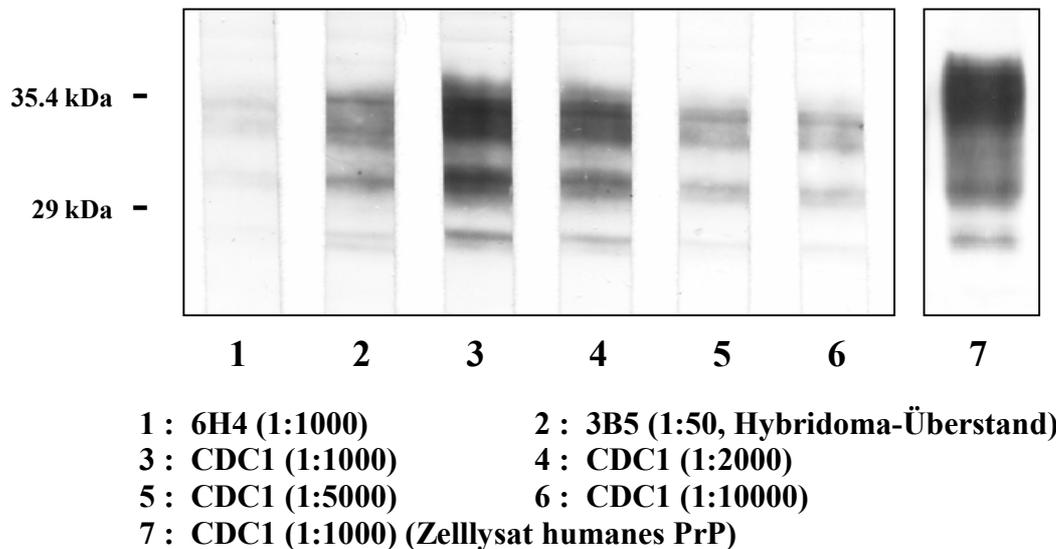
Name	Charakteristika	Referenz
pBluescript [®] II SK (-)	Klonierungsvektor; Amp ^r	Stratagene, La Jolla, USA
pBS- <i>Prnp</i>	pBluescript [®] II SK mit Maus-PrP-ORF	Institut für Neuropathologie, München; Windl <i>et al.</i> , 1999
pCINeo	Expressionsvektor; Amp ^r , Neomycin	Promega, Heidelberg
pCINeo-Mowt	pCINeo mit Maus-wtPrP-ORF	Institut für Neuropathologie, München; Windl <i>et al.</i> , 1999
pCINeo-MoG114V	Maus-PrP mit entsprechender Mutation	diese Arbeit
pCINeo-huwt	Human-wtPrP-ORF	diese Arbeit
pCINeo-huG114V	Human-PrP mit entsprechender Mutation	diese Arbeit
pCINeo-huA117V	Human-PrP mit entsprechender Mutation	diese Arbeit
pCINeo-MoHuw	Maus/Human-wtPrP-Chimäre	diese Arbeit
pCINeo-MoHuG114V	Maus/Human-PrP-Chimäre mit entsprechender Mutation	diese Arbeit
pCINeo-MoHuA117V	Maus/Human-PrP-Chimäre mit entsprechender Mutation	diese Arbeit
pGFP-wtPrP	Tetrazyklin-induzierbarer Expressionsvektor (GFP-MauswtPrP-Chimäre)	Lorenz <i>et al.</i> , 2002
GFP-Mauswt	pCINeo mit GFP-Maus-wt-Chimäre	diese Arbeit
GFP-MausG114V	GFP-Maus-Chimäre mit entsprechender Mutation	diese Arbeit
GFP-Maus/Humanwt	GFP-Maus/Menschwt-Chimäre	diese Arbeit
GFP-Maus/HumanG114V	GFP-Maus/Mensch-Chimäre mit entsprechender Mutation	diese Arbeit
GFP-Maus/HumanA117V	GFP-Maus/Mensch-Chimäre mit entsprechender Mutation	diese Arbeit

2.1.16 Antikörper

2.1.16.1 Herstellung eines polyklonalen anti-PrP-Antikörpers

Das Protokoll wurde dem Kapitel Nr. 5 des Laborhandbuchs „Antibodies“ von Harlow & Lane (1988) entnommen. Für die Immunisierung eines Kaninchens wurde mit Freund'schem Adjuvans (complete für die 1. Immunisierung / bzw. incomplete für die 2. Immunisierung) vermischtes rekombinantes Maus-PrP eingesetzt. Die beiden Immunisierungen wurden im Abstand von vier Wochen durchgeführt und das Kaninchen zehn Tage nach der 2. Immunisierung ausgeblutet. Nach Aufreinigung des „CDC1“ genannten Antikörpers (mittels

Zentrifugation und Affinitätssäulen-Chromatographie) wurde eine Qualitätskontrolle durchgeführt. Hierfür wurde Zelllysate stabil Maus-wt-PrP-überexprimierender N2A-Zellen (Spur 1 – 6) bzw. stabil Human-wt-PrP-überexprimierender SH-SY5Y-Zellen (Spur 7) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer WesternBlot-Analyse unterzogen:



Als Positivkontrollen kamen die monoklonalen AK 6H4 (Spur 1) und 3B5 (Spur 2) zum Einsatz. Der AK CDC1 wurde in unterschiedlichen Verdünnungsstufen (1:1000 – 1:10000) eingesetzt. Interessanterweise erkennt dieser gegen Maus-wt-PrP gerichtete Antikörper auch humanes wt-PrP mit hoher Effizienz und Spezifität (Spur 7).

2.1.16.2 Eingesetzte Antikörper

Folgende Antikörper wurden in der angegebenen Verdünnung für Immunopräzipitationen (IP), Immunfluoreszenzfärbungen (IF) sowie WesternBlot-Analysen (WB) eingesetzt:

Tabelle 2: Antikörper

Bezeichnung	Herkunft	Verdünnung	Referenz
anti-PrP-Antikörper			
3B5	Maus, monoklonal	1:5000 (WB+IF) 1:2000 (IP)	Krasemann <i>et al.</i> , 1996
3F4	Maus, monoklonal	1:5000 (WB+IF) 1:2000 (IP)	Kascsak <i>et al.</i> , 1987
6H4	Maus, monoklonal	1:5000 (WB+IF)	Prionics AG, Basel, Schweiz
12F10	Maus, monoklonal	1:2000 (IP)	Krasemann <i>et al.</i> , 1996
CDC1	Kaninchen, polyklonal	1:2000 (WB)	diese Arbeit
Ra3153	Kaninchen, polyklonal	1:2000 (WB)	INP München, Deutschland
SAF37	Maus, monoklonal	1:5000 (WB) 1:2000 (IP)	Demart <i>et al.</i> , 1999
anti-GFP-Antikörper			
anti-GFP, pk	Kaninchen, polyklonal	1:2000 (WB)	Clontech, Heidelberg
anti-GFP, mk	Maus, monoklonal	1:500 (WB)	Clontech, Heidelberg

Anti-ER-Antikörper Anti-Calnexin	Maus, monoklonal	1:500 (IF)	Dianova, Hamburg
Anti-Zytoplasma-Antikörper Anti-Hsc70	Ratte, monoklonal	1:500 (IF)	Stressgen, San Diego, USA
Sekundär-Antikörper Anti-Maus IgG, AP-gekoppelt	Ziege, polyklonal	1:10000 (WB)	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen IgG, AP-gekoppelt	Ziege, polyklonal	1:10000 (WB)	Dianova, Hamburg
Anti-Maus IgG, TexasRed-gekoppelt	Kaninchen, polyklonal	1:50 (IF)	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen IgG, TexasRed-gekoppelt	Ziege, polyklonal	1:50 (IF)	Dianova, Hamburg

2.2 Mikrobiologische und genetische Arbeitsmethoden

2.2.1 Stammhaltung von *E. coli*-Kulturen

Zur Herstellung von *E. coli*-Stammkulturen wurden jeweils 0,9 ml einer Übernachtskultur mit 0,1 ml Glycerin versetzt, gemischt und anschließend bei -80°C gelagert.

2.2.2 Anzuchtbedingungen und Wachstumsmessung

E. coli wurde aerob in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben bei 37°C in einem Schüttelinkubator bei 180-250 rpm angezogen. Bei der Verwendung von LB-Medium wurde über Nacht und bei der Verwendung von TB-Medium für 6-8 Stunden inkubiert. Das Wachstum der Zellen wurde durch Trübungsmessung (Ultraspec II, Pharmacia) bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen LB-Medium überprüft.

2.2.3 Präparation von kompetenten *E. coli*-Zellen (Nishimura *et al.*, 1990)

50 ml Medium A wurden mit 0,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur angeimpft und unter Schütteln bei 37°C bis zum Erreichen der mittleren logarithmischen Wachstumsphase (OD_{600} ca. 0,4-0,6) inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen für ca. 10 min auf Eis gestellt, anschließend pelletiert (1000 x g für 10 min bei 4°C) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 0,5 ml vorgekühltem Medium A resuspendiert und nach Zugabe von 2,5 ml eiskalter Lösung B gut gemischt. Die kompetenten Zellen wurden in Aliquots von 0,1 ml aufgeteilt und unmittelbar bei -80°C gelagert.

2.2.4 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Für die Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, mit der jeweiligen DNA (ca. 100 pg/100 µl Zellen) gemischt und für 15 bis 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden sie

einem Hitzeschock (42°C für 60 s) ausgesetzt, für 1 - 2 min auf Eis gekühlt und daraufhin mit 0,9 ml LB-Medium (RT) versetzt. Zur Expression der Antibiotikaresistenz wurden die Zellen für etwa eine Stunde bei 37°C inkubiert und daraufhin in geeigneten Volumina (i. d. R. 100-200 µl LB-Medium mit Ampicillin) auf Selektivplatten ausgesät und bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.2.5 Methoden zu Arbeiten mit DNA

2.2.5.1 Fällung von DNA mit Ethanol

Die Ethanolfällung diente der Konzentrierung und Aufreinigung von DNA. Dabei wurde die Konzentration monovalenter Kationen erhöht, welches, durch Erhöhung der Dielektrizitätskonstante, die Abstoßung der negativen Ladungen des Phosphodiester-Rückgrats vermindert, wodurch bei Lösungsmittelentzug durch Zugabe von Ethanol die DNA-Fällung ermöglicht wird. Das Volumen der DNA-Lösung wurde bestimmt und mit 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat- oder 7 M NH₄-Acetat-Lösung gemischt. Der Ansatz wurde mit 2 - 3 Vol. Ethanol versetzt und gründlich gemischt. Die Präzipitation erfolgte entweder für 60 min bei -80°C oder über Nacht bei -20°C. Die DNA wurde durch Zentrifugation (10 min, 20000 x g, 4°C) pelletiert, anschließend einmal mit 200 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 20000 x g, RT). Das DNA-Präzipitat wurde im Exsikkator oder bei RT getrocknet und in einem entsprechenden Volumen TE-Puffer oder H₂O aufgenommen.

2.2.5.2 Konzentrationsbestimmung der DNA

10 µl der DNA-Lösungen wurden mit H₂O auf 0,5 ml Endvolumen aufgefüllt und die Konzentrationen durch Messung der OD₂₆₀ in einer Quarzküvette (Schichtdicke: 1 cm) gegen 0,5 ml H₂O bestimmt. Ein OD₂₆₀-Wert von 1 entsprach einer Konzentration von 50 µg dsDNA/ml. Der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ wurde als Maß für die Reinheit der DNA herangezogen. Für sehr reine DNA-Lösungen liegt das Verhältnis in einem Bereich von 1,8 bis 1,95. Niedrigere Werte sind ein Indiz für die Anwesenheit von Kontaminationen (z.B. Proteine). Geringe DNA-Mengen wurden nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel über ihre Fluoreszenzintensität unter UV-Licht durch Vergleich mit einem DNA-Standard bekannter Konzentration bestimmt.

2.2.5.3 Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für Restriktionsspaltungen wurde das Gesamtvolumen des Ansatzes so gewählt, dass die Enzym-Stammlösung wenigstens 1:10 verdünnt wurde, um unspezifische Reaktionen („star activity“) aufgrund zu hoher Glycerinkonzentrationen zu vermeiden. Pro µg DNA wurden etwa 1-2 Einheiten (Units) des Enzyms und 0,1 Vol. des entsprechenden 10 x Restriktionspuffers zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei der für das Enzym/die Enzyme geeigneten Temperatur für eine bis mehrere Stunden. Die Spaltung wurde mittels einer Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA

2.2.6.1 Mini- und Midipräparation von Plasmid-DNA (Qiagen-Methode)

Hierfür kamen „Plasmid Mini + Midi Extraction“-Kits (Qiagen, Hilden) zum Einsatz. Die Präparationen erfolgten gemäß der Protokolle des Herstellers.

2.2.6.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde das QIAEX[®] II-Kit (Qiagen, Hilden) angewendet und die Extraktion anhand des mitgelieferten Protokolls durchgeführt.

2.2.7 Agarosegelelektrophorese

Für die präparative und analytische Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 0,7 bis 1,5%ige (w/v) Agarosegele verwendet. Nach dem Kochen der Agarose in 0,5 x TBE-Puffer wurde 1/2000 Vol. einer Ethidiumbromidlösung (1 mg/ml) zugesetzt, die Agarose in eine Flachbettchale gegossen und mit einem Kamm versehen, welcher für die Ausbildung der Probenauftragstaschen sorgte. Nach dem Erstarren der Agarose wurde das Gel in eine mit 0,5 x TBE-Puffer gefüllte Flachbettelektrophoresekammer überführt und der Kamm entfernt. Vor dem Auftragen der DNA-Proben wurden diese mit 0,1-0,2 Vol. 6 x DNA-Auftragspuffer versetzt. Als Längenstandard diente die 1 kb-DNA-Leiter (Gibco BRL, Eggenstein). Für die Elektrophorese wurden Spannungen von bis zu 120 Volt (Feldstärken 5-15 V/cm) angelegt. Nach erfolgter Auftrennung wurde die DNA durch UV-Licht als fluoreszierende Banden sichtbar gemacht und fotografiert bzw. aus dem Gel extrahiert (s. 2.2.6.2).

2.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren

Plasmid-DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen verdaut, mittels des QIAEX[®] II-Kits (Qiagen, Hilden) aus Agarosegelen extrahiert und mit Ethanol gefällt. Die Verknüpfungsreaktion erfolgte unter Einsatz der T4-DNA-Ligase, welche die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'-Hydroxylende und dem 5'-Phosphatende von DNA-Molekülen katalysiert.

Reaktionsmix:

Vektor-DNA nach Restriktionsverdau (50-200 ng)
 DNA-Fragment (5-10 x molarer Überschuss)
 1 x T4-DNA-Ligase-Puffer
 T4-DNA-Ligase (1-2 U)
 i. d. R. H₂O ad 10 µl

Die Reaktionen wurden entweder bei 37°C für 3 Stunden oder bei RT über Nacht durchgeführt. Anschließend wurden *E. coli*-Zellen mit der DNA der Ligationsansätze transformiert, eine Minipräparation von den auf Selektivplatten gewachsenen Kolonien durchgeführt und die Konstrukte durch Restriktionsanalysen und DNA-Sequenzanalyse überprüft.

2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR-Ansätze (Mullis & Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988) wurden i. d. R. in einem Volumen von 50 µl in 0,5 ml-PCR-Reaktionsgefäßen in einem Thermoblock („Cycler“) (Biometra, Göttingen; Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Um einen Fehleinbau von Nukleotiden bei der Enzymreaktion weitestgehend zu vermeiden wurde *Pfu*-Turbo-DNA-Polymerase verwendet, die aufgrund ihrer „proof-reading“-Eigenschaften eine deutlich bessere Fehlerkorrekturrate aufweist als z.B. *Taq*-DNA-Polymerase. Die Ansätze enthielten folgende Komponenten:

DNA	50-500 ng
„Primer“	je 50 pmol
dNTP-Gemisch (je 10 mM)	1 µl
<i>Pfu</i> -Turbo-DNA-Polymerase	1 U
10 x <i>Pfu</i> -Turbo-Reaktionspuffer	5 µl
H ₂ O	ad 50 µl

Zum Schutz vor Verdunstung wurden die Ansätze mit Mineralöl (Sigma, Taufkirchen) überschichtet. Die Denaturierung erfolgte im ersten Zyklus bei 94°C für 2 min, danach bei jedem Zyklus bei 94°C für 1 min. Die Anlagerungstemperatur wurde, ausgehend von der errechneten Schmelztemperatur der „Primer“, empirisch optimiert und die Kettenverlängerung erfolgte jeweils bei 72°C für 2,5 min/kb. Nach Abschluss von 20-25 Temperaturzyklen wurden die PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese analysiert und für ihre Weiterverwendung präpariert.

2.2.10 Ortsspezifische Mutagenese (“Site-directed Mutagenesis”)

Die Ortsspezifische Mutagenese (Kunkel, 1985) ermöglicht die Einbringung (und PCR-Amplifizierung) von Nukleotid-Austausch-Mutationen in Plasmid-Vektoren mittels Oligonukleotid-Primern, welche die erwünschte Mutation enthalten. Hierfür müssen sowohl der „Sense“- als auch der „Antisense“-Primer die gewünschte Mutation beinhalten, welche sich möglichst in der Mitte der Primer befinden sollte. Es kam das QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Heidelberg) zum Einsatz.

Sense-Oligonukleotid-Primer (G114V forward):

5' - CCA ACC TCA AGC ATG TGG CAG TTG CTG CGG CAG CTG GGG C - 3'

Antisense-Oligonukleotid-Primer (G114V revers):

5' - GCC CCA GCT GCC GCA GCA ACT GCC ACA TGC TTG AGG TTG G - 3'

PCR-Ansatz:

10 x Reaction Puffer	5 µl
ds Plasmid-DNA (45 ng/µl)	1 µl
Sense-Oligonukleotid-Primer (100 ng/µl)	1.25 µl
Antisense-Oligonukleotid-Primer (100 ng/µl)	1.25 µl
dNTP-Mix	1 µl

ad 50 µl mit H₂O

Zugabe von 2.5 U *Pfu*-Turbo-DNA-Polymerase

PCR-Reaktion:

Zyklus	Temperatur	Zeit
1	95°C	30 sec
2 - 16	95°C	30 sec
	55°C	1 min
	68°C	11 min
	⇒ 4°C	

Der spezifische Verdau (1 h bei 37°C) der parentalen Template-DNA erfolgte durch Zugabe von 10 U *Dpn* I. Anschließend wurde die Plasmid-DNA in kompetente Bakterien transformiert und auf LB-Amp-Platten ausplattiert. Es wurde eine üN-Kultur (5 ml) angeimpft. Nach einer Plasmid-Präparation („Mini“) erfolgte die Überprüfung der ortsspezifischen Mutagenese mittels DNA-Sequenzierung. Um während der PCR-Reaktion eventuell aufgetretene Synthesefehler ausschließen zu können, wurde der die erwünschte Mutation tragende DNA-Abschnitt nach Überprüfung durch Sequenzierung in nicht-PCR-amplifizierten Vektor umklontiert.

2.2.11 DNA-Sequenzanalyse

2.2.11.1 „Cycle sequencing“-Reaktionen

DNA-Sequenzierungen wurden an einem „Li-Cor“ DNA-Sequenzierer (MWG Biotech, Ebersberg) mit Hilfe des „Thermo Sequenase fluorescent labeled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ (Amersham/Pharmacia Biotech, Freiburg) und Fluoreszenzfarbstoff-(IRD-700/800)-markierter „Primer“-Moleküle (MWG Biotech, Ebersberg) vorgenommen. Das Verfahren stellt eine Modifikation der Didesoxynukleotid-Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.*, 1977) dar und beinhaltet die Verwendung von thermostabiler DNA-Polymerase in zyklischen Sequenzierreaktionen („cycle sequencing“-Reaktionen). Zur Herstellung des „DNA/Primer Premix“ wurden folgende Komponenten in einem 500 µl-PCR-Reaktionsgefäß (Biozym, Hess. Oldendorf) gemischt:

DNA	100 ng/kb
„Primer“ (IRD-700/800 markiert)	2 pmol
DMSO	1 µl
H ₂ O	ad 25 µl

Je 2 µl „G-, A-, T- und C-termination-mix“ (enthalten thermostabile Polymerase und Reaktionspuffer) wurden in vier 500 µl-PCR-Reaktionsgefäße gegeben, mit je 6 µl des „DNA/Primer Premix“ gemischt und dünn mit Mineralöl überschichtet. Die Sequenzierreaktionen wurden anschließend in einer PCR-Maschine (Eppendorf, Hamburg) mit folgenden Standard-Temperaturzyklen durchgeführt:

Denaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	15 s	} 25 x
„Primer“-Anlagerung	55°C	30 s	
Polymerisierung	70°C	30 s	

Nach Beendigung der Zyklen wurden 8 µl „stop solution“ in jedes Reaktionsgefäß gegeben und je 2 µl der Reaktion auf ein Sequenziergel geladen.

2.2.11.2 Das Sequenziergel

Zur Analyse der Sequenzierreaktionen dienten 0,25 mm starke, 4,3 %ige (w/v) Polyacrylamid-Gele (Sanger & Coulson, 1978) mit einer Trennstrecke von 41 cm, die mit Hilfe des „Long Ranger“ Fertig-Acrylamid-Systems (Biozym, Hess. Oldendorf) und der zum „Li-Cor“-System gehörenden Gelgießausrüstung hergestellt wurden. Nachdem die Rücken- und Abdeckglasplatte gründlich gereinigt waren, wurden der Gelstand aufgebaut und die fertige Gellösung vorsichtig entlang des oberen Randes der Abdeckplatte aufgetragen. Anschließend wurde der Kamm mit der glatten Seite zum Gel in die dafür vorgesehene Aussparung der Abdeckplatte eingesetzt und das Gel zum Auspolymerisieren für 1 h waagrecht gelagert. Nachdem das Gel gemäß den Herstelleranweisungen in den Sequenzierapparat eingebaut und die Pufferkammern mit 1 x TBE gefüllt worden waren, wurde der Kamm umgedreht und mit der gezahnten Seite zum Gel so eingesetzt, dass die Zähne leicht auf der Geloberfläche aufsaßen. Nach einem Gel-Vorlauf von ca. 30 min wurden die Proben aufgetragen und die Elektrophorese bei 2200 V, 37 mA und 45°C durchgeführt. Die während des Laufs aufgezeichneten Fluoreszenzsignale wurden mit Hilfe des im „Li-Cor“-System enthaltenen Programmes „Base ImagIR“ Version 2.30 ausgewertet.

Gellösung für Sequenziergele:

Harnstoff	21 g
10 x TBE	5 ml
„Long Ranger“	4,3 ml
TEMED	50 µl
10 % (w/v) APS	250 µl
H ₂ O	ad 50 ml

2.3 Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen und Proteinarbeiten

Die folgenden Methoden und Vorschriften wurden, soweit nicht anders angegeben, den Laborhandbüchern „Cells“ von Spector *et al.* (1998) und „Antibodies“ von Harlow & Lane (1988) entnommen. Die Zellen wurden in wassergesättigter Atmosphäre bei 10 % CO₂ und 37°C kultiviert. Medien und Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, auf 37°C vorgewärmt und alle Arbeiten mit sterilem Plastikmaterial (Pipetten, Gewebekulturschalen, -flaschen und -platten) durchgeführt.

2.3.1 Trypsinieren von Zellen

Das Medium wurde von der Gewebekulturschale, -flasche oder -platte gründlich entfernt und die Zellen in Abhängigkeit von der Zelldichte, der Aufbewahrungsdauer der Zellkultur und dem Zelltyp in einem empirisch ermittelten Volumen Trypsin/EDTA für bis zu 5 min bei 37°C inkubiert. Das durch die Protease Trypsin verursachte Abrunden und somit Ablösen der Zellen konnte währenddessen sowohl mikroskopisch als auch makroskopisch kontrolliert werden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von serumhaltigem Medium gestoppt, die Zellen durch mehrfaches Aufziehen mit einer Pipette vereinzelt und bei Bedarf die Zellzahl pro ml mit Hilfe des Hämocytometers (Zählkammer nach Neubauer) bestimmt. Anschließend wurden die Zellen in der gewünschten Dichte ausgesät bzw. für das Einfrieren präpariert.

2.3.2 Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden in eine 80 cm²-Gewebekulturflasche passagiert und beim Erreichen einer 60-90 %igen Konfluenz zum Einfrieren präpariert. Nach Trypsinierung wurden die Zellen pelletiert (5 min, 200 x g, 4°C), der Überstand verworfen und in 0,4 ml eiskaltem Medium 1 (80 % DMEM, 20 % FCS) resuspendiert. Der Ansatz wurde in vorgekühlte Einfrierröhrchen überführt, in welche 0,4 ml eiskaltes Medium 2 (60 % DMEM, 20 % FCS, 20 % DMSO) vorgelegt war und durch mehrfaches Umdrehen vermischt. Die Röhrchen wurden in einem auf 4°C vorgekühlten Isopropanolbehälter langsam (-1°C/min) auf -80°C gekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.3.3 Auftauen und Revitalisieren von Zellen

Das Einfrierröhrchen wurde nach der Entnahme aus dem Stickstofftank zum vollständigen Auftauen der Zellen in ein 37°C-Wasserbad überführt. Anschließend wurde das Röhrchen kurz in ein alkoholgetränktes Papiertuch gehüllt und die Zellsuspension unter der Sterilbank in 9 ml Wachstumsmedium überführt. Die Zellen wurden daraufhin pelletiert (5 min, 200 x g,

RT), in frischem Wachstumsmedium aufgenommen und in eine Kulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um Reste von DMSO zu entfernen.

2.3.4 Transiente Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA

Für alle Transfektionen wurde die DNA durch Midipräparationen von Plasmid-DNA (Qiagen-Methode) gewonnen und bei vergleichenden Tests ausschließlich DNA gleicher Konzentration und Güte verwendet, um möglichen Qualitätsschwankungen entgegenzutreten. Die für Transfektionen in die geeigneten Gewebekulturschalen zu passagierenden Zellen befanden sich in der exponentiellen Wachstumsphase und wiesen eine Konfluenz von 60-80 % auf. Als Transfektionsreagenz wurde „Effectene“ (Qiagen, Hilden) verwendet und das vom Hersteller mitgelieferte Protokoll für die Transfektion von adhärenenten Zellen herangezogen.

2.3.5 Generierung stabil exprimierender Zellklone

Humane Neuroblastom-Zellen (SH-SY5Y) wurden analog 2.3.4 mit Plasmid-DNA transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde Selektions-Zellkultur-Medium (DMEM (komplett) + 400 µg Geneticin/ml) zugegeben. Die Zellen wurden mind. 4 Wochen unter Selektionsbedingungen kultiviert und einzelne Kolonien (Klone) in neue Kulturflaschen überführt. Die Expressionsstärke der gewonnenen Einzelklone wurde in WesternBlot-Analysen überprüft.

2.3.6 Scrapie-infizierte Neuroblastom-Zellen (ScN2A)

Ein induzierbar Maus-wt-PrP-exprimierender muriner Neuroblastom-Zellklon (Windl *et al.*, 1999) wurde permanent mit dem Maus-adaptierten Scrapie-Stamm 22L infiziert (Nishida *et al.*, 2000). Die Zellen wurden unter Erhaltungsbedingungen (DMEM + 200 µg Geneticin/ml) kultiviert und die Proteinexpression durch Zugabe von Doxyzyklin (200 ng/ml) induziert.

2.3.7 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Kolokalisationsstudien mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie erlauben, im Gegensatz zu konventioneller Fluoreszenzmikroskopie, die simultane Detektion von Signalen unterschiedlichen Ursprungs innerhalb einer klar definierten Ebene der analysierten Zellen. Außerhalb dieser Ebene liegende Signale werden durch entsprechende Filtereinstellungen ausgeschlossen. Bei sämtlichen hier durchgeführten Kolokalisationsstudien überschritt die Schichtdicke der ausgewählten Ebene nie eine Breite von 1.5 µm und bei identischen Experimenten wurden entsprechend identische Einstellungen verwendet. Die Analyse von Fluoreszenzsignalen bei eukaryontischen Zellen wurde an einem TCS NT/SP2 Confocal System (Leica, Heidelberg) durchgeführt. Dazu wurden das Wasserimmersionsobjektiv Achroplan 63x/0,90 NA und das Ölimmersionsojektiv Fluar 40x/1,3 NA (Zeiss, Oberkochen) verwendet. Die GFP-Fluoreszenz wurde mit einem Argonionen-Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm und der rot emittierende Farbstoff „Texas Red“ mit einem HeNe-Laser bei einer Wellenlänge von 543 nm unter Verwendung von FITC- bzw. TRITC-Filtereinstellungen angeregt. Zur Verifizierung der qualitativen und quantitativen Verteilung von Fluoreszenzsignalen wurden pro Konstrukt mehrere Dutzend transfizierter Zellen betrachtet und stets serielle Aufnahmen durch die Zellen aufgenommen, um einen objektiveren Eindruck zu gewinnen. Die erhobenen Daten wurden von der zum System gehörenden Leica Software und dem Computerprogramm „Adobe Photoshop“ (Adobe) bearbeitet.

2.3.8 Fixierung und Permeabilisierung von Zellen

Adhärente Zellen (auf Glasobjektträgern) wurden mehrfach in PBS(+) gewaschen und für die Fixierung mit 4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS für 10 min bei RT inkubiert. Für intrazelluläre Markierungen wurden die Zellen nach der Fixierung mit 0,2 % (v/v) Triton X-100 in PBS für 2 min bei RT permeabilisiert. Die Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen und anschließend entweder für die Markierung von Zellorganellen mit Fluoreszenzfarbstoffen bzw. für die Immunfluoreszenz weiterverwendet oder sogleich mit einem „Fluorescent Mounting“-Einbettmedium (Dako, Hamburg) unter Deckgläsern konserviert.

2.3.9 Immunfluoreszenzanalyse

Die Ermittlung der zellulären Lokalisation von Proteinen erfolgte durch Immunfluoreszenzanalysen. Dazu wurden fixierte und, bei intrazellulärer Detektion, permeabilisierte Zellen mit einem für das zu analysierende Protein spezifischen Antikörper inkubiert und dessen Aufenthaltsort unter Verwendung eines zweiten, mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten anti-Kaninchen- bzw. anti-Maus-IgG-Antikörpers unter dem konfokalen Mikroskop detektiert.

Transfizierte Zellen wurden für mindestens 24 h auf Glasobjektträgern kultiviert und anschließend fixiert sowie bei Bedarf permeabilisiert. Der Primär-Antikörper wurde je nach Sensitivität 1:50 bis 1:200 in PBS, 3 % (w/v) BSA angesetzt und die Zellen für mindestens 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3 x 5 min in PBS, 1 % (v/v) Triton X-100 gewaschen und mit dem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundär-Antikörper (1:50) in PBS, 3 % (w/v) BSA für mindestens 20 min bei RT inkubiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen in PBS und die Konservierung der Zellen unter Deckgläsern mit Hilfe des Einbettmediums. Die Präparate wurden anschließend mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert.

2.3.10 Markierung von zellulären Bestandteilen und Zellorganellen mit Fluoreszenz-Farbstoffen

Neben der Immunfluoreszenzanalyse erfolgte die zelluläre Lokalisationsbestimmung mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Reagenzien, die spezifisch mit ihren zellulären Zielorganellen reagieren. Für die Markierung des Golgi-Apparats wurde „BODIPY TR ceramide“ (Molecular Probes, Mo Bi Tec, Göttingen), für die Anfärbung von Lysosomen „LysoTracker RED DND-99“ (Molecular Probes) verwendet. Die Anfärbung des Golgi-Apparats geschah durch die Inkubation lebender Zellen mit 1-2 μM „BODIPY TR ceramide“ in Zellkulturmedium für 20 min bis 1 h im Brutschrank. Für die Färbung von Lysosomen wurden lebende Zellen mit 100 nM „LysoTracker RED DND-99“ in Zellkulturmedium für 2 h im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss an die Anfärbungen der Organelle wurden die Zellen mehrmals in PBS gewaschen und für die konfokale Laserscanning-Mikroskopie präpariert.

2.3.11 Enzymatische Abtrennung GPI-verankerter Proteine von der Zellmembran

Proteine, die über ein Phosphatidylinositolglykolipid (GPI) auf der Zellmembran „verankert“ sind, können mittels der Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PIPLC) von der Zelloberfläche abgelöst werden. Dazu wurden die Zellen mehrmals in HBSS gewaschen und mit 1 U/ml PIPLC in serumfreiem Zellkulturmedium bei 37°C für 1 h im Brutschrank inkubiert. Die Proteine im Inkubationsmedium wurden anschließend für die „WesternBlot“-Analyse Methanol-präzipitiert und für die SDS-PAGE präpariert.

2.3.12 Zellyse und Präparation von Proteinextrakten aus Zellkulturen

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und für ca. 30 min auf Eis in Zellysispuffer (300 µl/60 mm-Schale) inkubiert. Anschließend wurden die lysierten Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß transferiert. Der Lyse-Ansatz wurde ca. 10 s gemischt (Vortexgerät) und sonifiziert (ca. 15 s, maximale Leistung). Nach einer Zentrifugation (2 min, 12000 x g, 4°C) wurde der Überstand in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt, ein Teil für die Proteinkonzentrationsbestimmung entnommen und der Rest zur weiteren Verwendung präpariert bzw. bei -80°C eingefroren.

2.3.13 Deglykosylierung von Glykoproteinen

Die von der Amidase PNGase F katalysierte, spezifische Spaltung der *N*-glykosidischen Bindung zwischen dem innersten *N*-Acetylglucosamin und dem Asparaginrest von Glykoproteinen wurde genutzt, um diese Proteine auf eine einheitliche Größe zu reduzieren. Dazu wurden Puffer und Enzym eines entsprechenden Kits verwendet. Es wurden 100-150 µg Gesamtprotein in 1 x „Denaturing Buffer“ für 10 min bei 99°C denaturiert und anschließend 1/10 Vol. von „10 x G7 Buffer“ und „10 % NP-40“ hinzugefügt und vermischt. Die Deglykosylierung der Glykoproteine erfolgte daraufhin mit 500 U PNGase F für mind. 1 h bei 37°C.

2.3.14 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinextrakten wurde mit Hilfe von Bradford-Reagenz durchgeführt. Dazu wurden 1 µl des zu analysierenden Protein-Lysates mit 200 µl Bradford-Reagenz und 799 µl H₂O vermischt, für 5 min bei RT inkubiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch ermittelt. Die Proteinkonzentration konnte anschließend anhand einer Standardkurve mit definierten BSA-Konzentrationen ermittelt werden.

2.3.15 Konzentrierung der Proteinextrakte mittels Methanolfällung

Eine entsprechende Protein-Menge wurde mit mind. 4 Vol. eiskaltem Methanol vermischt und für ca. eine Stunde bei -80°C bzw. über Nacht bei -20°C inkubiert. Der Ansatz wurde zentrifugiert (5 min, 12000 x g, 4°C), der Überstand verworfen und das Reaktionsgefäß mit dem Proteinpellet für 10-30 Minuten zum Evaporieren von Methanolresten auf einen Wärmeblock (30°C) gestellt. Anschließend wurde das Pellet in Zellysispuffer und 2 x Proteinprobenpuffer (v/v im Verhältnis 1:1) aufgenommen, 30 s gemischt (Vortexgerät) und 5-10 min bei 99°C im Thermoblock inkubiert. Der Ansatz wurde daraufhin für „WesternBlot“-Analysen eingesetzt.

2.3.16 Konzentrierung von Proteinen mittels Immunopräzipitation

Eine entsprechende Protein-Menge wurde zur Vorreinigung in einem 2 ml-Reaktionsgefäß mit 50 µl Protein A- bzw. Protein G-Agarose-„beads“ (Roche, Mannheim) für mind. 3 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Die beads wurden sedimentiert (12000 x g, 20 s) und der Überstand in ein neues 2 ml- Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 1-2 µl eines entsprechenden Antikörpers zugegeben und für 1 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden 50 µl Protein A- bzw. Protein G-Agarose-„beads“ zugegeben und für mind. 3 h inkubiert. Die Protein-beads-Komplexe wurden sedimentiert (12000 x g, 20 s) und der Überstand verworfen. Es wurde 2 x mit je 1 ml IP-Hochsalz-Puffer und 1 x mit je 1 ml IP-

Niedrigsalz-Puffer gewaschen. Es wurde 2 x Proteinprobenpuffer zugegeben, 10 min bei 99°C im Thermoblock inkubiert und der Ansatz für „WesternBlot“-Analysen eingesetzt.

2.3.17 Detergenzlöslichkeits-Test

Der Detergenzlöslichkeits-Test dient der Auftrennung von Zelllysaten in eine detergenzlösliche (Überstand, „supernatant“) und eine detergenzunlösliche (Sediment, „pellet“) Phase. Zelllysat (150 µg Gesamtprotein) wird einer Vorreinigung (16000 x g, 5 min, 4°C) unterzogen, mit Detergenz-Löslichkeits-Test-Puffer auf 300 µl aufgefüllt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt die Phasenauftrennung mittels Ultrazentrifugation (265000 x g, 1 h, 4°C).

2.3.18 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die analytische Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht (ab 20 kDa) erfolgte durch diskontinuierliche, denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970). Das Gel bestand zu etwa ¼ seiner Länge aus dem Sammelgel und zu ¾ aus dem Trenngel, welches einen 12,5 %igen Acrylamid-Anteil enthielt. Um eine bessere Auftrennung bei Proteinen über 40 kDa zu erreichen, wurden neben den Minigelen (100 x 80 x 0,75 mm; Bio-Rad, München) auch größere Gele (200 x 200 x 2 mm; Bio-Rad, München) verwendet.

Gelzusammensetzung der SDS-PAGE:

Trenngel (12,5 %)

Acrylamid-Fertiglösung	3,13 (9,4)* ml
4 x Trenngelpuffer	2,5 (7,5) ml
10 % SDS	0,1 (0,3) ml
10 % APS	50 (150) µl
TEMED	4 (10) µl
H ₂ O	4,3 (12,7) ml

Sammelgel (5 %)

Acrylamid-Fertiglösung	0,5 (2) ml
4 x Sammelgelpuffer	0,9 (5) ml
10 % SDS	20 (200) µl
10 % APS	20 (100) µl
TEMED	10 (10) µl
H ₂ O	4 (12,7) ml

*Die Mengen für große Gele sind in Klammern aufgeführt.

Nach dem Gießen des Trenngels wurde die Gellösung mit Isopropanol überschichtet. Durch diesen Abschluß wurde eine das Auspolymerisieren störende Interaktion mit der Luft verhindert. Nach dem Polymerisieren des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt, die Sammelgellösung zugegeben und der Kamm positioniert. Die Proteinproben wurde mit Proteinprobenpuffer versetzt, 5-10 Minuten bei 99°C auf einem Thermoheizblock denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte im Laufpuffer für SDS-PAGE bei einer Stromstärke von 20 mA pro Minigel bzw. 88 mA bei einem großem Gel.

2.3.19 Tris-Tricine-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Tris-Tricine-PAGE)

Die diskontinuierliche, denaturierende Tris-Tricine-PAGE (Schägger & von Jagow, 1987) erlaubt die hochauflösende Auftrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 5 - 20 kDa. Die Herstellung der Gele erfolgte analog der SDS-PAGE.

Gelzusammensetzung der Tris-Tricine-PAGE:

Trenngel (16,5 %):

Acrylamid-Fertiglösung	15 (30)* ml
Tris-Tricine Gelpuffer	10 (20) ml
Glycerol	3,3 (6,6) ml
10 % APS	150 (300) μ l
TEMED	15 (30) μ l
H ₂ O	ad 30 (60) ml

Sammelgel (8 %):

Acrylamid-Fertiglösung	2 (4) ml
Tris-Tricine Gelpuffer	3,1 (6,2) ml
10 % APS	100 (200) μ l
TEMED	10 (20) μ l
H ₂ O	ad 12,5 (25) ml

*Die Mengen für große Gele sind in Klammern aufgeführt.

Für die elektrophoretische Auftrennung wurden der Tris-Tricine-Anoden- , bzw. Kathodenpuffer eingesetzt.

2.3.20 Immunologischer Nachweis elektrophoretisch aufgetrennter Proteine („WesternBlot“)

Für immunochemische Nachweise wurden Proteine nach ihrer Auftrennung in Polyacrylamidgelen über Elektroelution mit Hilfe des „semi-dry“-Verfahrens (Towbin *et al.*, 1979; Kyhse-Andersen, 1984) auf immobilisierende Membranen übertragen. Die Proteine wurden auf PVDF-Immobilon-P Transfer-Membrane (Millipore) transferiert. Dazu wurden auf einen Stapel aus drei, mit Blotting-Puffer getränkten Filterpapieren (Whatmann 3MM) die Membran und das SDS-Polyacrylamidgel gelegt und mit drei weiteren Blotting-Puffergetränkten Filterpapieren bedeckt. Der gesamte Stapel wurde luftblasenfrei zwischen die Elektrodenplatten einer Blot-Apparatur positioniert, wobei die PVDF-Membran der Anode zugewandt lag. Der Transfer wurde für 1-2 Stunden bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm² Gelfläche durchgeführt. Nach dem „WesternBlotting“ wurde die PVDF-Membran einmal in PBS gewaschen und anschließend zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen für mind. 60 min bei RT bis über Nacht bei 4°C in Blocking-Puffer gelagert. Danach wurde der entsprechende Primär-Antikörper in Blocking-Puffer verdünnt und die Membran darin inkubiert (1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C). Die Membran wurde anschließend 2 x 5 min in Blocking-Puffer gewaschen, für 30-60 min bei RT in der Sekundär-Antikörperlösung inkubiert und erneut 3 x 5 min in Blocking-Puffer gewaschen. Die Blotmembran wurde einmal für eine Minute in Alkalische Phosphatase-Puffer gewaschen und die Katalyse der Farbreaktion in 10 ml Alkalische Phosphatase-Puffer bei RT durchgeführt. Als Substrat wurden 66 μ l NBT- und 33 μ l BCIP-Lösung zugegeben und vermischt. Die Reaktion wurde nach Erreichen einer adäquaten Proteinbandenintensität durch Spülen mit großen Mengen bidestilliertem Wasser abgestoppt. Abschließend wurde die Membran an der Luft getrocknet und mittels eines Flachbettscanners am PC eingelesen.

2.3.21 „Pulse-Chase-Labeling“-Assay zur radioaktiven Markierung von Proteinen

Stabil mit humanem wt-, G114V- oder A117V-PrP transfierte SH-SY5Y-Zellen wurden in Zellkulturschalen ausgesät und zur Methionin-Depletion für 40 min in Starve-Medium (DMEM ohne L-Methionin) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen kurz mit PBS gewaschen und für 20 min in Pulse-Medium (Starve-Medium mit 200 μCi L- ^{35}S]Methionin/ml; RedivueTM L- ^{35}S]Methionin, *in vivo* cell labeling grade; Amersham, Freiburg) inkubiert. Das Pulse-Medium wurde abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und für die gewünschte Chase-Zeit (0-80 min) mit Chase-Medium (DMEM mit 5 x Überschub an nicht radioaktivem L-Methionin) inkubiert. Danach wurde der Metabolismus der Zellen durch Inkubation bei 4°C gestoppt. Bis zu diesem Zeitpunkt der Chase-Phase an die Zelloberfläche transportiertes PrP wurde durch Inkubation der Zellen in PIPLC-haltigem Medium (1 U/ml Medium, 30 min bei 4°C) abgelöst, mittels des Antikörpers 3F4 immunopräzipitiert und anschließend im WesternBlot aufgetragen. Nach Ablösung des Oberflächen-PrPs wurden die Zellen lysiert. PrP wurde aus dem Zelllysat immunopräzipitiert (3F4) und im WesternBlot analysiert. Nach dem Gel-Lauf wurde das Gel für etwa 30 min in Fixierungslösung und anschließend zur Signalverstärkung für 15-30 min in AmplifyTM Fluorographic Reagent inkubiert. Das Gel wurde auf Filterpapier gelegt und im Vakuumtrockner (60-80°C für ca. 1 h) getrocknet. Anschließend wurde das Gel in eine Expositionskassette überführt und in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm (Kodak BioMax MR) sowie eine Verstärkerfolie aufgelegt. Die Exposition erfolgte bei -80°C für 1-2 Wochen.

2.4 *in vitro*-Translations/Translokations-Assay („Ctm-Assay“)

Die eingesetzten Plasmide (pCINeo-huwt, -huG114V, -huA117V) wurden mittels des Restriktionsenzym *XbaI* linearisiert. Für die *in vitro*-Translation kam das TNT[®]Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega, Heidelberg) zum Einsatz.

Die Reagentien wurden auf Eis aufgetaut und wie folgt in ein steriles 1.5ml-Reaktionsgefäß gemischt:

TNT [®] Lysat	12.5 μl
TNT [®] Reaktions-Puffer	0.5 μl
Aminosäure-Mix (ohne Methionin), 1 mM	0.5 μl
RNasin Ribonuclease Inhibitor (40 U/ μl)	0.5 μl
TNT [®] T7 RNA Polymerase	0.5 μl
L- ^{35}S]Methionin (>1000 Ci/mmol), 10 mCi/ml	2.0 μl
Nuclease-freies H ₂ O	5.25 μl
Oligosaccharid-Akzeptor-Peptide, 10 mM	1.25 μl
linearisierte Plasmid-DNA, 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0.5 μl
<u>Canine Mikrosomale Membranen</u>	<u>1.5 μl</u>

Inkubation für 60 min bei 30°C

Für den PK-Protektions-Assay wurden 5 μl -Aliquots der Translations-Reaktion mit 250 μg PK/ml (-/+ 0.5 % Triton-X 100) in 50mM Tris-HCl (pH 7.5) und 1mM CaCl₂ für 60 min bei 4°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 5 mM PMSF gestoppt.

Für die Immunopräzipitation wurden die Ansätze für 5 min bei 99°C in Anwesenheit von 1 % SDS aufgekocht, in 10 Volumen RIPA-Puffer mit Protease-Inhibitoren (PepstatinA und Leupeptin, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; PMSF, 5 mM) verdünnt, und mit den entsprechenden Antikörpern (3B5,

3F4 oder 12F10) sowie Protein A-Agarose-„beads“ inkubiert. Der WesternBlot erfolgte mittels eines 12 %igen Tris-Tricine-Gels und wurde analog des „Pulse-Chase-Labeling“-Assays (s. 2.3.20) durchgeführt.

3. Experimente und Ergebnisse

3.1 *in vivo*-Modellsysteme

3.1.1 Konstruktion von Klonierungs- und Expressionsvektoren

Zur Durchführung von *in vivo*-Analysen mutierter Prionproteine wurden Zellkultur-Modellsysteme etabliert. Murines und humanes PrP sollten sowohl in ihrer nativen Wildtyp (wt)- als auch in mutierten Formen in eukaryontischen Zellen exprimiert werden. Hierfür wurden verschiedene Plasmidkonstrukte generiert (Abb. 7). Darüber hinaus wurde durch das zusätzliche Konstruieren murin/humaner PrP-Chimären die Möglichkeit geschaffen, humane PrP-Mutationen auch in murinen Zellkultursystemen zu untersuchen.

Alle generierten Plasmide basieren auf dem Expressionsvektor pCINeo (Promega). Die Expression von murinem wt-PrP erfolgte mittels des Vektors pCiNeo-Mowt (Windl *et al.*, 1999b). Das in diesen Vektor eingefügte Maus-Prion-Protein-Gen kodiert an der polymorphen Aminosäureposition 128 (entspricht Aminosäure 129 bei humanem PrP) für Methionin.

Zur Generierung von pCINeo-MoG114V wurde durch Basensubstitution mittels „Site Directed Mutagenesis“ (s. Material & Methoden) im Vektor pCiNeo-Mowt das der humanen PrP-Sequenz an Aminosäureposition 114 entsprechende Basentriplett mutiert (GGG → GTT), was in einer Substitution von Glycin gegen Valin resultiert.

Als Ausgangsplasmid für die Generierung des Expressionsvektors mit humanem wt-PrP diente genomische DNA eines anonymen britischen Blutspenders, dessen kodierender Bereich des PrP-Gens PCR-amplifiziert und in einen Klonierungsvektor einligiert worden war. Aus diesem Plasmid (Windl *et al.*, 1996) wurde der ORF („open reading frame“) von humanem PrP (*PRNP*) mittels der Restriktionsenzyme *XbaI/XhoI* ausgeschnitten und in den analog geöffneten Expressionsvektor pCINeo einligiert. Hierdurch entstand der so genannte Vektor pCINeo-huwt.

Für die Konstruktion von pCINeo-huG114V und pCINeo-huA117V wurde pCINeo-huwt innerhalb der *PRNP*-Sequenz mit *BstEII* (AS 187/188) und *Bsu36I* (AS 51/52) geöffnet. Bei humanem G114V-PrP führt die Basensubstitution GGT → GTT zum Austausch von Glycin gegen Valin. Zwei Basensubstitutionen, GCA → GTG, resultieren bei humanem A117V-PrP in einem Austausch von Alanin gegen Valin. Die *PRNP*-ORFs von Patienten (G114V und

A117V; DNA-Bank des Institutes für Neuropathologie, München) wurden PCR-amplifiziert und nach Restriktion mit *BstEII* und *Bsu36I* in den geöffneten pCiNeo-huwt einligiert.

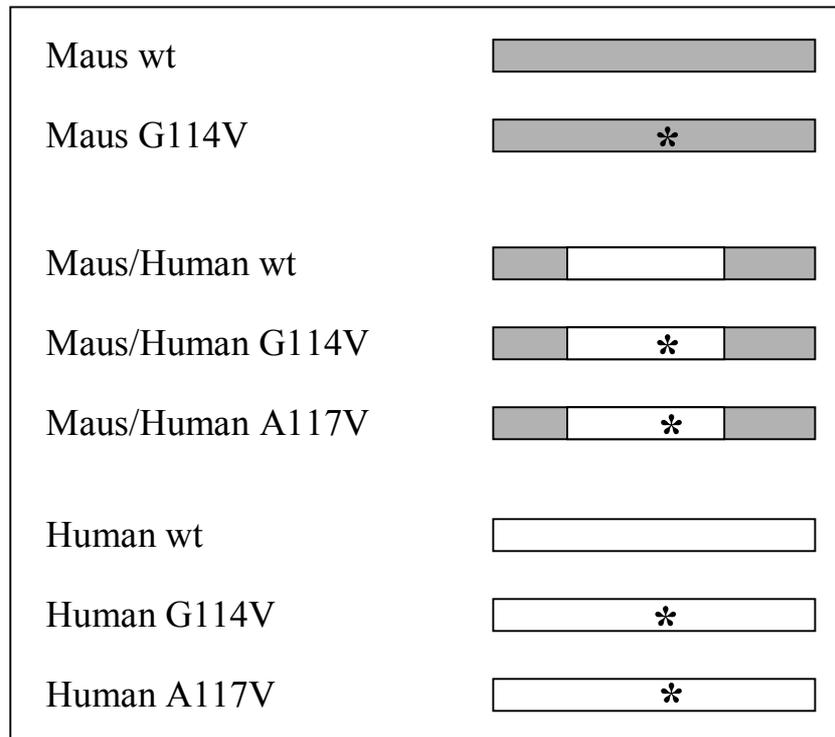


Abb. 7: Schematische Darstellung der Protein-kodierenden Bereiche der generierten PrP-Konstrukte

Die grau gefärbten Bereiche entsprechen den murinen, die weißen Bereiche den humanen PrP-Sequenzen.

„*“ symbolisiert die Punktmutationen G114V bzw. A117V.

Analog hierzu wurde für die Konstruktion der Maus/Human-Chimären der Vektor pCiNeo-Mowt mit *BstEII* und *Bsu36I* geöffnet und die humanen Sequenzbereiche innerhalb des Maus-*Prnp* eingefügt, um die Vektoren pCiNeo-MoHuw, pCiNeo-MoHuG114V und pCiNeo-MoHuA117V zu erhalten.

Sämtliche humanen wt- und G114V-Sequenzen kodieren an Aminosäureposition 129 für Methionin, während humanes A117V-PrP an Position 129 für Valin kodiert.

Abschließend wurden die PrP-kodierenden Bereiche sämtlicher Konstrukte mittels Sequenzanalyse (s. Material & Methoden) verifiziert.

3.1.2 Expression von wt-PrP und PrP-Mutanten in Neuroblastomzellen

Im Anschluss an die Konstruktion der Vektoren wurde die Expression der verschiedenen PrP-Mutanten in eukaryontischen Zellen untersucht und mit dem Expressionsmuster von wt-PrP verglichen. Hierfür wurden murine (N2A) und humane (SH-SY5Y) Neuroblastom-Zelllinien eingesetzt.

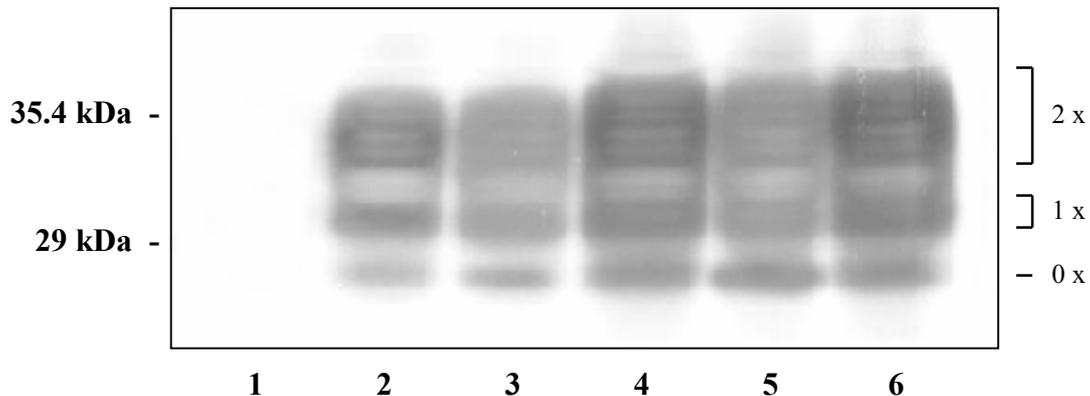


Abb. 8: „WesternBlot“-Analyse der Expression von Maus-PrP und Maus/Mensch-PrP-Chimären

In der SDS-PAGE wurden je Spur 100 µg Zellextrakt untransfizierter (Spur 1) bzw. transient transfizierter (Spur 2 - 6) N2A-Zellen aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen. Die immunochemische Detektion der Proteine erfolgte mit Hilfe des Antikörpers 3B5.

Auf der linken Seite ist das Molekulargewicht zweier Markerbanden abgebildet; rechts sind die Bereiche der drei verschiedenen Glykosylierungsformen angezeigt.

1 untransfiziert	4 Maus/Mensch wt
2 Maus wt	5 Maus/Mensch G114V
3 Maus G114V	6 Maus/Mensch A117V

N2A-Zellen wurden transient mit den Vektoren pCINeo-Mowt und pCINeo-MoG114V sowie pCINeo-MoHuw, pCINeo-MoHuG114V und pCINeo-MoHuA117V transfiziert und 48 h bis zur Präparation der Zellextrakte kultiviert. Die Proteine wurden in einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und durch einen immunologischen Nachweis mittels „WesternBlot“ untersucht. In unbehandelten N2A-Zellen waren unter den gewählten Expositionsbedingungen keine Signale nachweisbar (Abb. 8, Spur 1). Nach Transfektion mit PrP-Expressionskonstrukten zeigten sich positive Signale einer Molekulargewichtsgröße von 27-37 kDa (Spuren 2 - 6). Dabei waren sowohl bei den mutierten als auch den chimären PrP-Proteinen (Spuren 3 - 6) unterschiedliche Glykosylierungsstufen mit un- (0 x), einfach- (1 x) und doppelt-glykosylierten (2 x) Formen nachweisbar, die denen von wt-PrP (Spur 2) vergleichbar waren.

Die WesternBlot-Analyse zeigten außerdem, dass die Expression von PrP-Chimären, bei welchen der zentrale Bereich aus humanen Sequenzen besteht, auch in murinen Zellen möglich ist (Abb. 8, Spur 4 - 6).

Die rein humanen Prionproteine sollten in einem homologen Zellsystem untersucht werden. Daher wurde deren Expression durch transiente Transfektion von SH-SY5Y-Zellen getestet (Abb. 9). Zum Vergleich dienten zwei murine PrP-Konstrukte (Spur 2 + 3).

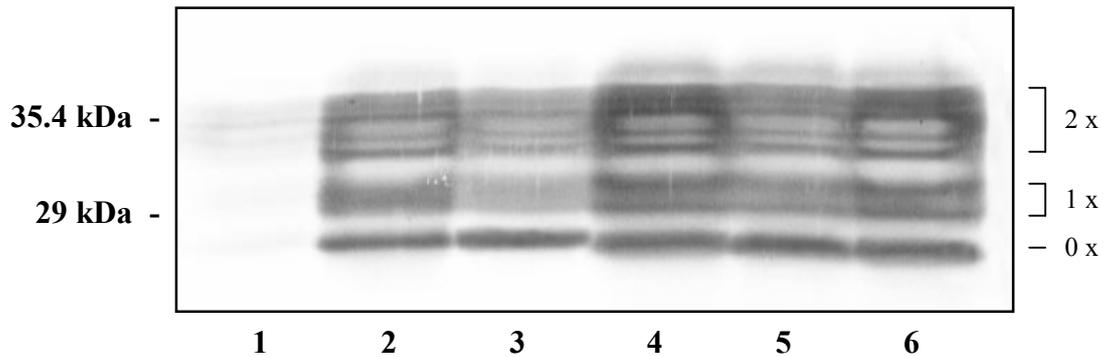


Abb. 9: Expression von Maus- und Mensch-PrP

Für die „WesternBlot“-Analyse wurden je 100 µg Zellextrakt untransfizierter (Spur 1) bzw. transient transfizierter (Spur 2 - 6) SH-SY5Y-Zellen in einer SDS-PAGE aufgetrennt und nach Übertragung auf eine PVDF-Membran mit Hilfe des Antikörpers 3B5 immunochemisch detektiert.

1 untransfiziert	4 Mensch wt
2 Maus wt	5 Mensch G114V
3 Maus G114V	6 Mensch A117V

Die Expression humaner PrP-Konstrukte in humanen Neuroblastomzellen (Abb. 9, Spur 4 - 6) ergibt ebenfalls ein Glykosylierungsmuster mit un-, einfach- und doppelt-glykosylierten Prionproteinen. Aus Abb. 9 wird auch ersichtlich, dass Maus-PrP in humanen Zellen exprimierbar ist (Spur 2 + 3).

Auffällig ist bei sämtlichen Transfektionen eine im Vergleich zu wt-, bzw. A117V-PrP schwächere Expression der ein- und zweifach glykosylierten G114V-PrP-Proteine, unabhängig davon, ob es sich hierbei um Maus- (Abb. 8 + 9, Spur 3), Human- (Abb. 9, Spur 5) oder chimäres PrP (Abb. 8, Spur 5) handelt. Gleichzeitig ist bei diesen G114V-PrP-Proteinen keine verringerte Expression der unglykosylierten Fraktion feststellbar. Durch Einsatz von Plasmid-DNA aus verschiedenen Präparationen konnte ein Artefakt aufgrund unterschiedlicher Qualität des eingesetzten Materials ausgeschlossen werden. Die Biosynthese der glykosylierten G114V-Prion-Proteine scheint sich demnach von der der wt- und A117V-Prion-Proteine zu unterscheiden.

3.1.3 Zytotoxische Effekte durch Langzeitexpression von mutiertem PrP

Transient transfizierte Zellen erlauben sehr hohe Expressionsniveaus der transfizierten Plasmide. Die Beobachtungsdauer ist jedoch auf wenige Tage beschränkt. Danach kommt es zu einem starken Abfall der Expression der transfizierten Plasmide. Durch stabil transfizierte Zellen lassen sich potentielle Effekte der Proteinexpression über lange Zeiträume beobachten. Die sehr konstanten Expressionsniveaus stabil transfizierter Zellen erleichtern darüber hinaus die Quantifizierung von Proteinmengen.

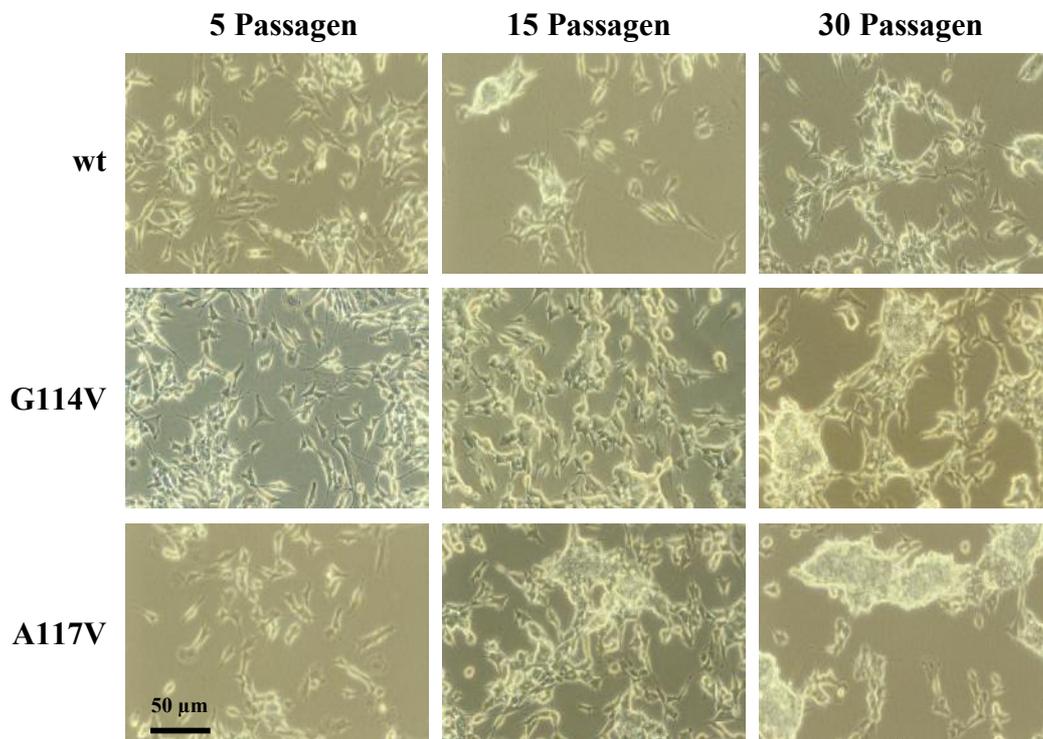


Abb. 10: Langzeitexpression von mutiertem humanem PrP resultiert in der Aggregation humaner Neuroblastomzellen

Stabil transfizierte SH-SY5Y-Zellen wurden über einen Zeitraum von 90 Tagen kultiviert. Die hierfür eingesetzten Klone zeigten vergleichbare PrP-Expressionsleistung. Nach 15 Tagen (5 Passagen), 45 Tagen (15 Passagen) und 90 Tagen (30 Passagen) wurden die Zellen fotografiert (100 x Vergrößerung).

Für Langzeitstudien wurden stabile Klone (s. Material & Methoden) der humanen Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y mit den humanen PrP-Konstrukten generiert. Eine Observation dieser stabil transfizierten humanen Zellen über einen Zeitraum von 90 Tagen offenbarte deutliche Unterschiede der Mutanten gegenüber wt-PrP (Abb. 10).

Im Verlauf der Langzeitkultivierung konnte bei den mutiertes PrP exprimierenden Zellen eine zunehmende Aggregation zu zusammenhängenden Zellverbänden beobachtet werden, welche mit verminderter Viabilität der Zellen einherging. Erste Anzeichen für eine beginnende

Aggregation waren nach etwa 40 Tagen Kultivierung erkennbar. Hierbei war die Neigung zur Aggregation bei A117V-PrP-exprimierenden Zellen stärker ausgeprägt als bei G114V-exprimierenden Zellen. Stabil wt-PrP-exprimierende Zellen hingegen zeigten auch nach 90-tägiger Kultivierung nur geringe Anzeichen von Zellaggregation und keine detektierbaren Anzeichen eines eingeschränkten Wachstums. In lichtmikroskopischen Analysen kernselektiv (HämalaunEosin-Färbung) gefärbter Zellen der G114V- und A117V-Langzeit-Klone ergaben sich Hinweise auf Karyorrhexis (Daten nicht gezeigt).

3.1.4 Analyse der proteolytischen Spaltung von PrP

Innerhalb des Metabolismus von PrP findet im zentralen Bereich des Moleküls eine Spaltung statt, welche in einem C-terminalen Spaltprodukt von etwa 18 kDa (nach Deglykosylierung) und einem N-terminalen Spaltprodukt von etwa 10 kDa resultiert. Die Spaltung erfolgt zwischen den AS 110 bis 112, was eine in dieser Region des Proteins vorhandene Erkennungssequenz für eine spezifische Protease nahelegt. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Mutationen G114V und A117V, welche in direkter Nähe der Spaltstelle lokalisiert sind, in einer Veränderung der Spaltungseffizienz resultieren.

Zur quantitativen Untersuchung der zellulären Spaltung von wt- als auch mutiertem Prion-Protein wurde sowohl das C- als auch das N-terminale Spaltprodukt detektiert. Das C-terminale Spaltprodukt umfaßt die Aminosäuren 111 oder 112 bis 231 und ist daher mit C-terminalen Antikörpern nachweisbar. Um quantitative Aussagen zu ermöglichen, wurden die Proteine vor dem WesternBlot mittels des Enzyms PNGaseF deglykosyliert. Das danach detektierbare Signal zeigt eine Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 28 kDa, welche die ungespaltene PrP-Fraktion darstellt sowie eine Bande bei ca. 18 kDa, welche das C-terminale Spaltprodukt repräsentiert (Abb. 11; Spur 2, 4, 6, 8). Darüberhinaus treten Banden im Bereich um 25 kDa auf, welche in geringerem Maße auch bei den nicht deglykosylierten Proben detektierbar sind und bei denen es sich vermutlich um Degradationsprodukte handelt. Die Auswertung des C-terminalen Spaltproduktes von wt-, G114V- und A117V aus mehreren unabhängigen Experimenten ergab keine sichtbaren Veränderungen der Spaltungseffizienz bei den mutierten Prion-Proteinen. Eine Quantifizierung des C-terminalen Spaltproduktes gestaltete sich bei diesen WesternBlot-Analysen jedoch als sehr schwierig, da kleine Unterschiede nur schwer zu beurteilen waren.

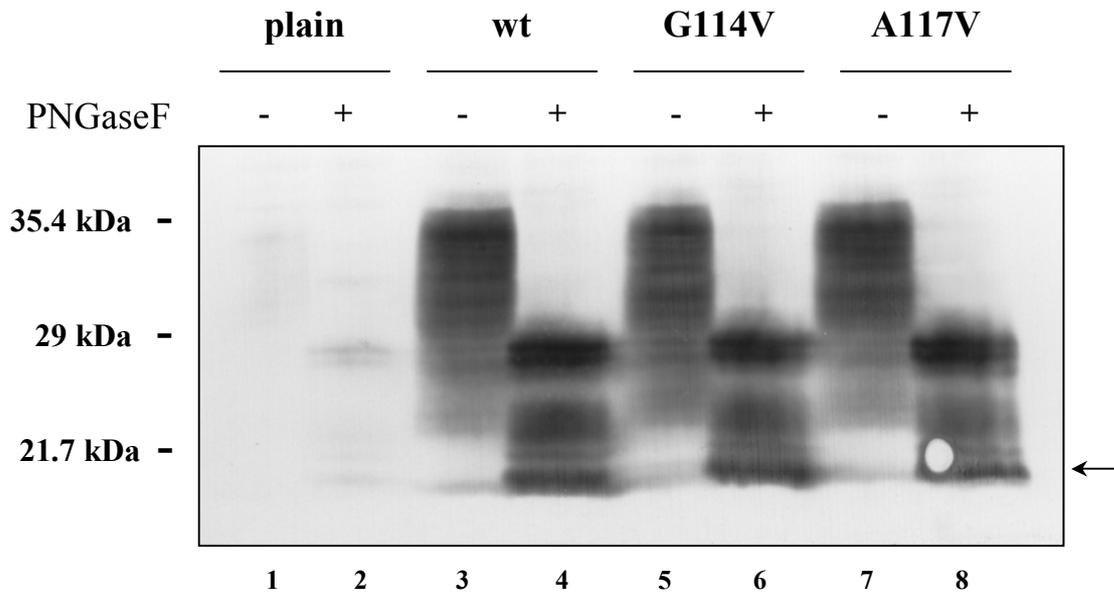


Abb. 11: Detektion des C-terminalen Spaltproduktes von humanem PrP in stabil transfizierten humanen Neuroblastomzellen

Aufgetragen wurden je 100 µg Zellextrakt untransfizierter (plain), bzw. stabil transfizierter SH-SY5Y-Zellen vor, bzw. nach Deglykosylierung. Die Detektion erfolgte mittels des AK 6H4. Der Pfeil markiert das C-terminale Spaltprodukt.

Das N-terminale Spaltprodukt ist in Zellhomogenaten nur sehr schwer detektierbar. Da es von den Zellen sekretiert wird, kommt es nicht zu einer Anreicherung innerhalb der Zelle. Des Weiteren könnte der N-terminale Bereich von PrP aufgrund fehlender Strukturierung sehr instabil sein und schnell von intrazellulären Proteasen abgebaut werden. Daher wurde versucht, das N-terminale Spaltprodukt im konditionierten Medium von Zellkulturen (s. Material & Methoden) nachzuweisen. Durch eine der Detektion vorangehende Immunopräzipitation von konditioniertem Zellkulturmedium mittels N-terminaler Antikörper sollten vorhandene N-terminale Spaltprodukte aufkonzentriert werden. Aufgrund des erwarteten geringen Molekulargewichtes von etwa 10 kDa erfolgte die elektrophoretische Auftrennung durch ein Tris-Tricine-Gel, welches im niedermolekularen Gewichtsbereich eine im Vergleich zum SDS-Gel deutlich bessere Auftrennung ermöglicht (s. Material & Methoden). Die Mutationen G114V und A117V führen zu einer starken Anreicherung des N-terminalen Spaltproduktes im Vergleich zu wt-PrP (Abb. 12).

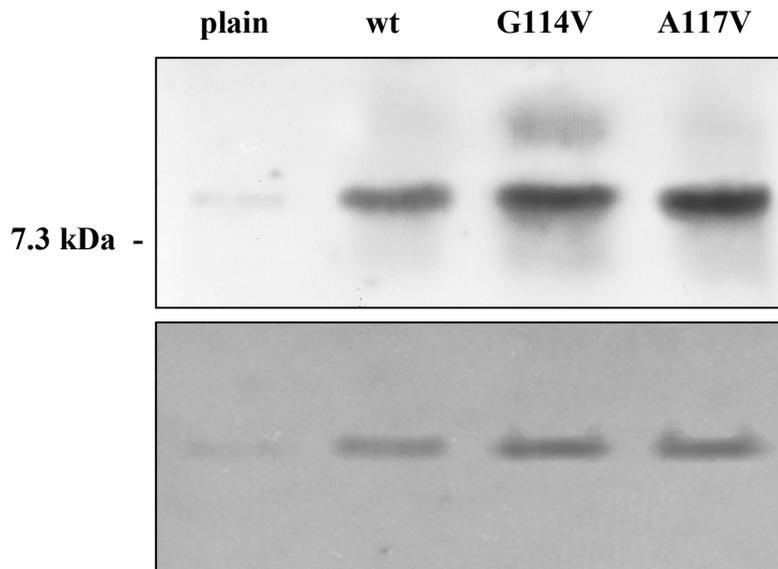


Abb. 12: Mutiertes PrP führt zu einer verstärkten Anreicherung des N-terminalen Spaltproduktes in konditioniertem Zellkulturmedium

Kulturmilieu (1 ml) untransfizierter (plain), bzw. stabil transfizierter SH-SY5Y-Zellen wurde 36 h konditioniert. Die Immunopräzipitation der N-terminalen Fragmente im konditionierten Medium erfolgte mit dem AK 3B5 (oben) bzw. SAF37 (unten), die Detektion im anschließenden WesternBlot mit dem AK SAF37 (oben) bzw. CDC1 (unten).

Diese verstärkte Anreicherung ist auch beim Einsatz unterschiedlicher Kombinationen von Antikörpern für die Immunopräzipitation und Detektion nachweisbar (vergl. Abb. 12 oben + unten), wodurch Artefakte auf Grund unterschiedlicher Affinität der Antikörper für die jeweiligen Spaltprodukte mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden können.

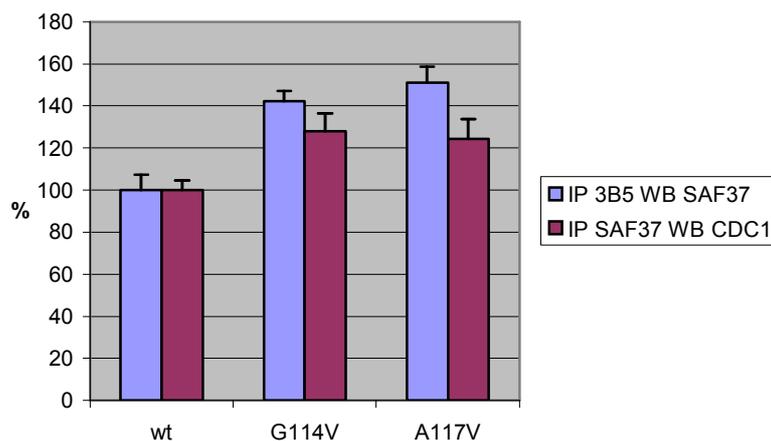


Abb. 13: Quantifizierung des N-terminalen Spaltproduktes

Das Balkendiagramm zeigt die quantitative Auswertung der Chemolumineszenz-Signale von analog Abb. 12 durchgeführten WesternBlot-Analysen für das N-terminale Spaltprodukt von wt-, G114V- und A117V-PrP. Die Meßdaten resultieren aus der Aufzeichnung von Chemolumineszenzsignalen vier unabhängiger WesternBlot-Analysen. Die bei wt-PrP detektierten Bandenintensitäten wurden für die jeweils eingesetzte AK-Kombination als 100%-Wert eingesetzt. Die Fehlerbalken entsprechen SD („standard deviation“).

Durch Quantifizierungen der Chemolumineszenz-Signale wurde eine Zunahme des N-terminalen Spaltproduktes bei G114V- als auch bei A117V-PrP um etwa 30 % ermittelt (Abb. 13). Dies zeigt, dass die Mutationen G114V und A117V Auswirkungen auf zelluläre Prozesse haben, welche die proteolytische Spaltung des Prion-Proteins beeinflussen.

3.2 Biochemische Charakterisierung von wt-PrP und PrP-Mutanten

3.2.1 Analyse der PK-Resistenz

Bei den meisten Prionerkrankungen ist die Entstehung der pathogenen Isoform PrP^{Sc} des Prionproteins nachweisbar. Für die Diskriminierung von PrP^C und PrP^{Sc} ist die erhöhte Resistenz von PrP^{Sc} gegenüber einer Proteolyse mittels Proteinase K (PK) das wesentliche Kriterium. Um diesbezüglich mögliche Unterschiede zwischen wt-PrP und den PrP-Mutanten zu ermitteln, wurden Proteinextrakte stabil transfizierter Zellen unterschiedlichen PK-Verdaubedingungen ausgesetzt.

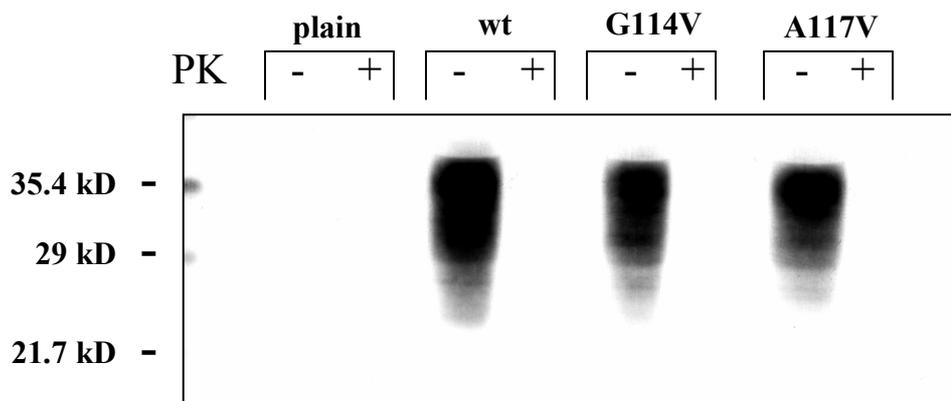


Abb. 14: Analyse der PK-Resistenz von wt-PrP und PrP-Mutanten

Proteinextrakte (100 µg) untransfizierter (plain), bzw. stabil transfizierter SH-SY5Y-Zellen wurden für 10 min bei 37°C mit PK (3.3 µg/ml) inkubiert. Die immunochemische Detektion im WesternBlot erfolgte mittels des Antikörpers 3F4.

Die gewählten PK-Verdaubedingungen bewirkten einen kompletten Abbau sowohl von wt- als auch von mutiertem PrP (Abb. 14). In einem weiteren Versuchsansatz wurden die Inkubationszeiten des PK-Verdaus verkürzt (Abb. 15), um auszuschließen, dass eine eventuell vorhandene, gering ausgeprägte PK-Resistenz auf Grund zu harter Verdaubedingungen nicht detektierbar war.

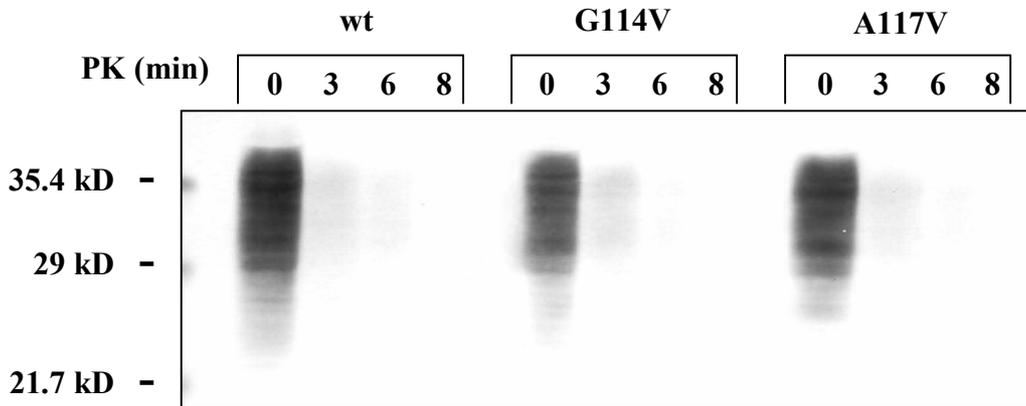


Abb. 15: Kinetik der PK-Resistenz

Proteinextrakte (100 µg) stabil transfizierter SH-SY5Y-Zellen wurden für 3, 6 oder 8 min bei 37°C mit PK (3.3 µg/ml) inkubiert. Die immunochemische Detektion erfolgte mittels des Antikörpers 3F4.

Aus der WesternBlot-Analyse wurde ersichtlich, dass wt-PrP eine sehr gering ausgeprägte PK-Resistenz besitzt und unter den gewählten Inkubationsbedingungen bereits nach wenigen Minuten vollständig degradiert wurde. Die Mutationen G114V und A117V bewirkten unter diesen Versuchsbedingungen keinerlei Veränderung der PK-Resistenz.

3.2.2 Analyse der Detergenzlöskeit

Neben erhöhter Resistenz gegenüber Protease-Verdau ist die gesteigerte Unlöslichkeit in nicht-denaturierenden Detergenzien ein weiteres für PrP^{Sc} charakteristisches Merkmal (Taraboulos *et al.*, 1990, 1992, 1995; Lehmann & Harris, 1996a + b). Eine Analyse der Detergenzlöslichkeit sollte klären, ob G114V- bzw. A117V-PrP bezüglich dieser biochemischen Eigenschaft Unterschiede zu wt-PrP aufweisen.

Unter den Bedingungen des „Detergenz-Löslichkeits-Test“ verbleibt der größte Teil von wt- als auch von mutiertem PrP im Überstand („supernatant“) (Abb. 16 (a)+(b), Spuren 1, 3, 5, 7). Kleine Mengen an pelletiertem, Detergenz-unlöslichem PrP sind bei den Mutanten erkennbar (Abb. 16 (a)+(b), Spuren 6 + 8 im Vergleich zu Spur 4). Um eine bessere Quantifizierung zu ermöglichen, wurden die verschiedenen Fraktionen in einem der Versuchsansätze vor der WesternBlot-Analyse zusätzlich deglykosyliert (Abb. 16 (b)).

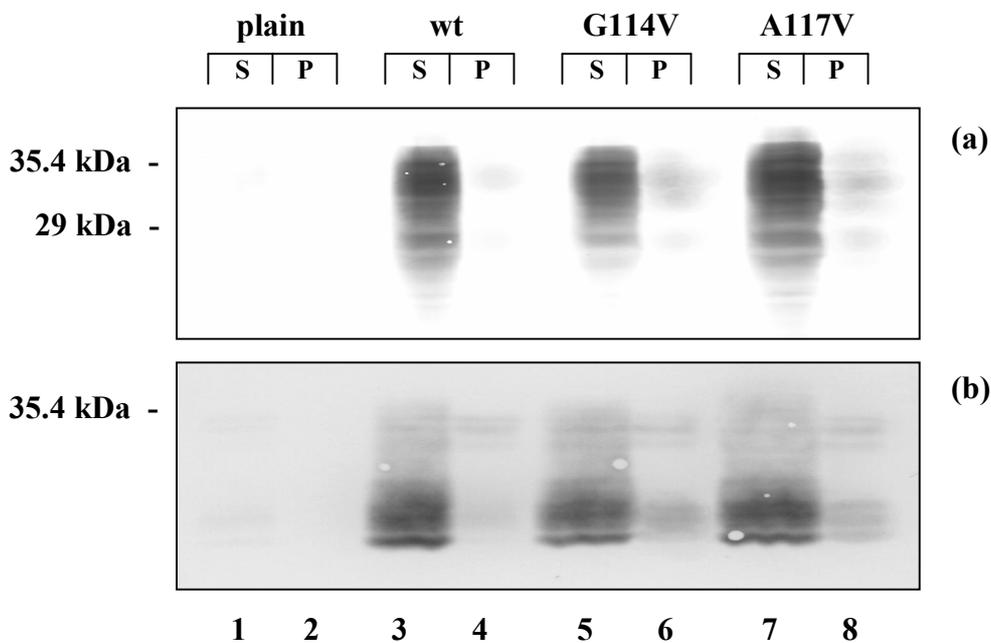


Abb. 16: Verringerte Detergenz-Löslichkeit von mutiertem PrP

(a) Pro Ansatz wurden 100 µg Gesamtzellhomogenat untransfizierter (plain), bzw. stabil transfizierter SH-SY5Y-Zellen einem „Detergenz-Löslichkeits-Test“ (s. Material & Methoden) unterzogen und mittels Ultrazentrifugation in eine lösliche (S, „supernatant“) und eine unlösliche (P, „pellet“) Fraktion aufgetrennt.

(b) Die Proben dieses WesternBlots wurden vor dem Auftrag mittels PNGaseF deglykosyliert. Für die Detektion von PrP wurde in beiden WB der Antikörper 3F4 eingesetzt.

3.3. Studien zur zellulären Lokalisation

3.3.1 Mutiertes PrP zeigt verringerte Expression auf der Zelloberfläche

Um die zelluläre Lokalisation der transfizierten PrP-Moleküle analysieren zu können, wurden Immunfluoreszenzfärbungen an fixierten Zellen durchgeführt. Der Großteil von korrekt prozessiertem PrP ist mittels eines Glykosylphosphatidylinositol-„Ankers“ (GPI) auf der extrazellulären Seite der Zellmembran verankert. Diese PrP-Moleküle sollten daher von zugegebenen Anti-PrP-Antikörpern gebunden werden. Eine nicht durch Behandlung mit Detergenzien permeabilisierte Plasmamembran schirmt den zytoplasmatischen Raum gegen das Eindringen von Antikörpern ab und verhindert eine Signalentstehung durch intrazelluläre Bindungen.

Die Studien der zellulären Lokalisation wurden mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie durchgeführt. Dabei kamen primär Maus-Human-PrP-Chimären zum Einsatz (s. Abb. 7), wodurch gewährleistet wurde, daß die für den Transport sowie die intrazelluläre

Prozessierung wichtigen N- und C-terminalen Sequenzbereiche des Prion-Proteins murinen Ursprungs und somit konform dem verwendeten murinen Zellsystem (N2A-Zellen) waren. Ein rein humanes System (humanes PrP in humanen Zellen) war aufgrund der besonderen Form der zur Verfügung stehenden humanen Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y, welche einen stark abgeflachten Zellkörper besitzen, für konfokale Laserscanning-Analysen nicht zu realisieren. Konstante Transfektionseffizienzen wurden durch Überprüfung mittels parallel durchgeführter WesternBlot-Analysen analog transfizierter Zellen sichergestellt (Daten nicht gezeigt).

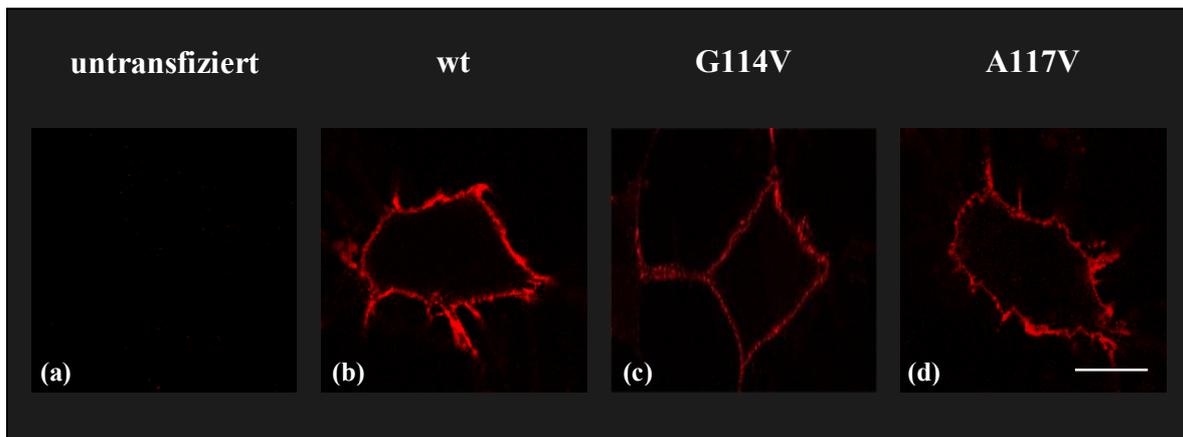


Abb. 17: Reduzierte Expression von mutiertem PrP auf der Zelloberfläche

Nach Immunfluoreszenzfärbung wurde die Lokalisation von PrP auf der Zelloberfläche mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie nachgewiesen. N2A-Zellen wurden transient mit Maus/Mensch-PrP-Chimären transfiziert und nach 48 h fixiert. Oberflächen-PrP wurde mit dem Antikörper 3F4 detektiert und mit einem „Texas Red“-gekoppelten Ziege-Anti-Maus-Sekundärantikörper visualisiert. Der Größenbalken entspricht 10 μm .

Bei untransfizierten N2A-Zellen (Abb. 17 (a)) ist kein Signal detektierbar. Dies ist ein Nachweis der extrem hohen Bindungsspezifität des verwendeten Antikörpers 3F4, welcher nur die humanen Sequenzbereiche der PrP-Chimären bindet.

Die Analyse der transient transfizierten Zellen ergab sowohl bei G114V- (Abb. 17 (c)) als auch bei A117V-PrP (Abb. 17 (d)) ein im Vergleich zu wt-PrP (Abb. 17 (b)) deutlich abgeschwächtes Oberflächensignal. Transiente Transfektionen von N2A-Zellen mit rein murinem G114V- bzw. wt-PrP und dem Nachweis mittels des Antikörpers 3B5 ergaben einen identischen Befund (Daten nicht gezeigt).

3.3.2 Analyse der enzymatischen Ablösbarkeit von Oberflächen-PrP: keine Unterschiede zwischen wt- und mutiertem PrP

Neben einer reduzierten Anzahl von an die Zelloberfläche transportierten mutierten PrP-Molekülen könnte die verringerte Signalintensität der Immunfluoreszenzfärbung auch auf Unterschiede in der Membranständigkeit zurückzuführen sein. Durch eine gegenüber wt-PrP veränderte Verankerung der mutierten PrP-Moleküle auf der Zelloberfläche könnte es zu sterischen Abschirmungen der Bindungsepitope der verwendeten Antikörper kommen. Zur Validierung der Oberflächenverankerung wurde ein weiterer Versuchsansatz mit analog transfizierten Zellen durchgeführt. Über einen GPI-„Anker“ auf der Membran befestigte Proteine, wie PrP, können mittels der Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PIPLC) von der Zelloberfläche abgelöst werden – eine Eigenschaft, welche bei mutierten PrP-Molekülen eingeschränkt sein kann (Lehmann & Harris, 1995 + 1997).

Auf intrazelluläres PrP, welches in diesem Versuchsansatz nachgewiesen wird, kann das nicht membrangängige Enzym PIPLC nicht einwirken. Nach Ablösung des auf der Membranoberfläche lokalisierten PrP in den exoplasmatischen Raum durch PIPLC ergibt die WesternBlot-Analyse des Gesamtzellhomogenates eine Abnahme der Signalintensität bei allen Proben (Abb. 18). Dies spricht für eine nativem PrP vergleichbare Verbindung der Maus/Mensch-PrP-Chimäre zur Zelloberfläche über einen GPI-„Anker“ und ist ein weiterer Hinweis darauf, dass auch Mutationen tragende PrP-Moleküle zu einem gewissen Anteil die intrazellulären Qualitätskontrollmechanismen passieren können und auf der Zelloberfläche verankert werden.

Da sich die Fraktion von mutiertem, an die Zelloberfläche transportiertem PrP wie wt-PrP enzymatisch mittels PIPLC abspalten läßt, ist die in Abb. 17 gezeigte Abschwächung der Immunfluoreszenzfärbung von mutiertem Oberflächen-PrP mit großer Wahrscheinlichkeit nicht auf verringerte Antikörperbindung durch sterische Abschirmung zurückzuführen. Ein gesteigerter Verbleib von mutiertem PrP innerhalb der Zelle ist daher naheliegend.

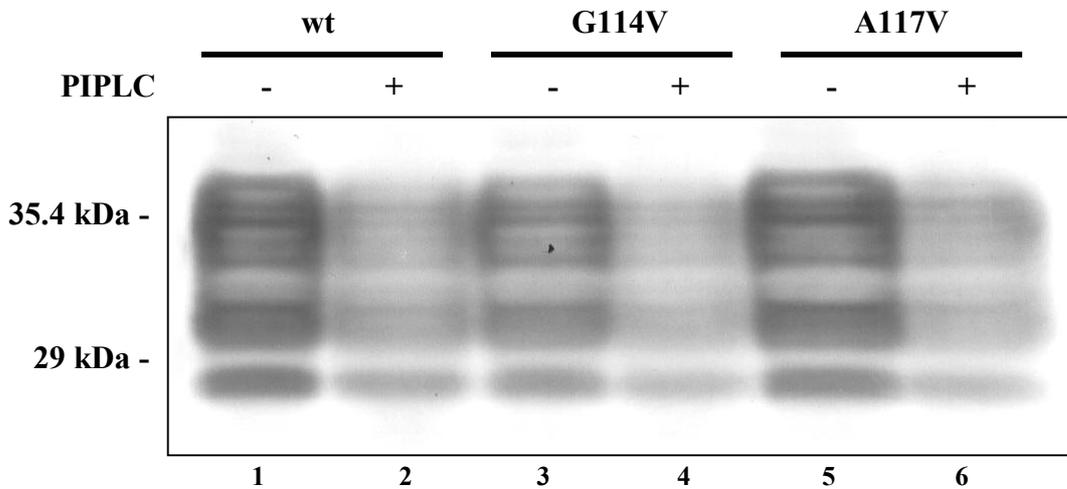


Abb. 18: Mutiertes PrP zeigt keine Veränderung der Abspaltbarkeit von der Zelloberfläche

Transient mit Maus/Mensch-PrP-Chimären transfizierte N2A-Zellen wurden in PIPLC-freiem, bzw. -haltigem Kulturmedium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, lysiert und je 100 µg Gesamtzellhomogenat für eine WesternBlot-Analyse aufgetragen. Die Detektion von PrP erfolgte mittels des Antikörpers 3F4.

3.3.3 Intrazelluläre Akkumulation der PrP-Mutanten

Wenn die Mutationen G114V und A117V zu einer verringerten Transporteffizienz an die Zelloberfläche führen, sollte der intrazelluläre Verbleib dieser PrP-Moleküle durch Immunfluoreszenzfärbung an permeabilisierten Zellen nachweisbar sein. Die Oberflächenpermeabilisierung fixierter Zellen erlaubt das Eindiffundieren von Antikörpern in den intrazellulären Raum. Die intrazelluläre Lokalisation von Antikörper-markiertem PrP wurde mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert.

Der intrazelluläre Nachweis von PrP ergibt bei transient mit wt-PrP transfizierten Zellen eine lokal konzentrierte Akkumulation von PrP (Abb. 19 (a)). In Folgeexperimenten konnte der Golgi-Apparat als Ort dieser PrP-Akkumulation identifiziert werden (s. Abb. 24). Es sind keine weiteren Signale, welche auf eine Lokalisation von intrazellulärem PrP im Nukleus oder Zytosol hindeuten, detektierbar.

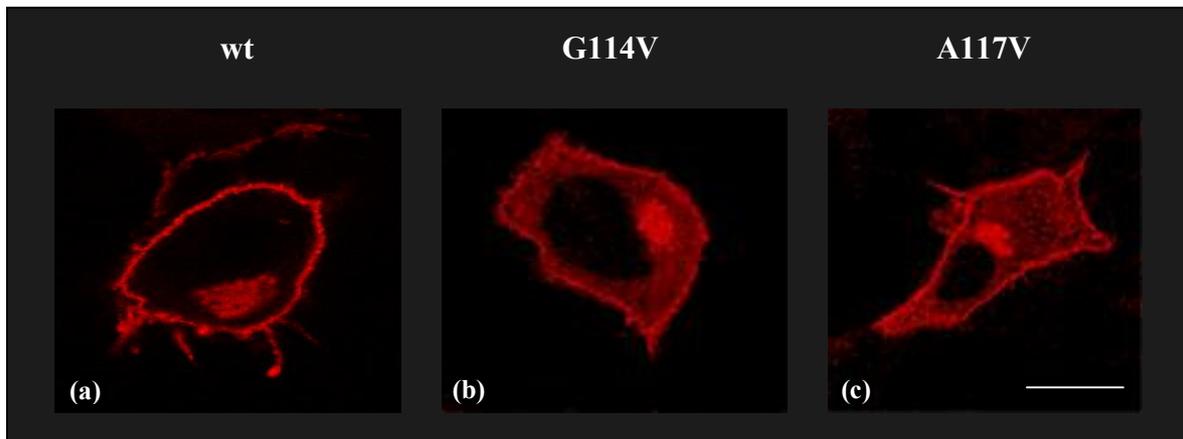


Abb. 19: Mutiertes PrP zeigt veränderte intrazelluläre Lokalisation

N2A-Zellen wurden transient mit Maus/Mensch-PrP-Chimären transfiziert. 48 h nach der Transfektion erfolgte die Fixierung und anschließende Permeabilisierung der Zellen. PrP wurde mit dem Antikörper 3F4 detektiert und mit einem „Texas Red“-gekoppelten Ziege-Anti-Maus-Sekundärantikörper visualisiert. Der Größenbalken entspricht 10 μm .

Mit G114V- bzw. A117V-PrP transfizierte Zellen zeigen ein deutlich von wt-PrP abweichendes Lokalisierungsmuster. Hier befinden sich die mutierten Proteine nicht ausschließlich in einem lokal klar abgegrenzten Akkumulationsbereich, sondern sind, mit Ausnahme des Nukleus, fast im gesamten intrazellulären Raum nachweisbar (Abb. 19 (b)+(c)). Das Verteilungsmuster zeigt neben großflächiger, „feiner“ Verteilung auch sehr viele granuläre Akkumulationen. Vergleichbare Verteilungsmuster wurden auch bei transient mit rein murinem wt- bzw. G114V-PrP transfizierten N2A-Zellen und dem Nachweis mittels des Antikörpers 3B5 beobachtet (Daten nicht gezeigt).

3.3.4 Lokalisationsstudien mittels PrP-Chimären mit inseriertem grünem Fluoreszenzprotein (GFP)

Chimären-Proteine mit integriertem grünem Fluoreszenzprotein (GFP) sind ein etabliertes Werkzeug für intrazelluläre Analysen des Transportes, der Lokalisierung und der Interaktionen von Proteinen (Miyawaki *et al.*, 1997; Tsien, 1998; Zaccolo *et al.*, 2000; Ivanova *et al.*, 2001; Negro *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001; Lorenz *et al.*, 2002). Bei sämtlichen bislang publizierten Chimären hatte die Integration des GFP in wt-PrP keine Auswirkungen auf die Prozessierung des Chimärenproteins – diese war vergleichbar der von reinem wt-PrP.

3.3.4.1 Generierung von GFP-PrP-Chimären

Bei der Generierung der GFP-PrP-Chimären wurde auf Sequenzbereiche des Vektors pGFP-wtPrP (Lorenz *et al.*, 2002) zurückgegriffen. In diesem Vektor ist die GFP-Mutante S65T, bei welcher sowohl das Start- als auch das Stopkodon deletiert wurden, zwischen den Aminosäuren 39 und 40 von murinem PrP inseriert. Der Vektor pGFP-wtPrP ist Bestandteil eines induzierbaren, nur bei simultaner Koexpression des entsprechenden Tetrazyklin-abhängigen Transaktivators funktionellem Expressionssystems.

GFP und die flankierenden murinen PrP-Sequenzen wurde mittels *PflMI* und *Bsu36I* aus dem Vektor pGFP-wtPrP ausgeschnitten und in die analog geöffneten Vektoren pCiNeo-Mowt, pCiNeo-MoG114V, pCiNeo-MoHuw, pCiNeo-MoHuG114V und pCiNeo-MoHuA117V einligiert (Abb. 20). Abschließend wurden die Konstrukte durch eine Sequenzanalyse überprüft.

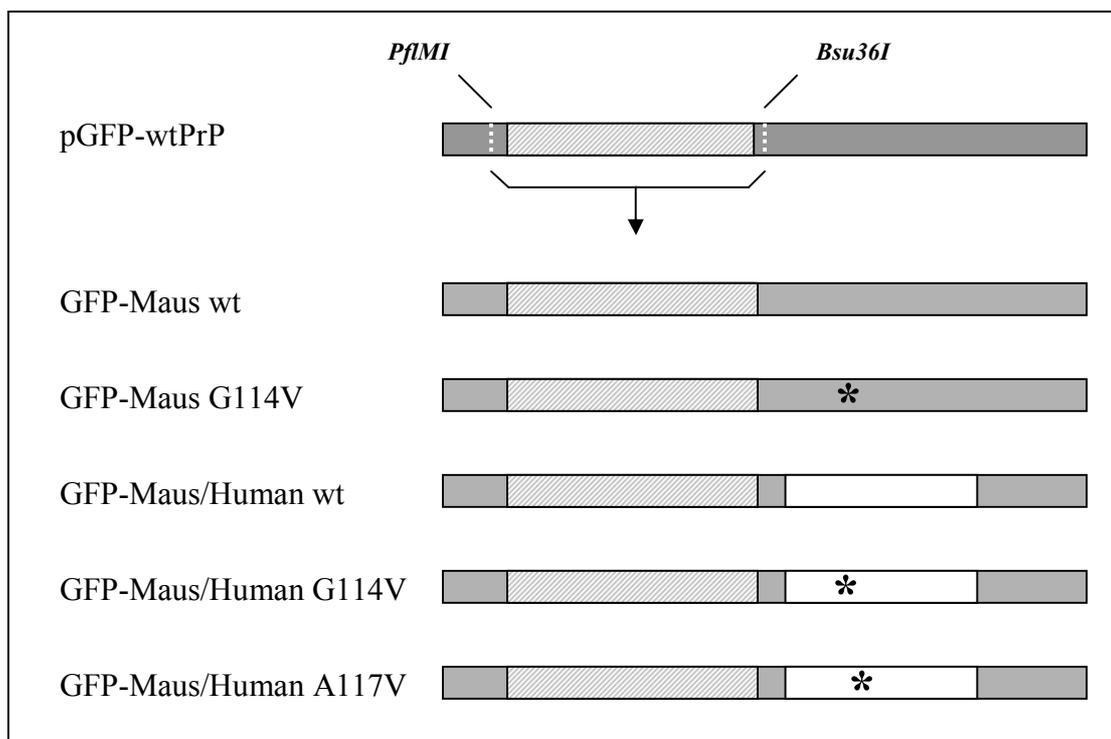


Abb. 20: Schematische Darstellung der generierten GFP-PrP-Konstrukte

Dargestellt ist der für die Gewinnung der zu klonierenden GFP-Sequenz verwendete Vektor pGFP-wtPrP sowie die nach Einligierung in die entsprechenden Expressionsvektor-Konstrukte (vergl. Abb. 7) entstandenen GFP-PrP-Chimären.

Die grau gefärbten Bereiche entsprechen den murinen, die weißen Bereiche den humanen PrP-Sequenzen. Das inserierte GFP ist schraffiert dargestellt. „*“ symbolisiert die Punktmutationen.

3.3.4.2 GFP-PrP-Chimären werden in Neuroblastomzellen exprimiert

Die Expression der GFP-PrP-Chimären wurde in transient transfizierten N2A-Zellen analysiert.

Die WesternBlot-Analyse ermittelte für die GFP-PrP-Proteine Molekulargewichte von 48 - 58 kDa (Abb. 21). Diese entsprachen den sich aus der Addition der Molekulargewichte der PrP-Anteile und GFP ergebenden Größe.

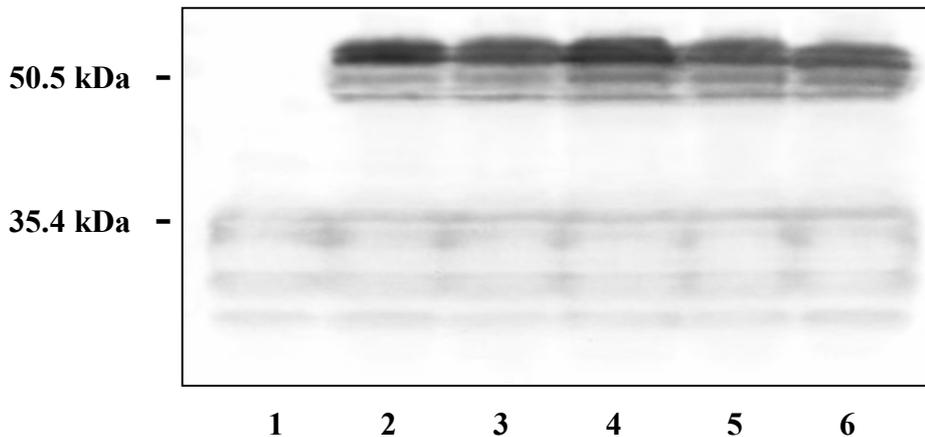


Abb. 21: Expression von GFP-PrP-Chimären in Neuroblastomzellen

Untransfizierte, bzw. mit verschiedenen GFP-PrP-Chimären transient transfizierte N2A-Zellen wurden nach 48 h Kultivierung lysiert. Aufgetragen sind je 100 µg Zellextrakt. Für die immunochemische Detektion wurde der Antikörper 6H4 verwendet.

- | | |
|----------------------|-----------------------------|
| 1 untransfiziert | 4 GFP-Maus-Mensch-wt-PrP |
| 2 GFP-Maus-wt-PrP | 5 GFP-Maus-Mensch-G114V-PrP |
| 3 GFP-Maus-G114V-PrP | 6 GFP-Maus-Mensch-A117V-PrP |

Die Proteinchimären zeigten ein Glykosylierungsmuster, das dem nicht-chimärer PrP-Proteine entsprach. Die Expression der Chimären hatte keinen erkennbaren Einfluß auf die Expression von endogenem PrP, da die Signale des endogenem PrPs (27 – 37 kDa) unverändert blieben.

Der Proteinnachweis mittels Anti-GFP-Antikörper erbrachte ein analoges Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

3.3.4.3 GFP-PrP-Mutanten zeigen eine intrazelluläre Akkumulierung vergleichbar der von PrP-Mutanten

Nach erfolgreichem Nachweis der Expression im WesternBlot sollte die zelluläre Lokalisation der GFP-PrP-Chimären mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie untersucht werden. Dazu wurden N2A-Zellen 48 h nach Transfektion fixiert und das in PrP integrierte GFP mittels Laserlicht ($\lambda = 488 \text{ nm}$) angeregt. Die emittierten Signale wurden bei vorgeschaltetem FITC-Filter detektiert. In Kontrollexperimenten wurden untransfizierte, bzw. mit PrP-Konstrukten ohne integriertem GFP transfizierte Zellen eingesetzt. Es traten dabei keine unspezifischen Hintergrundsignale auf (Daten nicht gezeigt).

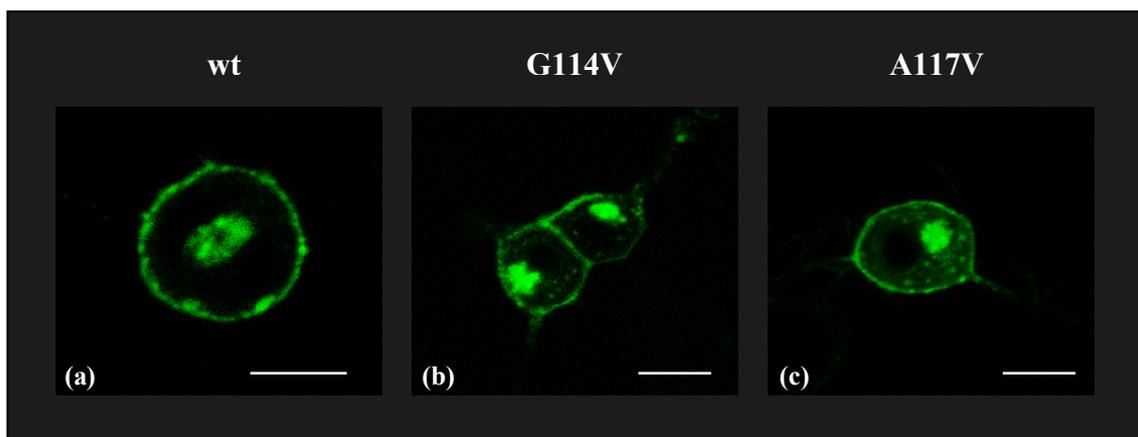


Abb. 22: Lokalisation von GFP-PrP-Chimären

Die intrazelluläre Lokalisation von GFP-Maus/Mensch-PrP-Chimären wurde 48 h nach Transfektion von N2A-Zellen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert. Die Größenbalken entsprechen $10 \mu\text{m}$.

Die Analyse der Verteilung von GFP-wt-PrP bestätigt sowohl die beschriebene Neutralität von in diesem Bereich von PrP integriertem GFP auf die Prozessierung der Chimärenproteine (Lorenz *et al.*, 2002) als auch die durch Immunfluoreszenzstudien (s. Abb. 17 + 19) detektierten Lokalisierungsmuster von wt-PrP: eine Akkumulierung findet ausschließlich auf der Zelloberfläche (Abb. 22 (a)) und in einem abgegrenzten intrazellulären Kompartiment, dem Golgi-Apparat, statt (vergl. Abb. 24 oben).

Nahezu völlige Übereinstimmung zu den Immunfluoreszenzstudien fand sich auch bei den GFP-Chimären-Proteinen mit mutiertem PrP. Mit Ausnahme des Nukleus umfasste die aberrante PrP-Verteilung den gesamten intrazellulären Raum und das Verteilungsmuster zeigte neben großflächiger, „feiner“ Verteilung auch sehr viele granuläre Akkumulationen (Abb. 22 (b)+(c)).

Transient mit GFP-Maus-wtPrP sowie GFP-Maus-G114V-PrP transfizierte N2A-Zellen ergaben vergleichbare Verteilungsmuster (Daten nicht gezeigt).

3.4 Analyse der zellulären Prozessierung

Zahlreiche Veröffentlichungen beschreiben einen Einfluß von Mutationen auf die zelluläre Prozessierung von PrP (Singh *et al.*, 1997; Negro *et al.*, 2001; Ivanova *et al.*, 2001; Ma & Lindquist, 2001; Lorenz *et al.*, 2002). Die bei den PrP-Mutanten G114V und A117V beobachtete, von wt-PrP abweichende Lokalisierung deutet ebenfalls auf eine veränderte Prozessierung der mutierten PrP-Moleküle hin.

Zur Überprüfung des zellulären Transports sowie der Prozessierung von GFP-wt-PrP und den GFP-PrP-Mutanten wurden mögliche Kollokalisierungen von PrP mit den Zellkompartimenten Endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat, Zytoplasma sowie Lysosomen mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie untersucht. Ein großer Vorteil der hierfür eingesetzten Chimären ist die direkte Markierung der Proteine durch die GFP-Insertion – Artefakte aufgrund unspezifischer Bindungen von Anti-PrP- bzw. entsprechender Sekundärantikörper werden vermieden. Die direkte Markierung von PrP ermöglicht insbesondere bei Kofärbungen eine Minimierung unspezifischer Signale.

Die zu analysierenden Zellkompartimente wurden mittels entsprechender spezifischer Markerfarbstoffe, bzw. Antikörper markiert, welche mit dem Fluoreszenzfarbstoff „Texas Red“ gekoppelt waren. Dieser rot emittierende Farbstoff wurde mit Laserlicht der Wellenlänge 543 nm angeregt und die Signale mit vorgeschaltetem TRITC-Filter detektiert.

3.4.1 PrP in Zellkompartimenten

Der sekretorische Transportweg von membranständigen Proteinen, wie PrP^C, führt über den ER/Golgi-Komplex. Durch Kollokalisationsstudien sollte der Aufenthalt von PrP in diesen Zellkompartimenten überprüft und eventuelle Abweichungen der PrP-Mutanten von wt-PrP nachgewiesen werden.

3.4.1.1 Mutiertes PrP ist verstärkt im Endoplasmatischen Retikulum detektierbar

Zur Analyse der Lokalisation von PrP im Endoplasmatischen Retikulum wurde eine Kolokalisationsstudie unter Verwendung eines gegen Strukturen des ER gerichteten Antikörpers (Anti-Calnexin) durchgeführt.

Durch Überlagerung der Signale aus der Immunfluoreszenzfärbung mit den Signalen der GFP-markierten PrP-Moleküle konnte gezeigt werden, dass die Kolokalisation von wt-PrP mit dem Endoplasmatischen Retikulum nur gering ausgeprägt ist (Abb. 23 oben). Dies steht in Einklang mit publizierten Daten und deutet auf eine korrekte Prozessierung dieser Moleküle hin (Ellgaard *et al.*, 1999; Negro *et al.*, 2001).

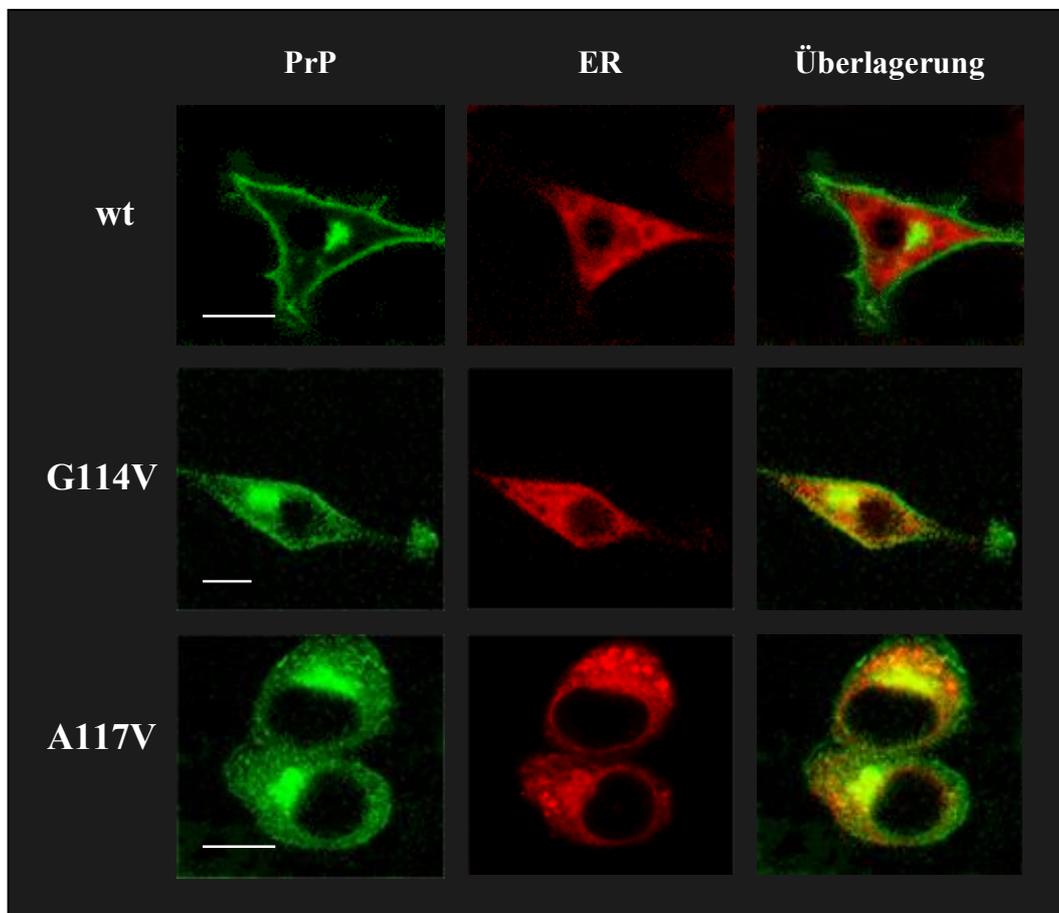


Abb. 23: Mutiertes PrP zeigt aberrante ER-Lokalisation

Die Lokalisation von GFP-Maus/Mensch-PrP-Chimären im Endoplasmatischen Retikulum (ER) wurde mittels Immunfluoreszenz an transfizierten N2A-Zellen (48 h nach Transfektion) mit einem ER-spezifischen Anti-Calnexin-Antikörper analysiert. Der verwendete Sekundär-Antikörper war „Texas Red“-gekoppelt. Die rechte Spalte zeigt die Überlagerung der beiden Fluoreszenz-Signale. Die Größenbalken entsprechen 10 μm .

Im Gegensatz zu wt-PrP war bei den Mutanten G114V und A117V eine stark ausgeprägte Kolokalisation mit Strukturen des Endoplasmatischen Retikulums nachweisbar (Abb. 23 Mitte + unten).

3.4.1.2 Mutiertes PrP zeigt Lokalisation außerhalb des Golgi-Komplexes

Kolokalisationsstudien von PrP mit dem Golgi-Apparat zeigten eine vollständige Lokalisierung von wt-PrP innerhalb des Golgi (Abb. 24 oben). Davon abweichend war mutiertes PrP auch außerhalb des Golgi-Komplexes nachweisbar (Abb. 24 Mitte + unten).

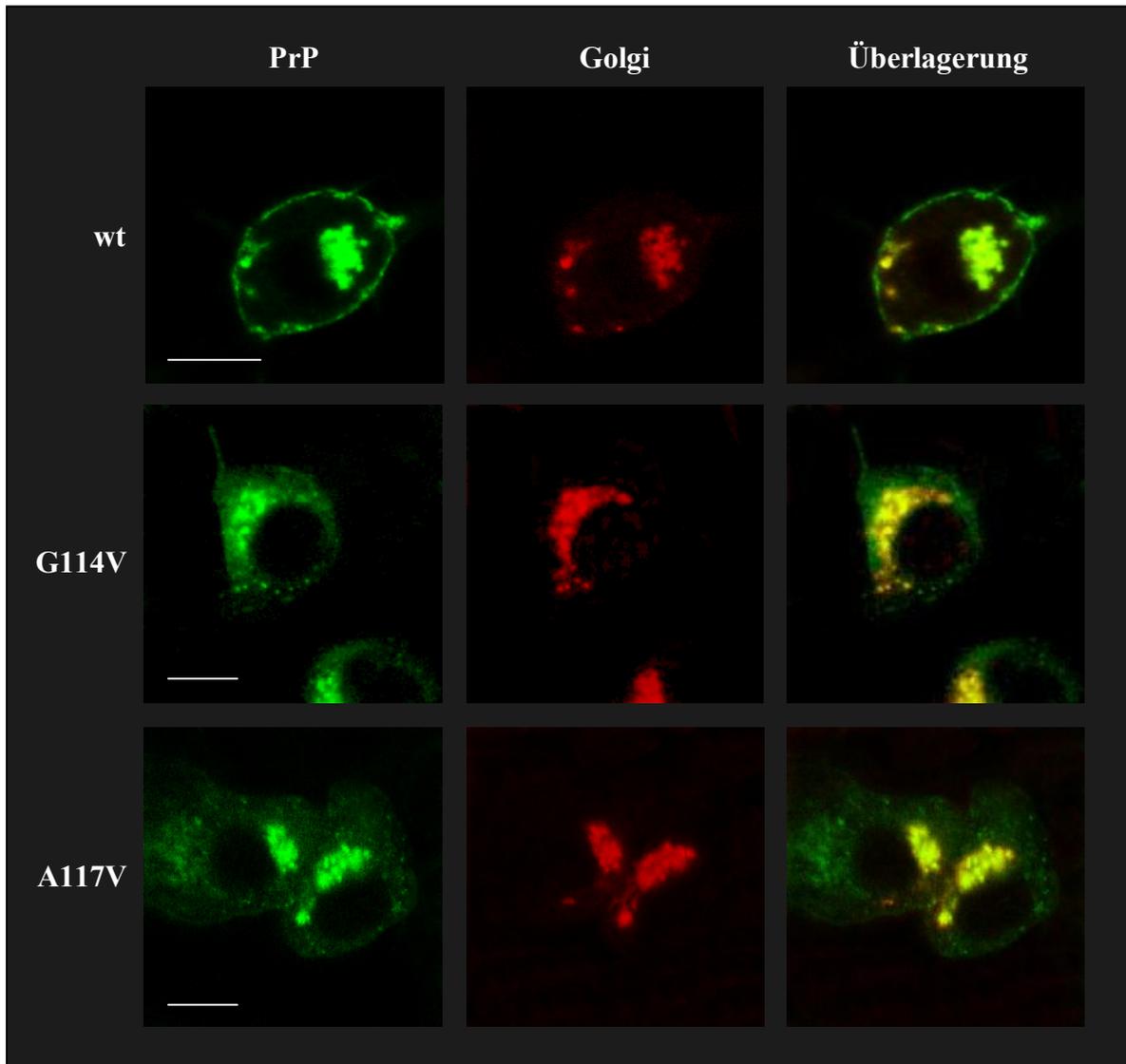


Abb. 24: Mutiertes PrP ist auch außerhalb des Golgi-Apparates lokalisiert

Der Golgi-Apparat von transient mit GFP-Maus/Mensch-PrP-Chimären transfizierten N2A-Zellen wurde 48 h nach Transfektion durch Inkubation mit dem Golgi-Marker „Ceramide-Bodipy Texas Red“ visualisiert. Die rechte Spalte zeigt die Überlagerung der beiden Fluoreszenzsignale. Die Größenbalken entsprechen 10 μ m.

Die Ergebnisse der ER/Golgi-Kolokalisationsstudien zeigten, daß der intrazelluläre Transport von mutiertem PrP Unterschiede zum Wild-Typ aufweist.

3.4.1.3 Akkumulation der Mutanten im Zytoplasma

Eine Markierung zytoplasmatischer Strukturen und anschließende Kolokalisationsstudie mit GFP-PrP sollte nachweisen, ob das außerhalb des Golgi-Apparates nachgewiesene mutierte PrP ins Zytoplasma transloziert wurde.

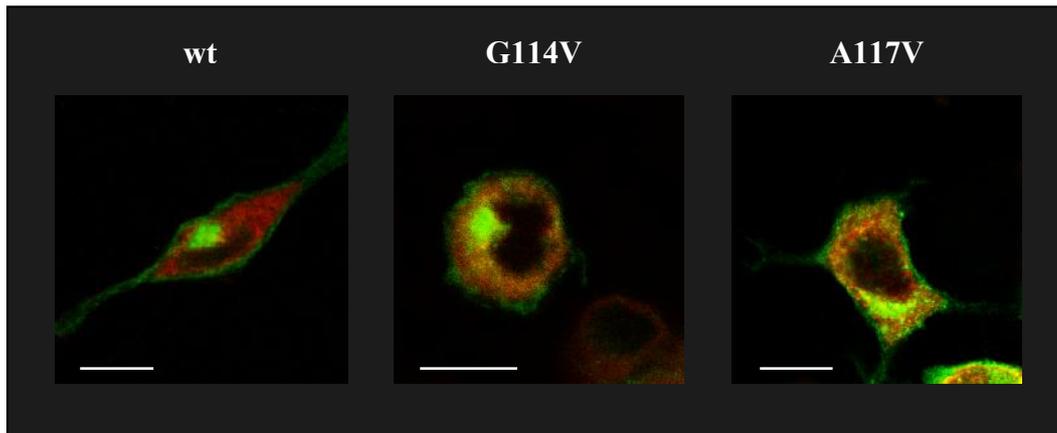


Abb. 25: Lokalisation von mutiertem PrP im Zytoplasma

Eine potentielle Lokalisation von GFP-Maus/Mensch-PrP-Chimären im Zytoplasma wurde mittels Immunofluoreszenz an transfizierten N2A-Zellen (48 h nach Transfektion) mit einem Anti-Hsc70-Antikörper analysiert. Der verwendete Sekundär-Antikörper war „Texas Red“-gekoppelt. Gezeigt ist die Überlagerung der Fluoreszenzsignale. Die Größenbalken entsprechen 10 μm .

Die Kolokalisationsstudie von GFP-PrP und dem Zytoplasma offenbart deutliche Unterschiede zwischen wt- und mutiertem PrP. Während wt-PrP fast keine Kolokalisation mit zytoplasmatischen Strukturen zeigt, ist sowohl bei G114V- als auch bei A117V-PrP eine stark ausgeprägte Kolokalisation nachweisbar (Abb. 25).

Wenn Proteine verstärkt ins Zytosol transportiert werden, ist dies oft ein Hinweis auf Fehler in der Synthese oder Faltung. Diese Proteine werden von den Qualitätskontrollmechanismen der Zelle für die Degradation aussortiert. Neben einem potentiellen proteasomalen Abbau dieser aussortierten Proteine im Zytosol ist auch eine Degradation durch Lysosomen möglich. Dies sollte durch eine weitere Kolokalisationsstudie (s. 3.4.1.4) analysiert werden.

3.4.1.4 Kein lysosomaler Abbau von PrP nachweisbar

Potentielle lysosomale Degradation von PrP sollte durch spezifische Markierung der Lysosomen und anschließender Kollokalisationsstudie nachgewiesen werden.

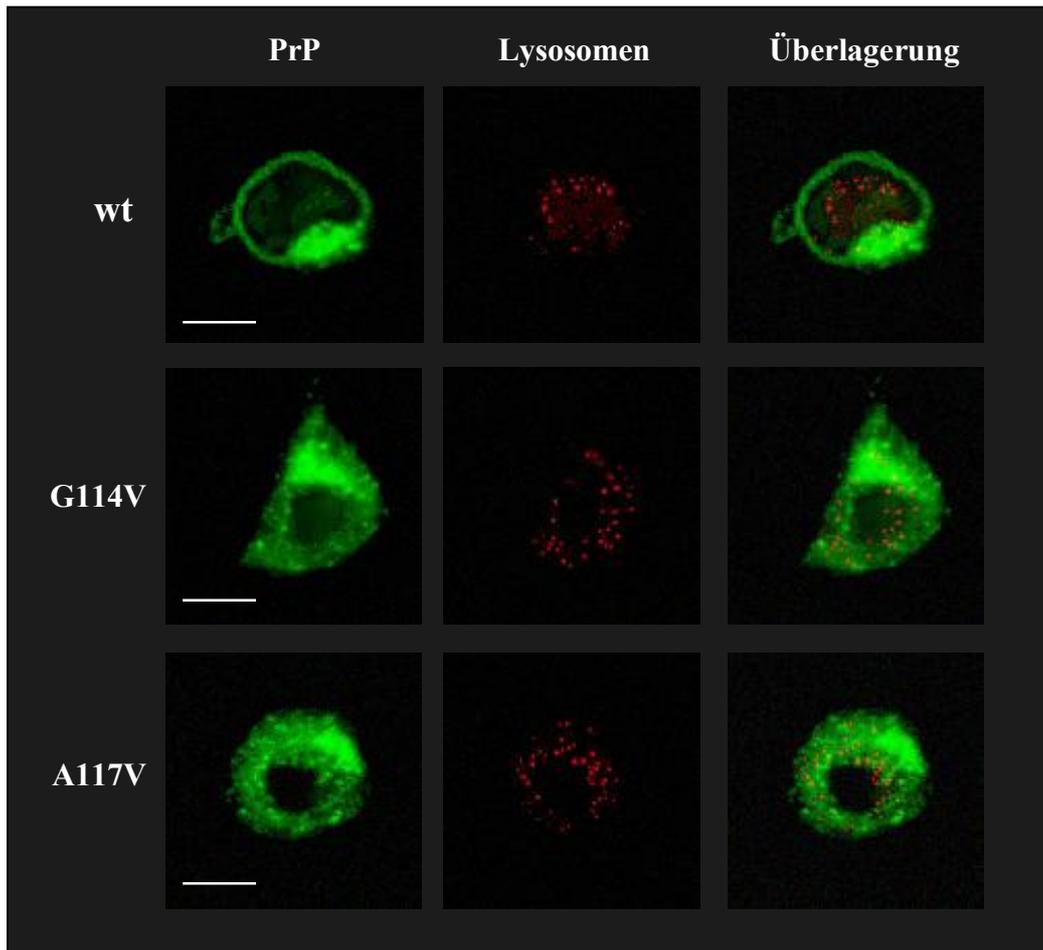


Abb. 26: PrP wird nicht in Lysosomen degradiert

Transient mit GFP-Maus/Mensch-PrP-Chimären transfizierte N2A-Zellen wurden zur Visualisierung von Lysosomen mit dem Markerfarbstoff „LysoTracker RED DND-99“ inkubiert und anschließend mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert. Die rechte Spalte zeigt die Überlagerung der beiden Fluoreszenzsignale. Die Größenbalken entsprechen 10 μm .

Sowohl bei wt- als auch bei mutiertem PrP ist keinerlei Kollokalisierung nachweisbar (Abb. 26), was keine verstärkte Degradation der PrP-Mutanten in den Lysosomen nahelegt. Wenn die verstärkte Akkumulation von mutiertem PrP im ER und Zytosol mit einer erhöhten Tendenz zum Proteinabbau einhergeht, würde dieser mit großer Wahrscheinlichkeit über einen proteasomalen Weg stattfinden. Dies sollte durch spezifische Inhibierung des proteasomalen Abbaus (s. 3.5) nachgewiesen werden.

3.5 Die Inhibierung der proteasomalen Degradierung offenbart Unterschiede in der zellulären Prozessierung von wt-PrP und PrP-Mutanten

3.5.1 Proteasomeninhibition führt zu starker Translokation von mutiertem PrP ins Zytoplasma

Durch spezifische Inhibierung des proteasomalen Abbaus sollte untersucht werden, ob wt-, bzw. mutiertes PrP über den ER-assoziierten Degradationsweg („ERAD“) abgebaut wird. Aufgrund der hohen Effizienz der proteasomalen Degradation findet gewöhnlich keine Akkumulation der abzubauenden Proteine statt, wodurch deren Nachweis unter nativen Bedingungen sehr schwierig ist. Durch Einsatz von Proteasomeninhibitoren kann der proteasomale Abbau verlangsamt, bzw. völlig unterbunden und somit eine Akkumulation von proteasomal abzubauenden Proteinen erreicht werden.

N2A-Zellen wurden mit GFP-Maus/Mensch-PrP-Chimären transfiziert. Nach 48 Stunden wurde der proteasomale Abbau durch 12-stündige Inkubation mit dem spezifischen Inhibitor ALLN (75 μ M) unterbunden. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden zytoplasmatische Strukturen durch Inkubation mit dem Antikörper Hsc70 markiert und anschließend durch einen Texas-Red-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert. Kolokalisationsstudien mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie zeigen eine partielle Kolokalisation von wt-PrP mit Strukturen des Zytoplasmas (Abb. 27 (a)). Dies zeigt, dass wt-PrP zu einem gewissen Anteil über ERAD aussortiert und zum proteasomalen Abbau in das Zytoplasma transloziert wird. Im Gegensatz hierzu akkumulieren die mutierten PrP-Proteine nach Proteasomeninhibition vollständig im Zytoplasma (Abb. 27, (b)+(c)).

Die ALLN-induzierte, vollständige Kolokalisation sowohl von G114V- als auch von A117V-PrP im Zytoplasma deutet darauf hin, dass diese Moleküle in weitaus stärkerem Maße als wt-PrP von den Qualitätskontrollmechanismen des Endoplasmatischen Retikulums aussortiert werden.

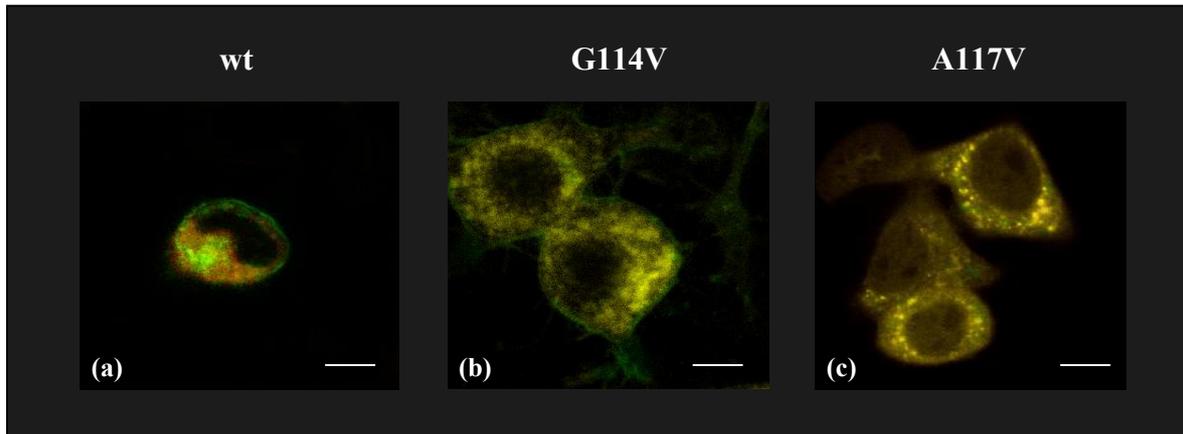


Abb. 27: Kolokalisationsstudie von PrP mit Strukturen des Zytoplasmas nach Proteasomeninhibierung.

Nach transienter Transfektion (48 h) von N2A-Zellen mit GFP-Maus/Mensch-PrP-Chimären wurde der proteasomale Abbau durch Inkubation (12 h) mit dem Inhibitor ALLN unterbunden. Zytoplasmatische Strukturen wurden mit dem Antikörper Hsc70 detektiert. Gezeigt ist die Überlagerung der Fluoreszenzsignale. Die Größenbalken entsprechen 5 μm .

3.5.2 Erhöhte Detergenzunlöslichkeit von PrP nach Inhibierung der proteasomalen Degradierung

Nach Inhibierung der proteasomalen Degradation werden PrP-Moleküle, welche die Mutation G114V bzw. A117V tragen, sehr viel stärker ins Zytoplasma transloziert als wt-PrP. Um zu klären, ob neben den beobachteten quantitativen Unterschieden auch Unterschiede in den biochemischen Eigenschaften der Proteine nachweisbar sind, wurde ein „Detergenz-Löslichkeits-Test“ (s. Material & Methoden) durchgeführt. Stabil humanes PrP exprimierende SH-SY5Y-Zellen wurden zwölf Stunden mit Brefeldin A (BFA) oder / und ALLN inkubiert. BFA ist ein Metabolit des Pilzes *Penicillium brefeldianum* und führt in Säugerzellen innerhalb von Minuten zu einer reversiblen Fusion der Golgimembranen mit dem ER. Dies resultiert in einem Stop des vesikulären Transportes sekretorischer Proteine aus dem ER (Misumi *et al.*, 1986; Oda *et al.*, 1987) und einer retrograden Rückführung der sich im Golgi befindlichen Proteine (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1989; Chardin & McCormick, 1999). Die Degradation von Proteinen via ERAD wird durch den Einsatz von BFA nicht beeinträchtigt (Klausner & Sitia, 1990; Zanusso *et al.*, 1999). Nach erfolgter BFA oder / und ALLN-Inkubation wurden die Zellen auf Eis lysiert und Zelltrümmer durch kurze Zentrifugation sedimentiert. Um potentiell vorhandenes, aggregiertes PrP von der löslichen Fraktion zu

trennen, wurde das Zelllysate nach Zugabe von Detergenz auf Eis inkubiert und die unlöslichen Proteinanteile in einer anschließenden Ultrazentrifugation sedimentiert. Die Glykosylierungsstufen der PrP-Moleküle wurden durch separate Inkubation mit PNGaseF analysiert (Daten nicht gezeigt). Abschließend wurden die löslichen und unlöslichen Fraktionen einer WesternBlot-Analyse unterzogen (Abb. 28).

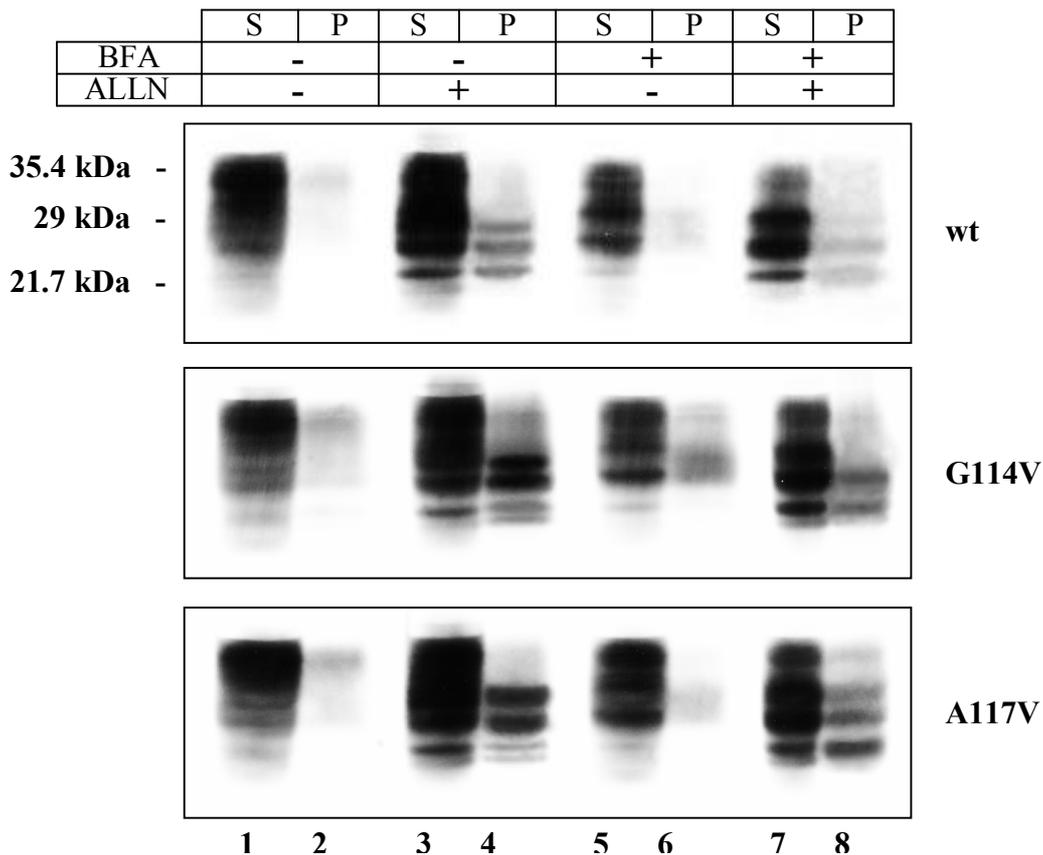


Abb. 28: Inhibition der proteasomalen Degradierung und des sekretorischen Transportes resultiert in verstärkter Detergenzunlöslichkeit von mutiertem PrP

Stabil humanes PrP exprimierende SH-SY5Y-Zellen wurden zwölf Stunden mit BFA (5 µg/ml) und / oder ALLN (75 µM) inkubiert. Nach Lyse und Detergenzbehandlung wurden je 100 µg Zellhomogenat mittels Ultrazentrifugation (265.000 x g, 40 min) in eine lösliche (S, „supernatant“) und eine unlösliche (P, „pellet“) Fraktion aufgetrennt. Für die Detektion von PrP im anschließenden WesternBlot wurde der Antikörper 3F4 eingesetzt.

In unbehandelten Zellen ist fast das gesamte PrP detergenzlöslich (Abb. 28, Spur 1). Bei den PrP-Mutanten G114V und A117V ist im Vergleich zu wt-PrP lediglich eine sehr gering ausgeprägte Erhöhung der Detergenzunlöslichkeit der zweifach-glykosylierten Moleküle nachweisbar (Spur 2). Nach Inkubation der Zellen mit ALLN kommt es zu einem Anstieg von löslichem PrP. Dieser Anstieg ist bei den einfach- und unglykosylierten Formen gut nachweisbar und tritt sowohl bei wt- als auch bei mutiertem PrP auf (Spur 3). Außerdem ist

nach ALLN-Inkubation das vermehrte Auftreten von Fragmenten von etwa 25 - 26 kDa in der löslichen Fraktion von wt- und mutiertem PrP nachweisbar (Spur 3). Diese Fragmente traten in sehr geringer Menge auch bei unbehandelten Zellen auf (Spur 1). Deutliche Unterschiede zwischen wt- und mutiertem PrP sind in den unlöslichen Fraktionen von ALLN-inkubierten Zellen zu beobachten (Spur 4). Es finden sich fast ausschließlich einfach- und unglykosylierte PrP-Moleküle. Diese Anteile sind bei mutiertem PrP stark erhöht. Die 25 – 26 kDa-Fragmente sind sowohl bei wt- als auch den PrP-Mutanten zu einem gewissen Anteil detergenzunlöslich (Vergl. Spur 3 und 4). Bei G114V- und A117V-PrP tritt darüber hinaus ein weiteres unglykosyliertes Fragment von etwa 22 kDa in der unlöslichen Fraktion auf (Spur 4).

Nach Inhibierung des PrP-Transportes vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat mittels Brefeldin A zeigte sich in der löslichen Fraktion eine leichte Reduktion der zweifach glykosylierten Formen bei gleichzeitiger Zunahme der einfach- und unglykosylierten Formen (Spur 5 im Vergleich zu Spur 1). Inkubation mit BFA führt lediglich bei G114V-PrP zu einer leichten Erhöhung der Detergenzunlöslichkeit (Spur 6).

Nach gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit BFA und ALLN ist bei wt-PrP in der löslichen Fraktion (Spur 7) eine sehr deutlich ausgeprägte Verlagerung hin zu den einfach- und unglykosylierten Formen nachweisbar. Im Gegensatz hierzu verbleibt bei den mutierten PrPs mehr zweifach-glykosyliertes PrP in der löslichen Fraktion (Spur 7). Auch in der unlöslichen Fraktion zeigen sich nach BFA/ALLN-Inkubation Unterschiede zwischen wt- und G114V bzw. A117V-PrP. Bei wt-PrP sind lediglich sehr geringe Mengen an unglykosyliertem PrP sowie des 23 kDa-Fragmentes detergenzunlöslich (Spur 8). Der Anteil dieser Moleküle ist in den unlöslichen Fraktionen von G114V- und A117V-PrP erhöht. Zusätzlich ist bei A117V-PrP eine geringe Menge an detergenzunlöslichem, einfach-glykosyliertem PrP nachweisbar.

Zusammenfassend kann sowohl bei wt- als auch bei mutiertem PrP ohne vorherige Inkubation mit ALLN keine, bzw. eine lediglich sehr gering ausgeprägte Detergenzunlöslichkeit nachgewiesen werden (Spuren 2 und 6). Nach ALLN-Inkubation kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Detergenzunlöslichkeit niederglykosylierter, bzw. fragmentierter PrP-Moleküle. Dieser Anstieg ist bei den Mutanten stärker ausgeprägt als bei wt-PrP (Spuren 4 und 8). Die alleinige Inkubation der Zellen mit BFA resultiert nicht in einem signifikanten Anstieg an detergenzunlöslichem PrP (Spur 6).

Das bei den PrP-Mutanten nach ALLN-Inkubation beobachtete Auftreten eines zusätzlichen Fragmentes von etwa 22 kDa in der unlöslichen Fraktion (Spur 4) deutet darauf hin, dass die Mutationen G114V und A117V nicht nur zu einem im Vergleich zu wt-PrP quantitativen

Anstieg der über ERAD abgebauten Moleküle, sondern auch zu Unterschieden bezüglich der zellulären Prozessierung führen.

Die Ergebnisse des kombinierten Einsatzes von Inhibitoren zur Unterbindung des vesikulären Transportes und des proteasomalen Abbaus zeigen, dass die beobachtete Zunahme an löslichem PrP (Spur 3) mit großer Wahrscheinlichkeit ein post-Golgi-Ereignis ist. Die Akkumulierung der unglykosylierten PrPs findet jedoch, zumindest teilweise, in einem prä-Golgi-Kompartiment statt (Spur 8). ERAD ist an der Degradierung dieses unglykosylierten PrPs beteiligt, wenn der proteasomale Abbau nicht inhibiert wird (Spur 2 + 6).

3.5.3 Für den proteasomalen Abbau bestimmtes PrP weist erhöhte PK-Resistenz auf

Das PrP, welches nach Proteasomeninhibition im Zytoplasma akkumuliert, besteht zu einem großen Anteil aus unglykosylierten Molekülen. Verschiedene unabhängige Studien haben gezeigt, dass diese unglykosylierten Proteine nicht nur eine größere Tendenz zur Fehlfaltung aufweisen (Parodi, 2000), sondern auch mit erhöhter Wahrscheinlichkeit in eine PrP^{Sc}-ähnliche Form konvertieren (Jackson *et al.*, 1999; Ma & Lindquist, 1999; Lehmann & Harris, 1997).

Ein Proteinase K-Verdau des Zellhomogenates von ALLN-inkubierten Zellen sollte klären, ob die Blockierung der proteasomalen Degradation Auswirkungen auf die Proteaseresistenz von wt- bzw. mutiertem PrP hat (Abb. 29). Unter den gewählten Verdaubedingungen (10 µg PK/ml, 30 min, 37°C) kommt es in unbehandelten Zellen zu einem vollständigen Abbau sowohl von wt- (Spur 2) als auch von G114V- (Spur 6) und A117V-PrP (Spur 10). Die Inkubation mit ALLN führt zur Bildung von PrP, welches diesen Verdau-Bedingungen widersteht. Bei wt- (Spur 4) und den mutierten PrPs (Spuren 8 und 12) resultiert der PK-Verdau in jeweils drei Fragmenten von 28 kDa, 26 kDa sowie 23 kDa. Jedoch liegen diese drei Fragmente in unterschiedlichen Verhältnissen zueinander vor. Bei wt-PrP ist das 28 kDa-Fragment deutlich stärker repräsentiert als die beiden Fragmente von 26 kDa und 23 kDa, welche in annähernd gleicher Menge vorliegen (Spur 4). Demgegenüber zeigen die PK-resistenten Fragmente der mutierten PrPs ein von wt-PrP abweichendes Intensitätenverhältnis. Die Menge der 28 kDa- sowie 23 kDa-Fragmente, welche in annähernd gleichem Verhältnis zueinander vorliegen (Spur 8 und 12), ist gegenüber wt-PrP (Spur 4) sehr stark erhöht.

Bemerkenswert ist, dass die nach PK-Verdau detektierbaren Fragmente bereits vor dem Verdau im Zellhomogenat nachweisbar sind (vergl. Spuren 3, 7 und 11 mit den Spuren 4, 8 und 12).

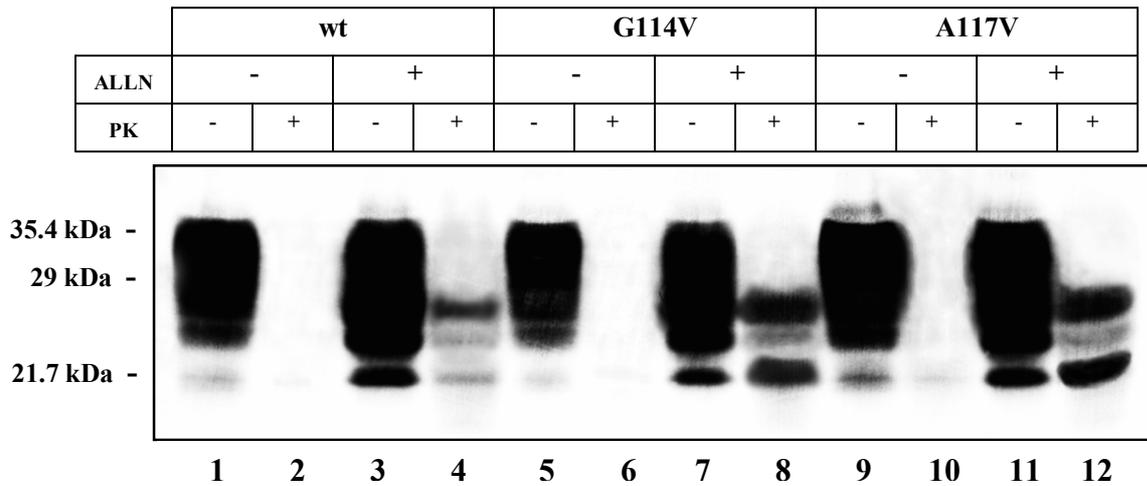


Abb. 29: Inhibierung der proteasomalen Degradierung führt zu erhöhter PK-Resistenz
 Pro Spur wurden 100 µg Zellhomogenat von stabil humanes PrP exprimierende SH-SY5Y-Zellen vor, bzw. nach Inkubation mit ALLN (12 h) einem PK-Verdau unterzogen (10 µg/ml, 30 min, 37°C). Die Detektion im WesternBlot erfolgte mittels des Antikörpers 3F4.

Die nach Inhibierung der proteasomalen Degradation stattfindende Akkumulation von PrP geht mit der Ausbildung einer gesteigerten PK-Resistenz einher, welche bei den Mutanten, und hier insbesondere bei bestimmten Glykoformen noch erhöht ist.

3.6 Expressionsstudien von PrP und PrP-Mutanten in infizierten Neuroblastomzellen

3.6.1 *in vivo*-Konvertierung von PrP^C zu PrP^{Sc} ist von der Sequenzhomologie abhängig

Die im Vergleich zu wt-PrP gesteigerte PK-Resistenz der mutierten PrP-Moleküle nach proteasomaler Inhibierung deutet darauf hin, dass die Mutationen G114V und A117V die Konversion in eine PK-resistente Isoform begünstigen.

Um zu klären, ob diese Mutationen die nach der Prionhypothese durch Interaktion mit PrP^{Sc} stattfindende Umfaltung in eine PK-resistente Form fördern, wurde ein Expressionsassay etabliert. In stabil mit Maus-adaptiertem PrP^{Sc} infizierten murinen Neuroblastomzellen

(ScN2A, s. Material & Methoden) wurden Maus-PrP sowie Maus/Mensch-PrP koexprimiert und nach entsprechender Inkubationszeit eine Analyse der PK-Resistenz durchgeführt.

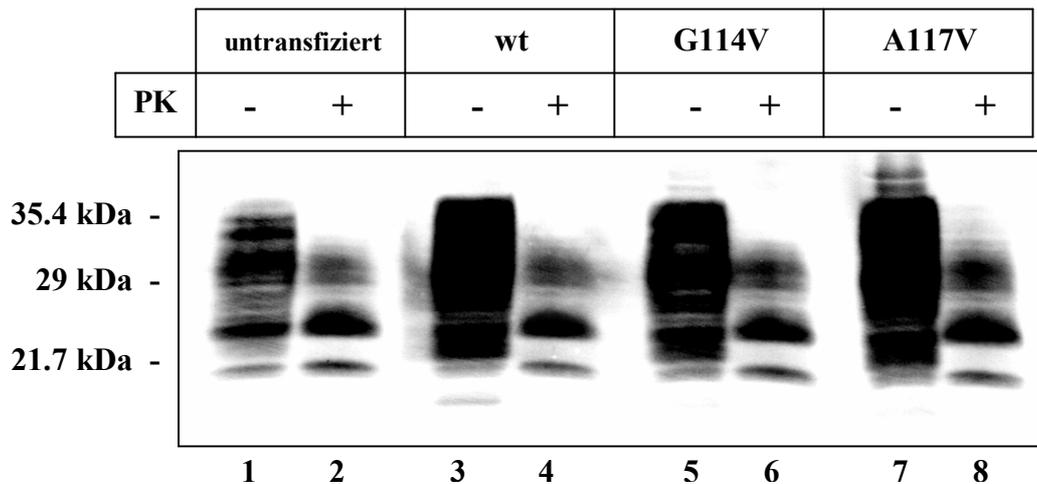


Abb. 30: Maus/Mensch-PrP-Chimären werden durch Expression in Scrapie-infizierten Zellen nicht in eine PK-resistente Form überführt

Stabil mit Maus-adaptiertem PrP^{Sc} infizierte N2A-Zellen wurden transient mit Maus/Mensch-PrP-Chimären transfiziert. Nach 48-stündiger Inkubation wurden je 100 µg Zellhomogenat einem PK-Verdau (10 µg/ml, 1 h, 37°C) unterzogen. Für die Detektion im anschließenden WesternBlot wurde der Antikörper 6H4 verwendet.

In Abb. 30 ist ein WesternBlot von ScN2A-Zellen nach transienter Transfektion mit Maus/Mensch-PrP-Chimären (s. Abb. 7) gezeigt. Die ScN2A-Zellen zeigen einen hohen Basalgehalt an PK-resistentem PrP (Spur 2), welches den gewählten, für Zellkultur-Analysen sehr harten Verdaubedingungen (10 µg/ml, 1 h, 37°C) widersteht. Trotz stattfindender Expression (Spur 3, 5 und 7 im Vergleich zu Spur 1) der transfizierten Chimären-PrPs ist keine Zunahme an PK-resistentem PrP nachweisbar (Spur 4, 6 und 8 im Vergleich zu Spur 2). Die Überführung von PrP^C in eine PK-resistente Isoform ist insbesondere von der Sequenzhomologie zwischen dem endogenen PrP^{Sc} und dem zu konvertierenden, exogenen Substrat-PrP abhängig (Kocisko *et al.*, 1994; Zulianello *et al.*, 2000). Die chimären Maus/Mensch-PrP-Moleküle und rein murines PrP unterscheiden sich an 13 Aminosäurepositionen voneinander. Da bereits eine Sequenzabweichung von nur einer Aminosäure die für eine Umwandlung notwendige Interaktion der beiden PrP-Isoformen beeinträchtigen kann (Priola *et al.*, 1994), liegt die nicht nachweisbare Konvertierung wahrscheinlich in den Sequenzunterschieden begründet.

3.6.2 Überführung von murinem PrP^C in eine PK-resistente Isoform durch Ko-Expression mit PrP^{Sc}

Durch Ko-Expression von rein murinem wt- bzw. G114V-PrP in ScN2A-Zellen (Abb. 31) sollte analysiert werden, ob die Nichtkonvertierbarkeit des chimären Maus/Mensch-PrP (Abb. 30) auf Sequenzunterschiede zwischen dem endogenen PrP^{Sc} und dem exogenen PrP zurückzuführen ist. Nach Transfektion von reinen Maus-PrP-Konstrukten in ScN2A-Zellen ist eine Zunahme an PK-resistentem PrP detektierbar. Diese ist bei G114V-PrP (Spur 6) etwas stärker ausgeprägt als bei wt-PrP (Spur 4) - in dem gewählten Versuchsansatz scheint die Mutation G114V eine Konvertierung in PK-resistentes PrP zu fördern.

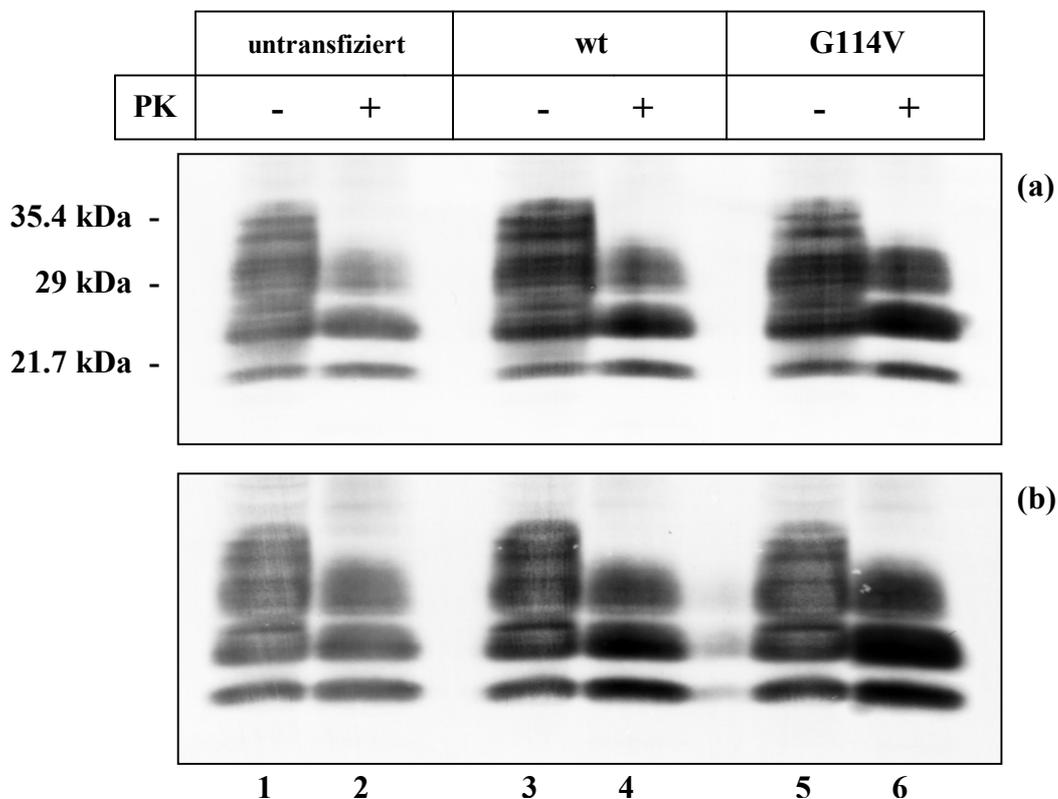


Abb. 31: Mutiertes Maus-PrP zeigt nach Expression in Scrapie-infizierten Zellen gesteigerte PK-Resistenz

Scrapie-infizierte N2A-Zellen wurden transient mit Maus-PrP transfiziert. Nach 48-stündiger Inkubation wurden je 100 µg Zellhomogenat einem PK-Verdau (10 µg/ml, 1 h, 37°C) unterzogen. Für die WesternBlot-Analyse kamen der Antikörper 6H4 (a), bzw. Ra3153 (b) zum Einsatz.

Um die Wahrscheinlichkeit möglicher Artefakten aufgrund unterschiedlicher Antikörperaffinität zu minimieren, wurden gegen unterschiedliche Epitope gerichtete Antikörper aus verschiedenen Spezies für die WesternBlot-Analysen eingesetzt (6H4 : monoklonaler Maus-Anti-PrP-Antikörper (Abb. 31 (a)); Ra3153 : polyklonaler Kaninchen-Anti-PrP-Antikörper

(Abb. 31, (b))). Eine Unterscheidung zwischen endogenem und transfiziertem PrP ist in diesem Ansatz jedoch nur bedingt über einen quantitativen Vergleich möglich. Daher kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass die Zunahme an PK-resistentem PrP auf eine durch die transiente Transfektion stimulierte Produktion an endogenem PrP^{Sc} zurückzuführen ist.

3.6.3 Hinweise auf amyloide Strukturen in Scrapie-infizierten Neuroblastomzellen

Ein gemeinsames Merkmal aller Patienten, welche eine der mit dem Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) assoziierten Mutationen (u.a. A117V) auf dem *PRNP*-Gen tragen, ist die Akkumulation sog. amyloider Plaques im Hirngewebe. Amyloide Plaques entstehen durch die Aggregation von amyloiden Fibrillen. Sie gehen mit bestimmten Farbstoffen eine feste Bindung ein und erlangen dadurch anisotrope Eigenschaften. Einer dieser Farbstoffe, Thioflavin S, interagiert spezifisch mit der quartären β -Faltblatt-Struktur der amyloiden Fibrillen (Schwartz, 1968) und zeigt bei Anregung mit UV-Licht ($\lambda = 410\text{nm}$) eine grüne Fluoreszenz von Amyloid.

Ob amyloide Strukturen, wie sie im Hirnmaterial von GSS-Patienten nachweisbar sind, auch in Zellkulturen durch Expression von mit GSS-assoziiertem mutiertem PrP entstehen können, sollte durch entsprechende Versuchsansätze analysiert werden. Neben stabil humanes wt- sowie G114V- bzw. A117V-PrP exprimierenden SH-SY5Y-Zellen (s. 3.1.2, Abb. 9) wurden auch transient mit MausG114V-PrP transfizierte ScN2A eingesetzt. Die Zellen wurden auf Objektträger ausgesät. Nach anschließender Fixierung sowie Permeabilisierung erfolgte eine Kern- (Hämatoxylin) und Thioflavin S-Färbung (s. Material & Methoden). Die Auswertung der Signale erfolgte mittels Fluoreszenz-Mikroskopie nach spezifischer Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 410nm (Abb. 32).

Bei stabil transfizierten SH-SY5Y-Zellen ergibt die Amyloid-spezifische Thioflavin S-Färbung keinerlei positive Signale (Abb. 32 (a)), unabhängig davon, ob die Zellen humanes wt- oder mutiertes PrP (G114V und A117V, Daten nicht gezeigt) exprimieren. Auch die Inhibierung des proteasomalen Abbaus in diesen Zellen durch Inkubation mit ALLN (12 h) und die damit induzierte Anhäufung von detergentunlöslichem, PK-resistentem PrP resultiert nicht in einer detektierbaren Bildung von Amyloid (Daten nicht gezeigt).

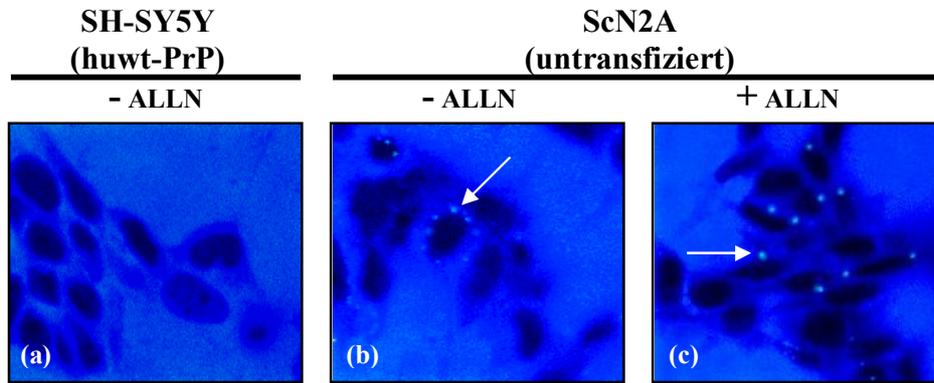


Abb. 32: Positive Amyloid-Färbereaktion in Scrapie-infizierten Zellen

Stabil mit humanem wt-PrP transfizierte SH-SY5Y-Zellen bzw. stabil Scrapie-infizierte N2A-Zellen wurden vor / nach Inkubation mit ALLN (12 h) einer Hämatoxylin/Thioflavin S-Färbung unterzogen. Mittels Fluoreszenz-Mikroskopie wurden die Signale nach Anregung mit UV-Licht visualisiert. Die Pfeile verweisen auf positive Signale.

Demgegenüber sind nach Thioflavin S-Färbung von ScN2A-Zellen positive Signale in Form punktförmiger Aggregate detektierbar (Abb. 32 (b)). Diese sind intrazellulär, jedoch nicht im Nukleus lokalisiert. Inkubation dieser Zellen mit ALLN führt zu einer Größenzunahme der positiven Signale (Abb. 32 (c)).

3.6.3.1 Signalverstärkung der Amyloid-Färbereaktion durch Expression von mutiertem PrP in Scrapie-infizierten Zellen

Die Expression von Mauswt- und insbesondere von MausG114V-PrP in ScN2A-Zellen führt zu einer Zunahme an PK-resistentem PrP in diesen Zellen (s. Abb. 31). Ob dies auch Auswirkungen auf den Gehalt an Amyloid-positiven Strukturen hat, sollte durch eine Thioflavin S-Färbung überprüft werden. Die analog Abb. 32 durchgeführte Färbung zeigt eine gegenüber untransfizierten ScN2a-Zellen leichte Intensivierung der Signale (Abb. 33 (a), im Vergleich zu Abb. 32 (b)). Eine der Färbung vorangehende ALLN-Inkubation der MausG114V-transfizierten ScN2A-Zellen führt zu einer Signalzunahme (Abb. 33 (b)).

Transiente Transfektion von ScN2A-Zellen mit Mauswt-PrP und anschließender ALLN-Inkubation ergab ein ähnliches Resultat bei gegenüber Transfektion mit MausG114V-PrP abgeschwächten Signalen (Daten nicht gezeigt).

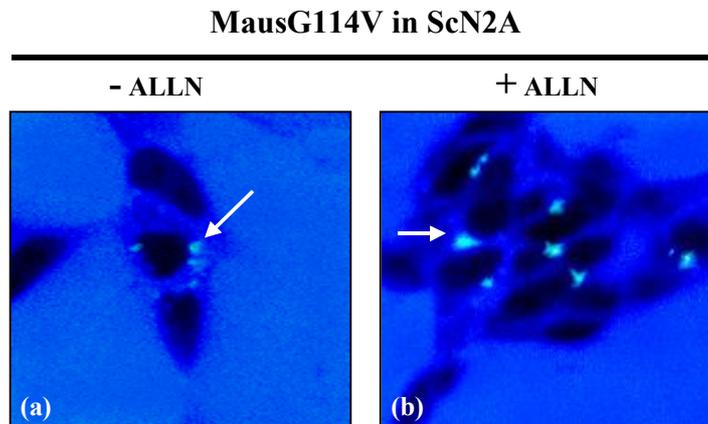


Abb. 33: Verstärkte Detektion amyloider Strukturen nach Expression von mutiertem PrP in Scrapie-infizierten Zellen

Stabil Scrapie-infizierte N2A-Zellen wurden transient mit MausG114V-PrP transfiziert (48 h). Vor / nach anschließender Inkubation mit ALLN (12 h) wurden sie einer Hämatoxylin/Thioflavin S-Färbung unterzogen. Die Detektion der Signale erfolgte mittels Fluoreszenz-Mikroskopie nach Anregung mit UV-Licht. Die Pfeile verweisen auf positive Signale.

Zusammenfassend können durch die Amyloid-spezifische Thioflavin S-Färbung nur in Scrapie-infizierten Zellen positive Signale detektiert werden. Die stabile Expression der GSS-assoziierten Mutation A117V sowie der Mutation G114V in nicht Scrapie-infizierten Zellen resultiert nicht in der Entstehung positiver Signale. Inhibierung der proteasomalen Degradation durch Inkubation der Zellen mit ALLN führt lediglich zu einer Verstärkung der bereits vor ALLN-Inkubation vorhandenen Signale in ScN2A-Zellen - eine Neuentstehung Amyloid-positiver Signale wurde nicht beobachtet.

Ob die in den untersuchten ScN2A-Zellen nachgewiesenen positiven Signale tatsächlich auf amyloide Strukturen zurückzuführen sind, oder ob es sich hierbei um unspezifisch angefärbtes PrP^{Sc} handelt, müssen weiterführende Studien klären.

3.7 Analyse des Metabolismus von wt-PrP und Mutanten

Die PrP-Mutanten G114V und A117V zeigen gegenüber wt-PrP Unterschiede in der Prozessierung, Lokalisation und des Transports. Im Weiteren sollte geklärt werden, ob auch im Verlauf der Synthese von PrP Unterschiede zwischen wt- und mutiertem PrP zu beobachten sind.

Für die vergleichenden Untersuchungen wurden wt- sowie G114V- und A117V-PrP in einem „Pulse-Chase-Labeling“-Assay („PCL“, s. Material & Methoden) durch Inkorporation radioaktiver Aminosäuren während ihrer Synthese markiert. Nach der 20-minütigen Inkubation von stabil humanes wt-, G114V- und A117VPrP exprimierende SH-SY5Y-Zellen im Labeling-Medium („Pulse“-Phase) wurde, nach entsprechender Inkubation für 0, 20, 40, 60 sowie 80 Minuten in nicht mit radioaktiven Aminosäuren versetztem Medium („Chase“-Phase), der Metabolismus der Zellen durch Inkubation bei 4°C gestoppt. Bis zu diesem Zeitpunkt der Chase-Phase an die Zelloberfläche transportiertes PrP wurde durch Inkubation der Zellen in PIPLC-haltigem Medium (30 min bei 4°C) abgelöst, mittels des Antikörpers 3F4 immunopräzipitiert und anschließend im WesternBlot aufgetragen (Abb. 35). Nach Ablösung des Oberflächen-PrPs wurden die Zellen lysiert. PrP wurde aus dem Zelllysate immunopräzipitiert (3F4) und im WesternBlot analysiert (Abb. 34).

Die Analyse des intrazellulären PrPs direkt nach der Pulse-Phase zeigte, dass in dem nach Zugabe des radioaktiven Labeling-Mediums vergangenen Zeitraum von 20 Minuten nur sehr wenig detektierbares PrP synthetisiert wurde (Abb. 34, Spur 1). Hierbei überwiegen un-, bzw. einfach-glykosylierte Formen. Nach 20-minütiger Chase-Phase (Spur 2) war ein deutlicher Anstieg der Gesamt-PrP-Menge zu beobachten. Dieser fiel bei den PrP-Mutanten (Spur 2, (b)+(c)) stärker aus als bei wt-PrP (Spur 2 (a)). Das Maximum des intrazellulären wt-PrPs lag nach 40-minütiger Chase-Phase vor (Spur 3 (a)). Im Verlauf der darauffolgenden Chase-Phase fiel der Gehalt an markiertem, intrazellulärem PrP bis nahe an die Detektionsgrenze ab (Spur 4 (a)). Davon abweichend war ein solch rapider Abfall der intrazellulären PrP-Menge zwischen 40 und 60 Minuten Chase bei mutiertem PrP nicht zu beobachten. Die Biogenese von G114V- und A117V-PrP zeigte stattdessen eine graduierte Abnahme der PrP-Menge – auch nach 60 Minuten Chase war noch intrazelluläres PrP nachweisbar (Spur 4 (b)+(c)). Des Weiteren waren zwischen wt- und mutiertem PrP Abweichungen der Glykosylierungsmuster detektierbar. Bei den Mutanten traten doppelt-glykosylierte Formen im Verhältnis zu den nicht- und einfach-glykosylierten Molekülen stärker auf als bei wt-PrP (Spur 2 (b)+(c), im Vergleich zu Spur 2 (a)).

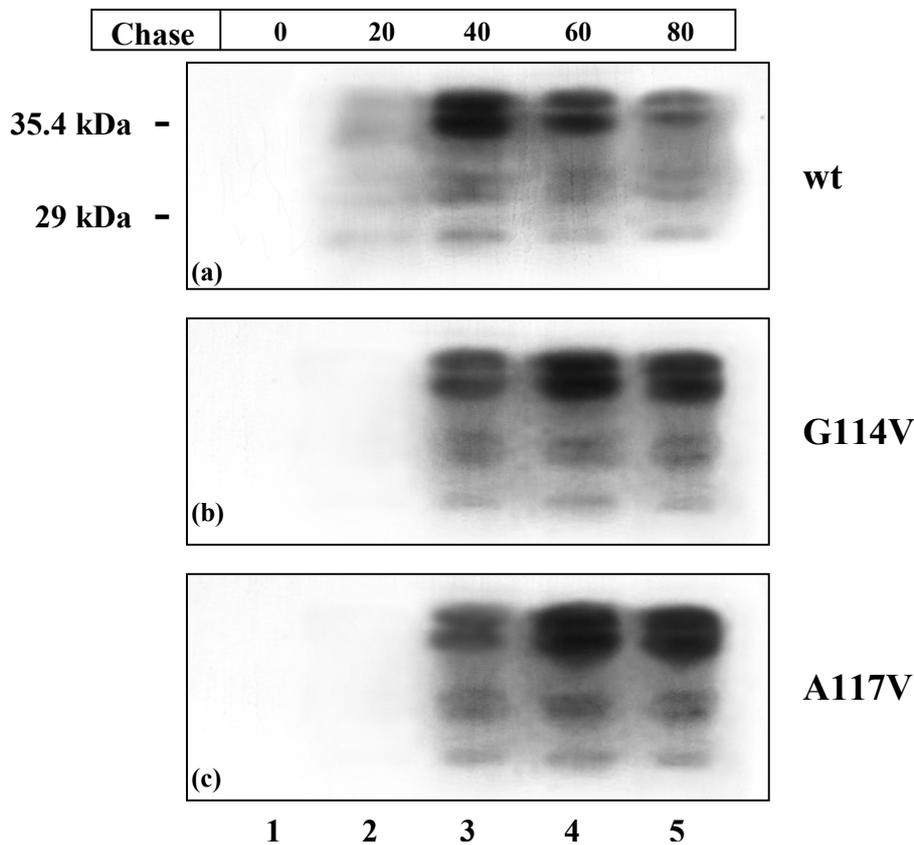


Abb. 35: Mutiertes PrP zeigt verlangsamtan Transport an die Zelloberfläche

Stabil transfizierte SH-SY5Y-Zellen wurden einem „PCL“-Assay unterzogen. Nach der Pulse- (20 min) und anschließenden Chase-Phase (0 - 80 min) wurde Oberflächen-PrP durch Inkubation mit PIPLC (30 min bei 4°C) ins Chase-Medium abgelöst und mit dem Antikörper 3F4 immunopräzipitiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte die Visualisierung mittels Autoradiografie.

Zum Zeitpunkt des ersten Nachweises von wt-PrP (nach 20 Minuten Chase, Spur 2, oben) war noch kein G114V- (Spur 2 (b)) und A117V-PrP (Spur 2 (c)) auf der Zelloberfläche angelangt - dies fand erst in einem Zeitraum zwischen 20 und 40 Minuten Chase statt (Spur 3 (b) + (c)). Die Maxima an Oberflächen-PrP lagen bei den mutierten PrP nach etwa 60 Minuten Chase (Spur 4 (b) + (c)), und damit rund 20 Minuten später als bei wt-PrP vor.

Bei sämtlichen Pulse-Chase-Analysen waren keine Unterschiede zwischen G114V- und A117V-PrP nachweisbar.

Auffällig sind neben den zeitlichen Unterschieden des Auftretens von intrazellulärem und Oberflächen-PrP auch die beobachteten Unterschiede der Glykosylierungsmuster – bei den mutierten PrPs ist der Anteil hochglykosylierter Moleküle zu Beginn der Chase-Phase größer als bei wt-PrP. Dies könnte ein Hinweis auf aberrante Prozessierung der mutierten PrP-Moleküle im Endoplasmatischen Retikulum sein, da sekretorische Proteine, welche

unnatürlich lange im ER verweilen (vergl. Abb. 23), oft post-translationell übermodifiziert werden (Chessler & Byers, 1992).

3.8 *in vitro*-Translokationsstudien

3.8.1 Simulierung der Proteinsynthese und Translokation an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums („Ctm-Assay“)

Neben der Verankerung an der Zelloberfläche mittels eines GPI-Ankers treten PrP-Moleküle auch in transmembranen Topologien auf.

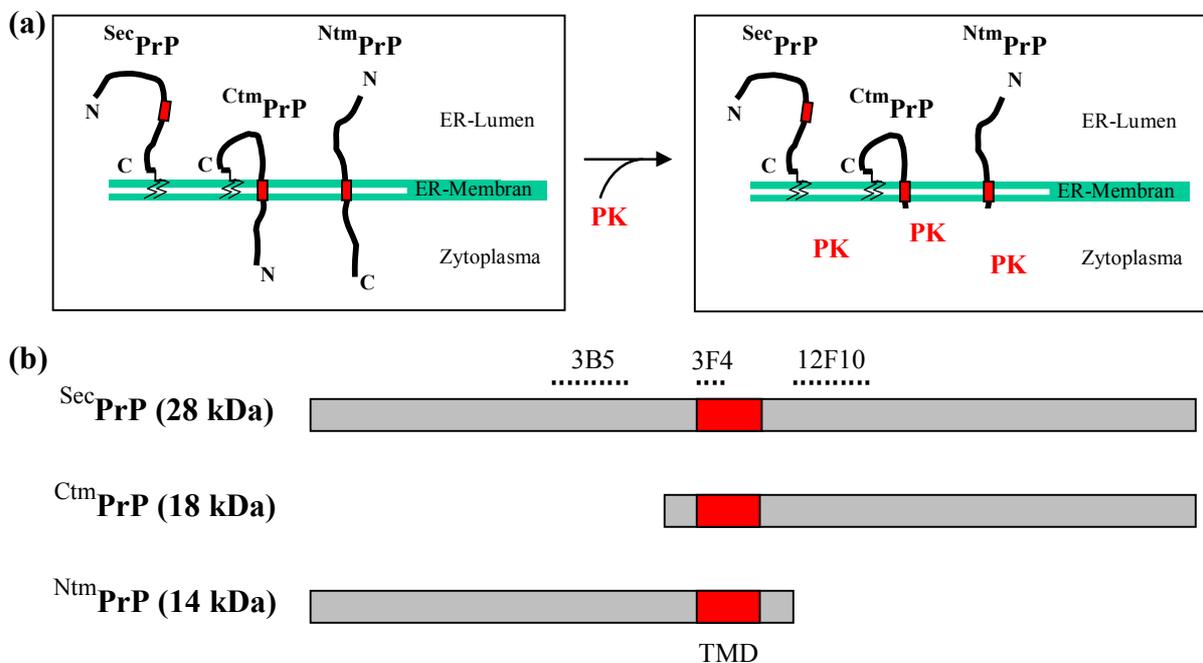


Abb. 36: Schematische Darstellung des „Ctm-Assay“ und der daraus resultierenden PrP-Fragmente

(a) Der während des „Ctm-Assay“ durchgeführte PK-Verdau degradiert unterschiedliche Bereiche von ^{Ctm}PrP und ^{Ntm}PrP.

(b) Die Bindungsepitope der im „Ctm-Assay“ verwendeten Antikörper 3B5, 3F4 und 12F10 sind angedeutet. Die in Klammern angegebenen Werte entsprechen den jeweiligen Molekulargewichten der unterschiedlichen PrP-Fragmente nach PK-Verdau. Der rot eingefärbte Bereich symbolisiert die angenommene transmembrane Domäne (TMD) des PrP-Moleküls.

Die drei bislang bekannten Topologieformen von PrP, ^{Sec}PrP, ^{Ctm}PrP und ^{Ntm}PrP, führen zur Lokalisierung unterschiedlicher Bereiche des Proteins innerhalb des Lumens des Endoplasmatischen Retikulums. Die abschirmende Wirkung der ER-Membran verhindert die Degradierung dieser Bereiche durch den im Verlauf des „Ctm-Assay“ (s. Material & Methoden) durchgeführten PK-Verdau (Abb. 36 (a)). Dies resultiert bei ^{Ctm}PrP und ^{Ntm}PrP in der Generierung unterschiedlicher PrP-Fragmente (Abb. 36 (b)), wohingegen ^{Sec}PrP keinerlei Degradation erfährt.

Der durch die mit dem Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom assoziierten Mutation A117V bedingte pathogene Mechanismus beruht auf der aberranten Synthese von ^{Ctm}PrP (s. Einleitung + Abb. 36), einer transmembranen Isoform des Prion-Proteins (Hegde *et al.*, 1998). Um zu überprüfen, ob die Mutation G114V, welche auf dem Prion-Protein in unmittelbarer Nähe der humanpathogenen Mutation A117V lokalisiert ist, Auswirkungen auf die Topologie der mutierten PrP-Moleküle hat, wurde die Synthese von G114V- im Vergleich zu wt- und A117V-PrP in einem *in vitro*-Assay („Ctm-Assay“) simuliert. Durch den konzertierten Einsatz von Mikrosomen und Retikulozytenlysat können die während der Proteinsynthese im Endoplasmatischen Retikulum stattfindenden Vorgänge nachgebildet werden (Lingappa *et al.*, 1978; Gilmore & Blobel, 1983). Darüberhinaus können die im Retikulozytenlysat enthaltenen zellulären Komponenten auch post-translationelle Prozessierungen, wie z.B. das Abtrennen des Signalpeptides oder Glykosylierungen übernehmen. In Kombination mit den mikrosomalen Membranen sind auch Vorgänge der Proteintranslokation an der ER-Membran simulierbar. Die während der *in vitro*-Synthese des Ctm-Assay gebildeten PrP-Moleküle wurden durch Inkorporation radioaktiver Nukleinsäuren markiert. Die gleichzeitige Zugabe eines Überschusses an Oligosaccharid-Akzeptor-Peptiden verhinderte die Glykosylierung der PrP-Moleküle, was eine deutlich bessere Unterscheidung der im weiteren Verlauf des Ctm-Assay mittels PK-Verdau generierten PrP-Fragmente ermöglichte. Nach PK-Verdau und anschließender Lyse der Mikrosomen wurden die unterschiedlichen PrP-Fragmente durch den Einsatz spezifischer Antikörper, welche gegen N-terminale (3B5), C-terminale (12F10) oder zentrale (3F4) Epitope des Prion-Proteins gerichtet sind, immunopräzipitiert und im WesternBlot dargestellt.

3.8.2 Mutiertes PrP liegt verstärkt in transmembraner Form vor

Die Ergebnisse des Ctm-Assay von humanem wt-, G114V- und A117V-PrP sind in Abb. 37 dargestellt. Neben den Ansätzen zur Überprüfung der unterschiedlichen Topologieformen wurden zusätzlich zwei Kontrollansätze durchgeführt. Die Analyse der Gesamtproteinmenge (Spur 1, 6, 11) ergab eine sehr homogene Synthese aller drei PrPs. Gleichzeitig wurde durch diesen Ansatz die Effizienz der Glykosylierungsinhibierung mittels Oligosaccharid-Akzeptorpeptiden bestätigt. Im zweiten Kontrollansatz wurde nachgewiesen, dass die eingesetzte Konzentration an Proteinase K ausreicht, um nicht durch mikrosomale Membranen abgeschirmte Proteine vollständig zu degradieren. Hierfür wurde der PK-Verdau in der Anwesenheit von Detergenz durchgeführt, was in einer vollständigen Degradation der Proteine resultierte (Spur 5, 10, 15).

Die Ansätze zur Analyse der unterschiedlichen Topologieformen von PrP zeigten, dass sowohl bei wt- (Spur 2 - 4) als auch bei den mutierten PrPs (Spur 7 - 9 und 12 - 14) der weitaus größte Teil der Moleküle als vollständig im ER-Lumen lokalisiertes^{Sec} PrP mit einem Molekulargewicht von etwa 28 kDa vorlag.

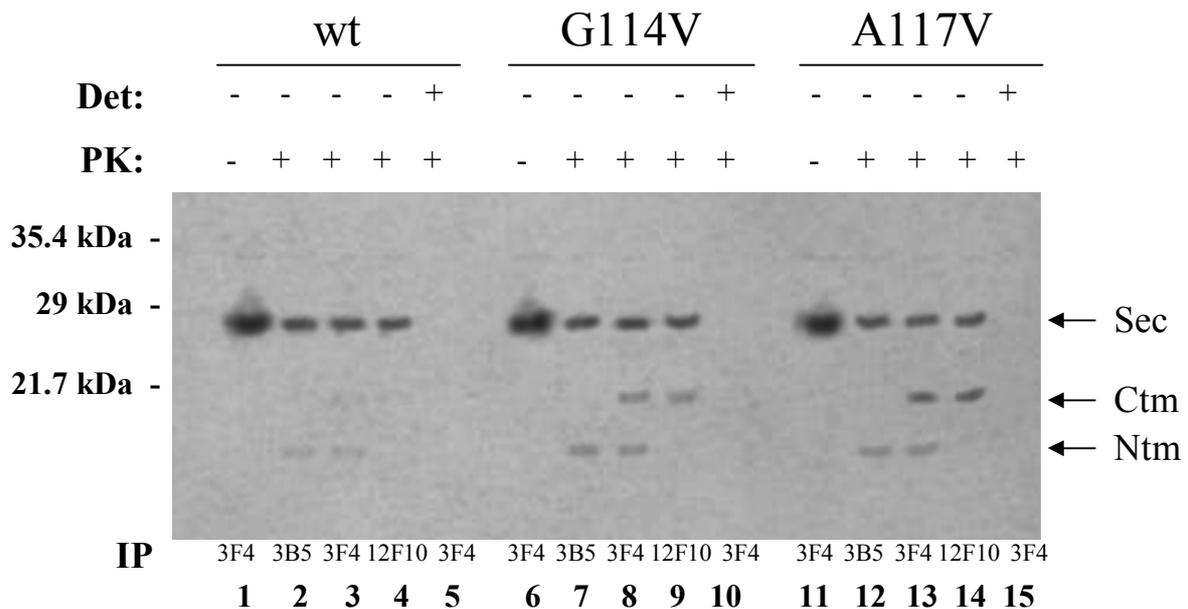


Abb. 37: Die Mutationen G114V und A117V führen zur verstärkten Bildung von transmembranem PrP

Aliquots der Translations-Reaktion des „Ctm-Assay“ wurden in der Ab-/Anwesenheit von Detergenz einem PK-Verdau unterzogen. Die jeweilige Kontrollreaktion blieb unverdaut. Für die anschließende Immunopräzipitation (IP) der verschiedenen PrP-Fragmente wurden die Antikörper 3B5, 3F4 bzw. 12F10 eingesetzt. Nach elektrophoretischer Auftrennung in einem Tris-Tricine-Gel erfolgte die Visualisierung mittels Autoradiografie.

Bei wt-PrP waren geringe Mengen an ^{Ntm}PrP mit einem Molekulargewicht von etwa 14 kDa (Spur 2 + 3) sowie sehr geringe Mengen von ^{Ctm}PrP von etwa 18 kDa (Spur 3 + 4) nachweisbar. Davon abweichend lag bei den mutierten PrPs ein deutlich größerer Anteil in transmembraner Topologie vor. Die Analyse von G114V-PrP ergab im Vergleich zu wt-PrP einen Anstieg von ^{Ntm}PrP (Spur 7 + 8) und insbesondere von ^{Ctm}PrP (Spur 8 + 9). Eine noch größere Zunahme an ^{Ctm}PrP war bei der A117V-Mutation zu beobachten (Spur 13 + 14).

Somit konnte der *in vitro*-Translokations-Assay nicht nur den in Verbindung mit der Mutation A117V im Hirngewebe von Patienten und transgenen Mäusen (Hegde *et al.*, 1998 + 1999) nachgewiesenen Anstieg an ^{Ctm}PrP bestätigen, sondern darüber hinaus auch einen Zusammenhang zwischen vermehrt transmembran vorliegender PrP-Moleküle und der Mutation G114V herstellen.

4. Diskussion

Bei allen erblichen Prionkrankheiten des Menschen, der familiären CJD (fCJD), dem Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) und der tödlichen familiären Schlaflosigkeit („fatal familial insomnia“, FFI), können Mutationen in der kodierenden Region des humanen Prionprotein-Gens (*PRNP*) nachgewiesen werden (Mastrianni *et al.*, 1996; Nitrini *et al.*, 1997; Samaia *et al.*, 1997; Kretzschmar & Windl, 1998). Ein Charakteristikum der bislang bekannten erblichen Prionkrankheiten ist die vollständige Penetranz des autosomal-dominanten Erbganges, so dass innerhalb der betroffenen Familien typische Krankheitsfälle meist über viele Generationen hinweg zurückverfolgt werden können (Beardsley, 1990; Galvez *et al.*, 1980; Brown *et al.*, 1992; Neugut *et al.*, 1979; Chapman *et al.*, 1994; Gabizon *et al.*, 1996).

Die Analyse des *PRNP*-Gens eines symptomatisch auffällig gewordenen 26-jährigen Mannes (Indexpatient) offenbarte die bislang nicht bekannte Punktmutation G114V. Die Ausweitung der genetischen Analyse auf weitere Familienmitglieder zeigte, dass auch der Vater des Indexpatienten mit der Mutation G114V behaftet ist. Bislang (Stand: September 2002) zeigt der Vater keinerlei charakteristische Symptome einer Prionkrankheit. Neben dem eventuell zu einem späteren Zeitpunkt stattfindenden Auftreten von Symptomen wäre auch eine bei dieser Mutation nicht vollständige Penetranz denkbar. In Tierversuchen konnte bei Scrapie-infizierten Mäusen das Auftreten subklinischer Krankheitsformen nachgewiesen werden (Thackray *et al.*, 2002). Für den Menschen ist die Ausprägung solch subklinischer Formen von Prionerkrankungen ohne äußerlich erkennbare Symptome jedoch bislang nicht bestätigt. Über den Großvater (väterlicherseits) des Indexpatienten liegen keine genetischen Daten vor – er starb jedoch im Alter von 44 Jahren und zeigte eine mit progredienter Demenz einhergehende Krankheit. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass er ebenfalls Träger derselben Mutation war (siehe Einleitung Abb. 5). Sowohl die Schwester als auch die Mutter des Indexpatienten tragen keine Mutation und sind nicht erkrankt. Die Mutation G114V ist jedoch nicht auf diese eine deutsche Familie beschränkt, da in einer weiteren Familie aus Uruguay eine 21-jährige Patientin als Trägerin identifiziert werden konnte. Es gibt keine bekannte Verbindung zwischen den beiden Familien. Die Krankheit hatte dabei in beiden Fällen, dem Indexpatienten und der Patientin aus Uruguay, einen sehr frühen Beginn und auch die klinische Manifestationen waren vereinbar. Sämtliche bislang bekannt gewordenen Träger der Mutation G114V tragen auf dem mutierten Allel von *PRNP* an der polymorphen

Aminosäureposition 129 die Aminosäure Methionin (M129). Der Krankheitsphänotyp ist bei bestimmten erblichen Prionkrankheiten, wie z.B. der pathogenen Mutation D178N, durch die Aminosäure an Position 129 determiniert (Gambetti *et al.*, 1995). Bei der GSS-auslösenden Mutation A117V tritt die Mutation ausnahmslos in Kopplung mit Valin an Kodon 129 auf (Tranchant *et al.*, 1997; Mallucci *et al.*, 1999). Aufgrund der geringen Zahl der bislang identifizierten Träger der Mutation G114V kann noch keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Mutation ausschließlich in Kopplung mit M129 auftritt und ob die Kopplung mit Valin an dieser Aminosäureposition zu einer Veränderung des Phänotyps führen würde.

Die in dieser Arbeit als Referenz untersuchte Mutation A117V verursacht beim Menschen das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) (Gerstmann *et al.*, 1936). Das Alter der Patienten bei Beginn der Krankheit kann sehr stark schwanken – bislang bekannt gewordene Fälle reichen von 25-61 Jahren; das Durchschnittsalter der Patienten liegt bei etwa 44 Jahren. Die Dauer des Krankheitsverlaufs kann ebenfalls sehr unterschiedlich sein (2-17 Jahre), der Durchschnitt liegt bei etwa 7 Jahren. Der klinische Phänotyp von GSS wird als sehr heterogen beschrieben - neben Tremor und Myoklonien wurden auch progrediente Demenz und Ataxie diagnostiziert (Mastrianni *et al.*, 1995; Piccardo *et al.*, 1998; Mallucci *et al.*, 1999).

Die Ähnlichkeit der klinischen Symptome, die identische Aminosäuremutation (eine falsche Kodierung für die AS Valin) sowie die benachbarte Lage beider Mutationen im zentralen, hochkonservierten Bereich des Prion-Proteins legten eine vergleichende Analyse von G114V und A117V nahe.

Zur *in-vivo*-Analyse der humanpathogenen *PRNP*-Mutationen G114V und A117V wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Zellkulturmodelle etabliert. Nach transienter Expression in N2A-Zellen offenbarten WesternBlot-Analysen bei G114V-PrP quantitative Unterschiede in der Expressionsleistung sowie im Glykosylierungsmuster im Vergleich zu wt-PrP - ein Effekt, welcher bei der Mutation A117V nicht zu beobachten war. Die Unterschiede traten sowohl im murinen als auch im humanen Zellsystem auf, so dass vermutet werden kann, dass die Mutation G114V zu einer generellen Beeinträchtigung der PrP-Prozessierung führt. Da in sämtlichen durchgeführten *in-vitro*-Analysen nie eine verminderte Synthese von G114V-PrP auftrat, ist die in den *in-vivo*-Experimenten festgestellte verringerte Expression mit großer Wahrscheinlichkeit auf post-transkriptionelle Ursachen zurückzuführen. Eine primär post-transkriptionelle Kontrolle wurde bereits für die Regulierung des PrP^C-Metabolismus in Neuronen postuliert (Ford *et al.*, 2002).

Die Generierung stabiler Zellklone ermöglichte das Studium potentiell toxischer Effekte der Expression von mutierten PrP-Molekülen über lange Zeiträume. Diese Ausweitung des

Untersuchungsspektrums offenbare zytotoxische Effekte von G114V- und A117V-PrP, welche bei stabil wt-PrP exprimierenden Zellen nicht auftraten. Neben verminderter Viabilität waren morphologische sowie ultrastrukturelle Veränderungen zu beobachten, welche charakteristisch für apoptotische Zellen sind (Clarke, 1990; Server & Mobley, 1991).

Für die Untersuchung der im Verlauf des normalen Metabolismus von PrP^C stattfindenden proteolytischen Spaltung im zentralen Bereich des Moleküls wurden zwei unterschiedliche Versuchsansätze etabliert, welche den Nachweis sowohl des N-terminalen als auch des C-terminalen Spaltproduktes ermöglichten. Die meisten zur Spaltung von PrP^C veröffentlichten Publikationen beschränken sich auf den Nachweis des C-terminalen Spaltproduktes, welches auch aus einem unspezifischen Abbau des sehr instabilen N-terminalen Bereiches des PrP-Moleküls resultieren könnte (Vey *et al.*, 1996). Durch die Detektion beider Spaltprodukte wurde nachgewiesen, dass in dem hier etablierten Zellkultur-Modell tatsächlich eine spezifische Spaltung stattfindet.

Die Analyse des C-terminalen Spaltproduktes erbrachte in den verwendeten Zellen keine Hinweise auf modulierende Effekte der Mutationen G114V und A117V auf die Spaltungseffizienz. Davon abweichend konnte im Zellkulturmedium der gleichen Zellen eine Anreicherung des N-terminalen Spaltproduktes um etwa 30 % bei beiden Mutationen im Vergleich zu wt-PrP beobachtet werden. Im Gesamtzell-Lysat ist das N-terminale Fragment bei allen Zellen nur in äußerst geringen Mengen nachweisbar, daher ist es wahrscheinlich, dass die Sekretion die natürliche Prozessierung dieses Fragments darstellt. Eine aufgrund der Mutationen verstärkte stattfindende Spaltung würde zur Anreicherung C-terminaler Fragmente auf der Zelloberfläche bzw. innerhalb der Zelle führen. Diese Anreicherung könnte einen pathogenen Zustand für die Zelle darstellen und zur Aktivierung von Degradationsmechanismen für das C-terminale Spaltfragment führen. Verstärkte Sekretion N-terminaler Fragmente ins Zellkulturmedium und eine gleichzeitig gesteigerte Degradation C-terminaler Fragmente im Zell-Lysat wäre eine mögliche Erklärung für die Versuchsdaten. Falls zelluläre Mechanismen existieren, welche die Konzentration des C-terminalen Fragmentes konstant halten, könnte dies auf eine wichtige, bislang unbekannt Funktion dieses Fragmentes hindeuten.

Die Spaltung findet zwischen AS 110 bis 112 statt – diese Aminosäuren befinden sich in der bei allen Spezies hochkonservierten Region des Proteins, was eine hier vorhandene Erkennungssequenz für eine spezifische Protease nahelegt. Modellanalysen kamen zu dem Schluß, dass die die Spaltstelle C-terminal flankierenden kleinen hydrophoben Aminosäuren

Glycin und Alanin für die Spaltung an dieser Position verantwortlich sind (Callebaut *et al.*, 1994). Die Mutationen G114V und A117V bewirken eine partielle Substitution der in dieser PrP-Region ausschließlich vorhandenen Glycine, bzw. Alanine. Dies könnte zu einer Optimierung des Epitops für die Protease führen und in einer verstärkten Spaltung resultieren. Die verstärkte Spaltung könnte auch in einer mutationsbedingten Veränderung der Struktur oder Prozessierung begründet liegen (Wegner *et al.*, 2002).

Die Analyse zweier für PrP^{Sc} charakteristischer Merkmale, Unlöslichkeit in nicht-denaturierenden Detergenzien und erhöhte Resistenz gegenüber Protease-Verdau, sollte klären, ob G114V- bzw. A117V-PrP biochemische Eigenschaften besitzen, die denen von PrP^{Sc} vergleichbar sind. Eine verstärkte Detergenzunlöslichkeit von GPI-verankerten Proteinen wird durch Assoziation dieser Proteine mit Cholesterol-, Sphingolipid- sowie Glykolipid-reichen Membrankomplexen hervorgerufen (Naslavsky *et al.*, 1997). Im Zellkultur-Ansatz unbehandelter Neuroblastomzellen war bei den PrP-Mutanten im Vergleich zu wt-PrP eine leichte Zunahme der Detergenzunlöslichkeit zu beobachten. Die spezifische Inhibierung des vesikulären Exportes sekretorischer Proteine aus dem Endoplasmatischen Retikulum durch Inkubation der Zellen mit BFA resultierte nicht in einer Erhöhung des Anteils an detergenzunlöslichem PrP. Dies deutet darauf hin, dass die ausschließliche Blockierung des sekretorischen Transportweges nicht ausreichend ist, um PrP in eine detergenzunlösliche Form zu überführen. Das Erlangen von Detergenzunlöslichkeit ist daher ein post-ER-Ereignis. Dieser Befund steht in Einklang mit der Beobachtung, dass ein Erlangen von Detergenzunlöslichkeit bei den meisten GPI-verankerten Proteinen während der Passage durch den Golgi-Apparat stattfindet (Taraboulos *et al.*, 1995; Harmey *et al.*, 1995).

Die in dieser Arbeit detektierte verstärkte Akkumulation von detergenzunlöslichem PrP in Neuroblastomzellen trat nach spezifischer Inhibierung des proteasomalen Abbaus (mittels ALLN) auf. Ähnlich den Verhältnissen bei unbehandelten Zellen zeigten G114V- und A117V-PrP gegenüber wt-PrP erhöhte Mengen detergenzunlöslicher Moleküle. In einer analogen Studie (Yedidia *et al.*, 2001) konnte durch den Einsatz von Proteasomen-Inhibitoren gezeigt werden, dass etwa 10 % aller naszierenden wt-PrP^C-Moleküle in den ER-assoziierten Degradationsweg („ERAD“) gelangen. Diese für den proteasomalen Abbau bestimmten Moleküle zeichneten sich ebenfalls durch erhöhte Detergenzunlöslichkeit aus. Der gesteigerte Anteil detergenzunlöslicher G114V- und A117V-Moleküle deutet darauf hin, dass durch diese Mutationen ein verstärktes Überführen in den ER-assoziierten Degradationsweg begünstigt wird. Ähnliche Auswirkungen wurden bereits für eine andere mit dem Gerstmann-

Sträussler-Scheinker-Syndrom assoziierte Mutation von PrP (Q217R) beschrieben (Jin *et al.*, 2000). Die Tatsache, dass auch unmutierte PrP-Moleküle zu einem gewissen Anteil Fehlfaltungen unterliegen, könnte darauf hindeuten, dass vergleichbare Mechanismen auch in die Entstehung von sporadischer CJD involviert sind.

Ein weiteres für PrP^{Sc} charakteristisches Merkmal ist die erhöhte Resistenz gegenüber dem Abbau durch Proteasen. Dieses Charakteristikum ist auf konformationelle Umstrukturierung der resistenten Moleküle zurückzuführen (Prusiner, 1999). Eine Ausbildung gesteigerter PK-Resistenz konnte in dieser Arbeit bei zwei experimentell unterschiedlichen *in vivo*-Versuchsansätzen beobachtet werden. Zum einen nach Expression von PrP in permanent mit Scrapie infizierten Neuroblastomzellen, zum anderen nach Inhibierung des proteasomalen Abbaus der Zellen.

Nach Expression in nicht-infizierten Neuroblastom-Zellen war bei den PrP-Mutanten G114V und A117V im Gegensatz zu vielen anderen humanpathogenen Mutationen kaum erhöhte Resistenz gegenüber dem Verdau mit Proteinase K detektierbar. Die nahezu unveränderte Sensitivität dieser speziellen Mutationen gegenüber dem Proteaseverdau wird auch durch Beobachtungen in den entsprechenden Prionkrankheiten unterstützt. Die Akkumulation von PK-resistentem A117V-PrP in den Gehirnen von betroffenen Patienten wird aufgrund widersprüchlicher publizierter Daten sehr kontrovers diskutiert (Piccardo *et al.*, 2001; Hegde *et al.*, 1998; Tateishi *et al.*, 1995b). Bezüglich einer in Zellkultur-Ansätzen eventuell stattfindenden Anreicherung von PK-resistentem A117V-PrP existieren bislang keinerlei Referenzdaten. Die Überführung von PrP^C in eine PK-resistente Isoform durch Expression in permanent Scrapie-infizierten Zellen ist insbesondere von der Sequenzhomologie zwischen dem endogenen PrP^{Sc} und dem zu konvertierenden Substrat-PrP abhängig (Priola *et al.*, 1994; Zulianello *et al.*, 2000). Analog erbrachten *in vitro*-Inkubationsansätze die höchsten Konversionsraten bei völliger Sequenzhomologie von PrP^C und PrP^{Sc} (Kocisko *et al.*, 1994). Damit in Einklang stehend zeigte sich auch bei den in dieser Arbeit durchgeführten *in vivo*-Versuchen eine starke Abhängigkeit der Konvertierungseffizienz von der Sequenzhomologie. Die Sequenzen von Maus-PrP und den eingesetzten Maus/Human-PrP-Chimären unterscheiden sich an 13 Aminosäurepositionen voneinander. Entsprechend war nach Expression dieser Chimären in murinen Neuroblastomzellen (ScN2A) keine Zunahme von PK-resistentem PrP im Vergleich zu untransfizierten Zellen detektierbar. Nach Expression von rein murinem PrP in ScN2A resultierte der PK-Verdau in der Zunahme eines resistenten Fragmentes von etwa 23 kDa. Diese Zunahme war bei G114V-PrP trotz der durch die

Mutation bedingten Aufhebung der völligen Sequenzhomologie zwischen endogenem und Substrat-PrP etwas stärker ausgeprägt als bei wt-PrP. Folglich scheint die Mutation G114V eine zu PK-Resistenz führende Konformationsänderung zu begünstigen. Potentieller Auslöser hierfür ist wahrscheinlich eine destabilisierende Wirkung auf die Molekülstruktur - ein Effekt, welcher für die Mutation A117V bereits postuliert wurde (Okimoto *et al.*, 2002).

Der im Zytoplasma der Zelle stattfindende proteasomale Abbau von zur Degradation bestimmten Proteinen erfolgt mit sehr hoher Effizienz (Coux *et al.*, 1996; Voges *et al.*, 1999) – ohne eine Beeinträchtigung dieses Abbaumechanismus findet wahrscheinlich eine komplette Degradierung der ausselektierten PrP-Moleküle statt. Eine Akkumulation von PK-resistentem wt-PrP nach Inhibierung des proteasomalen Abbaus wurde in anderen Versuchsansätzen beschrieben (Yedidia *et al.*, 2001). Demgegenüber zeigte sich nach spezifischer Inhibierung des proteasomalen Abbaus eine gegenüber wt-PrP verstärkt ausgeprägte PK-Resistenz von G114V- und A117V-PrP. Die gesteigerte PK-Resistenz nach Inhibierung der proteasomalen Degradierung spiegelt sich insbesondere in zwei PrP-Fragmenten mit einem Molekulargewicht von etwa 26 kDa, bzw. 20 kDa wider. Das 20 kDa-Fragment stellt mit großer Wahrscheinlichkeit ein proteolytisches Abbauprodukt dar, welches aus der partiellen Degradation des 26 kDa-Fragmentes resultiert. Beide Fragmente waren bereits vor PK-Verdau sowohl in unbehandelten Zellen als auch, in stark erhöhten Mengen, nach Inkubation mit ALLN detektierbar, unabhängig davon, ob es sich um wt- oder mutiertes PrP handelte. Dies bedeutet, dass die Generierung dieser Fragmente einen natürlich in der Zelle stattfindenden Prozeß darstellt, welcher durch die Inkubation mit ALLN lediglich verstärkt wurde. Die nach proteasomaler Inhibierung detektierte PK-Resistenz ist möglicherweise auf einen anderen Entstehungsmechanismus zurückzuführen als die PK-Resistenz in ScN2A-Zellen, denn der Großteil dieser PK-resistenten Fragmente unterscheidet sich im Molekulargewicht (26 kDa) vom proteaseresistenten PrP der ScN2A-Zellen (23 kDa).

Weitere Hinweise auf eine unterschiedliche Beschaffenheit des PK-resistenten PrPs von ScN2A-Zellen im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen lieferten Versuche zum Nachweis amyloider Strukturen. Im Hirngewebe sämtlicher von GSS-Mutationen betroffener Patienten sind amyloide Plaques nachweisbar (Bugiani *et al.*, 2000). Sie entstehen durch Aggregation amyloider Fibrillen - dies sind wassergefüllte Nanoröhrchen unterschiedlicher Länge, welche aus einzelnen, aneinandergereihten, zylindrischen β -Faltblattstrukturen bestehen (Perutz *et al.*, 2002). In Bakterien können solche Nanoröhrchen letale Effekte auslösen, indem sie sich in Membranen inserieren und diese dadurch depolarisieren. Es gibt Hinweise darauf, dass

amyloide Fasern auch bei Zellen als elektrische Leiter fungieren und einen Zusammenbruch des transmembranen Ionenpotentials auslösen können, was zu einem rapiden Zelltod führt. Intrazelluläre Einschlüsse amyloider Strukturen sind als krankheitsauslösender Faktor beschrieben worden (Fernandez-Lopez *et al.*, 2001).

Sämtliche Versuche zum spezifischen Nachweis amyloider Strukturen mittels Thioflavin S-Färbung in nicht-infizierten Zellen, welche G114V- bzw. A117V-PrP exprimierten, ergaben, auch nach vorangegangener Inhibierung des proteasomalen Degradationspfades, keinerlei Anzeichen auf das Vorhandensein solcher Strukturen. Demgegenüber resultierte die Färbung bei ScN2A-Zellen in positiven Signalen, welche sowohl durch Inhibierung des proteasomalen Degradationspfades als auch durch zusätzliche Expression von wt- und insbesondere G114V-PrP intensiviert wurden.

Die Frage, ob die in den ScN2A-Zellen detektierten Signale wirklich amyloide Strukturen repräsentieren, ist nur durch weiterführende experimentelle Ansätze zu klären. Das Lokalisationsmuster der Thioflavin-positiven Signale ist dem für PrP^{Sc} in Scrapie-infizierten Zellen beschriebenen (McKinley *et al.*, 1991b) sehr ähnlich. Da der Aggregationsstatus jedoch nicht zwingend mit der PK-Resistenz korreliert (Wille *et al.*, 2000), kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die in den ScN2A-Zellen angefärbten Strukturen aus PK-resistentem PrP bestehen. Die hier angewandte Thioflavin S-Färbung ist im Vergleich zu anderen Amyloid-Färbungen, wie z.B. mittels des Farbstoffs „Congo Red“, sensitiver und leichter zu interpretieren und quantifizieren, sie weist aber auch größere Unspezifität auf. Da eine unspezifische Bindung an andere zelluläre Strukturen, insbesondere Fibrin oder Kollagen, nicht völlig ausgeschlossen werden kann, wird die Anwendung der Thioflavin-Färbung für diagnostische Zwecke nicht empfohlen (Levine, 1995). Unabhängig davon, ob die in den ScN2A-Zellen nachgewiesenen Signale tatsächlich auf amyloide Strukturen zurückzuführen sind oder ob es sich um unspezifisch angefärbtes PrP^{Sc} handelt, lieferten diese Befunde einen weiteren Hinweis auf die unterschiedliche Beschaffenheit des PK-resistenten PrPs von ScN2A- und nicht-infizierten Zellen.

Zusammenfassend deuten die hier durchgeführten Untersuchungen zum Nachweis von PK-resistentem, bzw. amyloidem PrP in Zellkulturexperimenten darauf hin, dass es unterschiedliche Ausprägungsformen von PK-Resistenz gibt, welche auf unterschiedliche Entstehungsmechanismen zurückzuführen sind. Die bei G114V- und A117V-PrP in nicht-infizierten Zellen detektierte Erhöhung der PK-Resistenz ist wahrscheinlich auf ein im Vergleich zu wt-PrP stärkeres Ausselektieren und Überführen dieser mutierten Moleküle ins Zytoplasma zurückzuführen, was durch Analyse der intrazellulären Lokalisation bestätigt

wurde. Dieses stärkere Aussortieren führt eventuell zum Erreichen einer „kritischen“, für den Beginn der Aggregation und folgender Ausbildung einer PK-Resistenz erforderlichen Konzentration, da ins Zytoplasma überführte Proteine zur Aggregation neigen (Kopito, 1997). Durch Protein-Aggregation im Zytoplasma kann der proteasomale Abbau beeinträchtigt werden (Johnston *et al.*, 1998). Die durch Einsatz des Proteasomeninhibitors ALLN herbeigeführte Beeinträchtigung des proteasomalen Abbaus simuliert eventuell eine zu Beginn einer Prionkrankheit natürlich auftretende Störung, welche in pathogener Proteinakkumulation im Zytoplasma resultiert.

Die Analyse der zellulären Lokalisation mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie zeigte eine im Vergleich zu wt-PrP verringerte Expression von G114V- und A117V-PrP an der Zelloberfläche. Dies wurde auch für zahlreiche andere PrP-Mutationen in unterschiedlichen Zellkultur-Ansätzen beschrieben (Singh *et al.*, 1997; Zanusso *et al.*, 1999; Ma & Lindquist, 2001; Ivanova *et al.*, 2001; Lorenz *et al.*, 2002). Im Falle der in dieser Arbeit analysierten PrP-Mutationen G114V und A117V könnte man nur bei Ersterer aufgrund der im WesternBlot nachgewiesenen verringerten Expression vermuten, dass dies auf allgemein verringerte Proteinsynthese zurückzuführen ist. Die in den *in vitro*-Versuchen beobachtete quantitativ identische Expression von G114V-PrP im Vergleich zu wt- und A117V-PrP spricht gegen diese Vermutung und deutet auf eine aberrante post-translationelle Prozessierung hin. Die Analyse der intrazellulären PrP-Lokalisation offenbarte ein stärkeres Verbleiben von mutierten PrP-Molekülen in intrazellulären Kompartimenten. Dass es sich bei diesen intrazellulär akkumulierten PrP-Molekülen mit großer Wahrscheinlichkeit um nicht korrekt prozessiertes PrP handelt, legt die vergleichbare enzymatische Ablösbarkeit von an die Oberfläche transportiertem wt- und mutiertem PrP nahe – auch von G114V- und A117V-PrP wird ein gewisser, obgleich zu wt-PrP signifikant geringerer Anteil konform den intrazellulären Qualitätskontrollmechanismen prozessiert und nach Transport an die Zelloberfläche in einer wt-PrP-analogen Weise auf der Plasmamembran verankert.

Die bei G114V- und A117V-PrP verstärkte Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum bei gleichzeitig verringerter Expression an der Zelloberfläche wurde auch bei einer Reihe anderer PrP-Mutationen beobachtet (Singh *et al.*, 1997; Ma & Lindquist, 2001; Ivanova *et al.*, 2001). Die Retention von aberranten Proteinen im ER ist einer der Auslöser von zellulären Stress-Reaktions-Mechanismen (Kaufman, 1999), welche eventuell auch in den pathogenen Effekten von mutiertem PrP involviert sind.

Es gibt Hinweise darauf, dass Chaperone bei familiären Prionkrankheiten in zweifacher Weise in Aktion treten. Sie sind nicht nur am Konversionsprozeß von PrP^C zu PrP^{Sc} beteiligt (Welch & Gambetti, 1998), wie es auch für nicht-hereditäre Prionkrankheiten beschrieben wurde (DeBurman *et al.*, 1997), sondern spielen mit großer Wahrscheinlichkeit auch beim destabilisierenden, durch bestimmte *PRNP*-Mutationen ausgelösten Effekt eine Rolle (Chesebro, 1999). Die primären Qualitätskontrollmechanismen des sekretorischen Transportweges beinhalten die temporäre Assoziation von neu synthetisierten Proteinen mit Chaperonen des Endoplasmatischen Retikulums. Chaperone besitzen neben unterstützender Funktion beim Faltungsprozeß von Proteinen auch eine Rückhaltefunktion von falsch bzw. unvollständig gefalteten Proteinen (Klausner & Sitia, 1990). Diese sog. sekundären Qualitätskontrollmechanismen sollen das Überführen ausselektierter Proteine in die Degradationswege der Zelle sicherstellen (Ellgaard *et al.*, 1999). Eine Retention neu synthetisierter Proteine im ER kann auch auf Interaktion dieser Proteine miteinander zurückzuführen sein. Studien zur Analyse von Proteinfaltung offenbarten eine verstärkte Neigung inkorrekt gefalteter Proteine zur Selbstaggregation (Hurtley & Helenius, 1989). Eine Neigung zur Selbstaggregation wird auch für das Prion-Protein beschrieben (Caughey *et al.*, 1991) und es gibt Hinweise auf eine Involvierung von Chaperonen in diesen Prozeß (Saborio *et al.*, 1999; Stöckel & Hartl, 2001). Die Selbstaggregation kann zur Bildung von Aggregaten führen, welche aufgrund ihrer Größe und Bindung an immobile Chaperone, wie z.B. BiP, Transport-inkompatibel sind (Johnston *et al.*, 1998). Die Interaktion mit Chaperonen fördert auch die Degradation von mutiertem PrP und verzögert eine Konversion zu PrP^{Sc}, was einen Erklärungsansatz für das bei familiären Prionkrankheiten oft erst im späten Lebensalter stattfindende Auftreten der klinischen Manifestation darstellen könnte. Analysen der GSS-assoziierten *PRNP*-Mutation Q217R in Zellkultur offenbarten eine im Vergleich zu wt-PrP deutlich verlängerte Interaktion des ER-Chaperons BiP mit den mutierten Q217R-Molekülen, welche anschließend dem ER-assoziierten proteasomalen Degradationsweg zugeführt wurden (Jin *et al.*, 2000).

Eine aberrante Prozessierung von G114V- und A117V-PrP zeigte sich auch in PrP-Golgi-Kolokalisationsstudien. Während wt-PrP eine vollständige Kolokalisation mit diesem Organell des sekretorischen Transportweges zeigte, konnte mutiertes PrP zu einem gewissen Anteil auch in intrazellulären Bereichen nachgewiesen werden, welche nicht Bestandteil des Golgi-Netzwerkes sind. Dies ist ein weiteres Indiz für die nicht ausschließlich über den sekretorischen Transportweg verlaufende intrazelluläre Prozessierung dieser mutierten PrP-

Moleküle. Das trans-Golgi-Netzwerk fungiert neben dem Endoplasmatischen Retikulum als weiteres zelluläres Kompartiment für die Translokation fehlgefalteter, zur Degradation bestimmter Proteine. Im Gegensatz zu korrekt prozessierten sekretorischen Proteinen, welche über das trans-Golgi-Netzwerk zur Plasmamembran transportiert werden, gelangen im Golgi ausselektierte Proteine über Endosomen zu Lysosomen (Ellgaard *et al.*, 1999). Analysen mittels Scrapie-infizierter Neuroblastomzellen zum Ort der zellulären Konversion von PrP in eine Protease-resistente Form ergaben Hinweise auf eine Anreicherung von PK-resistentem PrP in Lysosomen (Caughey *et al.*, 1991b). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten konnten weder bei wt-PrP noch bei den Mutanten G114V und A117V eine Kolokalisation mit Lysosomen nachweisen, was keine verstärkte Degradation dieser PrP-Mutanten in Lysosomen nahelegt. Eine fehlende Kolokalisation von PrP in Lysosomen wurde auch für anderen humanpathogene Prion-Mutationen beschrieben (Negro *et al.*, 2001; Ivanova *et al.*, 2001). Die in dem Versuchsansatz von Caughey *et al.* (1991b) detektierten Signale stammten mit großer Wahrscheinlichkeit von PrP^{Sc}, und nicht von über den ER-assoziierten Degradationspfad ins Zytoplasma überführtes PrP, welches aufgrund von Aggregation PK-resistente Eigenschaften erlangte. Wenn die stattfindende erhöhte Akkumulation von G114- und A117V-PrP im ER und Zytoplasma mit einer erhöhten Tendenz zum Proteinabbau einhergeht, so geschieht dies daher mit großer Wahrscheinlichkeit über den proteasomalen Weg.

Im Zytoplasma von wt-PrP-exprimierenden Zellen war eine sehr gering ausgeprägte Kolokalisation von PrP mit zytoplasmatischen Strukturen nachweisbar. Die im Vergleich zu wt-PrP deutlich ausgeprägtere Zytoplasma-Lokalisation von G114- und A117V-PrP deutet auf verstärktes Überführen dieser mutierten Proteine ins Zytoplasma hin. Hinweise, dass es sich hierbei um für den proteasomalen Abbau bestimmte PrP-Moleküle handelt, erbrachten die Inkubationsversuche mit dem Proteasomeninhibitor ALLN. Nach Inhibierung der proteasomalen Degradation zeigte sich bei wt-PrP eine leicht verstärkte, bei den G114V- und A117V-Molekülen hingegen eine sehr starke Kolokalisation mit dem Zytoplasma. Im ER-assoziierten Degradationsweg ausselektierte Moleküle werden deglykosyliert und durch Anheftung von Polyubiquitin-Ketten für den Abbau durch das im Zytoplasma lokalisierte Proteasom markiert. Der im WesternBlot nach Inhibierung des proteasomalen Abbaus detektierte Anstieg eines PrP-Fragmentes, welches neben erhöhter Detergenzunlöslichkeit und PK-Resistenz auch ein unglykosyliertem PrP entsprechendes Molekulargewicht aufweist, deutet darauf hin, dass es sich bei diesem Fragment um zytosolisches PrP handelt. Ein

vergleichbares Fragment wurde als charakteristisch für zytosolisches PrP beschrieben (Ma & Lindquist, 2002; Ma *et al.*, 2002). Die stärkere Präsenz dieses Fragmentes bei G114V- und A117V- PrP ist ein weiterer Hinweis auf die verstärkte proteasomale Degradation der mutierten PrP-Moleküle. Die WesternBlot-Analysen von nicht mit dem Proteasomeninhibitor behandelten Zellen lieferten keine eindeutigen Hinweise auf verstärktes Auftreten von zytosolischem G114V- und A117V-PrP. Dies ist neben der hohen Effizienz des proteasomalen Abbaus mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Notwendigkeit des Erreichens einer kritischen Konzentration an zytosolischem PrP zurückzuführen, welche Voraussetzung für den Beginn von Aggregation zu sein scheint (Ma & Lindquist, 2002).

Die Analyse der Kinetik des zellulären Transportes von neu synthetisiertem PrP offenbarte einen gegenüber wt-PrP verlangsamten Transit von G114V- und A117V-PrP an die Zelloberfläche. Neu synthetisiertes wt-PrP^C gelangt nach etwa einer Stunde an die Zelloberfläche (Caughey *et al.*, 1989; Borchelt *et al.*, 1990). Ein PrP^C-Molekül verbleibt mit einer Halbwertszeit von etwa 20 Minuten auf der Zelloberfläche und folgt dann wiederholt dem etwa 60 Minuten dauernden Kreislauf („Recycling pathway“) durch die Zelle (Taraboulos *et al.*, 1992; Shyng *et al.*, 1993). Die Halbwertszeit reifer PrP-Moleküle beträgt 3 - 6 h (Caughey *et al.*, 1989). Die in dieser Arbeit mittels wt-PrP-exprimierenden humanen Neuroblastoma-Zellen durchgeführten Kinetik-Studien stimmten mit den für PrP^C beschriebenen Daten überein.

Eine aberrante intrazelluläre Verweildauer sekretorischer Proteine kann in „Überprozessierung“, insbesondere innerhalb des Endoplasmatischen Retikulums, resultieren (Chessler & Byers, 1992), was bereits mehrfach für mutiertes PrP beschrieben wurde (Singh *et al.*, 1997; Capellari *et al.*, 2000; Walmsley *et al.*, 2001).

Die aberrante Prozessierung von G114V-PrP und A117V-PrP hat ihren Ursprung mit großer Wahrscheinlichkeit in der bei diesen PrP-Mutanten erhöhten Synthese an transmembranem CtmPrP. Beide Mutationen sind sowohl innerhalb der bei allen bislang untersuchten Spezies nahezu perfekt konservierten Region (AS 113-137) als auch der angenommenen transmembranen Domäne des Prion-Proteins lokalisiert. Eine erhöhte Bildung von CtmPrP ist auf Mutationen innerhalb der angenommenen transmembranen Domäne (AS 110-135) beschränkt, da sowohl artifizielle als auch humanpathogene Mutationen außerhalb dieses Bereiches von PrP nicht zu erhöhten Anteilen an transmembranem PrP führen (Stewart & Harris, 2001). Innerhalb der transmembranen Domäne führte insbesondere die artifizielle Mutation „AV3“, bei welcher die natürlicherweise an den Aminosäurepositionen 113, 115

und 118 exprimierten Alanine durch Valine substituiert wurden, zur Bildung sehr großer Mengen an ^{Ctm}PrP . Interessanterweise handelt es sich bei der durch die Mutationen G114V und A117V fälschlicherweise exprimierten Aminosäure ebenfalls um Valin.

Die bei diesen beiden Mutationen beobachteten Auswirkungen auf den Metabolismus von PrP waren in sämtlichen untersuchten Parametern sehr ähnlich. Auffällig ist jedoch der Zusammenhang zwischen der Menge an synthetisiertem ^{Ctm}PrP und der Ausprägung eines aberranten PrP-Metabolismus. Die Mutation A117V führt im Vergleich zu G114V nicht nur zur stärkeren Synthese von transmembranem PrP, sondern auch zu einer in den meisten untersuchten Parametern stärker von wt-PrP abweichenden PrP-Prozessierung. Ein vergleichbarer Zusammenhang wurde auch bei transgenen Versuchstieren, welche A117V-PrP in verschiedenen Mengen exprimieren, beobachtet. Bei diesen Tieren war das Auftreten neurodegenerativer Symptome direkt von der Menge an synthetisiertem ^{Ctm}PrP abhängig (Hegde *et al.*, 1999).

Bezüglich des Mechanismus der Neurotoxizität von transmembranem PrP können zwei unterschiedliche Modelle postuliert werden. Das eine geht von einer direkten zytotoxischen Wirkung von transmembranem PrP aus. Hinweise hierfür ergaben sich aus *in vitro*-Studien mit Peptiden, welche aus den zentralen Bereichen des PrP-Moleküls abgeleitet waren. Die Toxizität dieser Peptide stieg in Abhängigkeit ihrer Neigung, sich stabil in die Membranen kortikaler Neurone zu inserieren. Als Auslöser für den resultierenden Zelltod wurde eine durch die Peptidinsertion hervorgerufene Beeinträchtigung der Membranfunktion vorgeschlagen (Haik *et al.*, 2000). Das zweite Modell schlägt einen durch ^{Ctm}PrP verursachten Anstieg der Konzentration an zytoplasmatischem PrP vor. Für ^{Ctm}PrP konnte sowohl eine aberrante Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum als auch die Translokation ins Zytoplasma und proteasomale Degradation nachgewiesen werden (Stewart *et al.*, 2001). Zytoplasmatisches PrP erwies sich sowohl in Neuroblastoma-Zellkulturen als auch in transgenen Mäusen als sehr neurotoxisch (Ma *et al.*, 2002). Darüber hinaus zeigt zytosolisches PrP biochemische Eigenschaften, welche denen von PrP^{Sc} sehr ähneln sowie eine stark ausgeprägte Neigung zur Aggregation. Diese Aggregation, deren Einsetzen vom Erreichen eines Schwellenwertes abhängig ist, kann zur Generierung amorpher Aggregate führen. Ein Zusammenhang zwischen Erreichen eines Schwellenwertes an zytosolischem Protein und Einsetzen von Aggregation wurde neben PrP (Ma & Lindquist, 2002) unter anderem auch für die neurodegenerative Parkinson-Krankheit beschrieben, bei welcher eine

unnatürlich erhöhte zytoplasmatische Konzentration an α -Synuclein Voraussetzung für den Beginn von Aggregation ist (Shtilerman *et al.*, 2002).

PrP^{Sc} ist wahrscheinlich die Hauptkomponente infektiöser Prionpartikel (Prusiner, 1982 + 1998). Infektiösität läßt sich in Form infektiöser Homogenate mit unterschiedlicher Effizienz sowohl innerhalb einer als auch zwischen verschiedenen Spezies (Cuillé & Chelle, 1936; Gajdusek *et al.*, 1966; Gibbs *et al.*, 1968; Masters *et al.*, 1981; Lasmézas *et al.*, 1996; Houston *et al.*, 2000) übertragen. Darüber hinaus konnten verschiedene Neuroblastomzell-Linien durch Inkubation mit infektiösen Hirnhomogenaten stabil infiziert werden (Race *et al.*, 1987 + 1988; Nishida *et al.*, 2000). Die meisten hereditären Prionerkrankungen lassen sich auf Versuchstiere übertragen (Brown *et al.*, 1994; Tateishi & Kitamoto, 1995; Tateishi *et al.*, 1995 + 1996). Zu den wenigen Ausnahmen zählt die Mutation A117V, bei welcher sich darüberhinaus kein typisches PrP^{Sc} nachweisen läßt (Tateishi *et al.*, 1990). Die fehlende Übertragbarkeit von A117V deutet darauf hin, dass die mit dieser Mutation einhergehende erhöhte Bildung von CtmPrP eine Prionproteinenerkrankung und keine Prionerkrankung im klassischen Sinne darstellt. Die Entstehung von zytoplasmatischem PK-resistentem PrP-res und infektiösem PrP^{Sc} findet wahrscheinlich über unterschiedliche zelluläre Wege statt. Die Bildung von zytoplasmatischem PrP-res verläuft über den proteasomalen Degradationsweg sekretorischer Proteine und findet im Zytosol statt. Die Synthese von PrP^{Sc} hingegen erfolgt mit großer Wahrscheinlichkeit während des Transits von PrP zwischen dem mid-Golgi und den Lysosomen, was auf eine Involvierung des endozytotischen Transportweges in der PrP^{Sc}-Synthese hindeutet (Taraboulos *et al.*, 1992).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die hier erstmals beschriebene humanpathogene PrP-Mutation G114V sowie die als Referenz untersuchte Mutation A117V zu einer Entstehung erhöhter Mengen an PK-resistentem zytoplasmatischem PrP führen, welches sich von dem bei vielen anderen PrP-Mutationen auftretenden PrP^{Sc} deutlich unterscheidet. Eine Degradierung von mutierten Proteinen über den proteasomalen Pfad wurde auch für zahlreiche andere sekretorische, mit der Auslösung neurodegenerativer Krankheiten assoziierter Proteine beschrieben. Bei diesen Krankheiten, unter anderem Huntington und Parkinson, resultiert die intrazelluläre Proteinaggregation in einer Beeinträchtigung der Funktion des Proteasoms (Ward *et al.*, 1995; Kopito, 1997; Wickner *et al.*, 1999). Vergleichbar den Prionkrankheiten ist das zentrale Thema dieser Krankheiten ebenfalls die Konversion eines natürlicherweise löslichen Proteins in eine β -Faltblatt-reiche, unlösliche Form, welche zur Aggregation und Bildung intrazellulärer Ablagerungen neigt.

Prionkrankheiten sind vom Auftreten unterschiedlicher Formen von aberrant verändertem Prionprotein begleitet. Eventuell ist die Anhäufung an zytosolischem PrP ein, obgleich durch unterschiedliche Mechanismen hervorgerufenes, Charakteristikum sämtlicher Prionkrankheiten, welches sich entsprechend der unterschiedlichen Weiterprozessierung dieses zytosolischen PrPs in unterschiedlichen klinischen Phänotypen manifestiert.

5. Zusammenfassung

Die vererbaren Formen humaner Prionkrankheiten repräsentieren etwa 10 % der gesamten Erkrankungsfälle. In allen bislang untersuchten Fällen konnten Punktmutationen oder Insertionen im Prion-Protein-Gen des Menschen (*PRNP*) nachgewiesen werden. Auch die in dieser Arbeit erstmals beschriebene neue *PRNP*-Mutation G114V läßt bei Betrachtung der Stammbäume bislang erfasster Familien auf einen hereditären Hintergrund schließen. Auffällig ist das zum Teil sehr junge Alter der mit dieser Mutation behafteten Patienten (20-25 Jahre) sowie die Ähnlichkeiten der klinischen Symptome zum Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS). Eine der bereits bekannten *PRNP*-Mutationen, welche zu GSS führt, ist A117V. Diese Mutation liegt, ebenso wie G114V, im zentralen, hochkonservierten Bereich des Prion-Proteins (PrP), welcher nicht nur eine der physiologischen Spaltstellen, sondern auch die postulierte transmembrane Domäne von PrP beinhaltet. Bislang über A117V erhobene Daten waren hauptsächlich auf die Beschreibung des klinischen Bildes beschränkt und erlaubten keine gesicherten Rückschlüsse über den auf zellbiologischer Ebene zu Grunde liegenden pathogenen Mechanismus.

Aufgrund der Ähnlichkeit der Mutationen G114V und A117V wurden in der vorliegenden Arbeit unterschiedliche *in vivo*- und *in vitro*-Modellsysteme etabliert, um vergleichende Analysen dieser Mutationen gegen Wildtyp-PrP (wt-PrP) durchführen zu können. In murinen und humanen Zellkulturmodellen wurden neben der Synthese sowie der Degradation der Proteine auch ihre biochemischen Eigenschaften untersucht. Durch Generierung von GFP („green fluorescent protein“)-PrP-Chimären und deren Analyse mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie konnten Informationen über den intrazellulären Transport dieser mutierten Proteine gewonnen werden. Für beide Mutationen wurde ein vergleichbarer, stark vom Wildtyp abweichender zellulärer Phänotyp nachgewiesen. Als Charakteristika dieses Phänotyps konnten unter anderem eine verringerte Expression der mutierten Proteine auf der Zelloberfläche bei gleichzeitig verstärkter Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum sowie ein verlangsamter Transport durch die Zelle identifiziert werden. Die Expression der mutierten Proteine über längere Zeiträume mittels stabil transfizierter Zelllinien resultierte in starker Aggregation der Zellen, welche von verringerter Viabilität begleitet war. Darüber hinaus führten beide Mutationen zur Entstehung erhöhter Mengen an Proteinase K-resistentem PrP, welches sich durch spezifische Inhibierung des proteasomalen Degradationspfades im Zytosol anreichern ließ. Auslöser hierfür ist wahrscheinlich der

mittels *in vitro*-Simulierung der Proteinsynthese nachgewiesene erhöhte Anteil transmembran orientierter PrP-Moleküle. Es konnte auch gezeigt werden, dass sich G114V- und A117V-PrP von PrP^{Sc}, der infektiösen Isoform des Prionproteins, unterscheiden. Dies deutet darauf hin, dass beide Mutationen innerhalb der familiären Prionkrankheiten eine eigene Gruppe von Krankheiten repräsentieren, welche sich durch Nicht-Übertragbarkeit auszeichnet – eine Eigenschaft, welche für die Mutation A117V bereits bestätigt wurde.

Die bei den Mutationen G114V und A117V detektierte Anhäufung an zytosolischem PrP stellt möglicherweise ein Charakteristikum sämtlicher Prionkrankheiten dar, welches sich entsprechend der unterschiedlichen Weiterprozessierung dieses zytosolischen PrPs in verschiedenen Phänotypen manifestiert.

6. Literaturverzeichnis

Alper T, Cramp WA, Haig DA, Clarke MC. 1967. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* 214:764-66

Alper T, Haig DA, Clarke MC. 1966. The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 22:278-84

Anderson RM, Donnelly CA, Ferguson NM, Woolhouse MEJ, Watt CJ, *et al.* 1996. Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature* 382:779-88

Arnold JE, Tipler C, Laszlo L, Hope J, Landon M, Mayer RJ. 1995. The abnormal isoform of the prion protein accumulates in late-endosome-like organelles in scrapie-infected mouse brain. *J. Pathol.* 176:403-11

Barron RM, Thomson V, Jamieson E, Melton DW, Ironside J, Will R, Manson JC. 2001. Changing a single amino acid in the N-terminus of murine PrP alters TSE incubation time across three species barriers. *EMBO J.* 18:5070-78

Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Wälchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB, Weissmann C. 1986. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46:417-28

Beardsley T. 1990. Oravske kuru – a human dementia raises the stakes in mad cow disease (news). *Sci. Am.* 263:24-26

Bendheim PE, Barry RA, DeArmond SJ, Stites DP, Prusiner SB. 1984. Antibodies to a scrapie prion protein. *Nature* 310:418-21

Bessen RA, Marsh RF. 1992. Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent. *J. Virol.* 66:2096-101

Bessen RA, Marsh RF. 1994. Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J. Virol.* 68:7859-68

Bessen RA, Kocisko DA, Raymond GJ, Nandan S, Lansbury PT, Caughey B. 1995. Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. *Nature* 375:698–700

Biedler JL, Helson L, Spengler BA. 1973. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res.* 33:2643-52

Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB. 1982. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 218:1309-11

Bonifacino JS, Klausner RD. 1994. Degradation of proteins retained in the endoplasmic reticulum. In *Cellular Proteolytic Systems*. Ciechanover AJ, Schwartz AL. John Wiley & Sons. Inc. NY. 137-69

- Borchelt DR, Scott M, Taraboulos A, Stahl N, Prusiner SB. 1990. Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J. Cell Biol.* 110:743–52
- Borchelt DR, Taraboulos A, Prusiner SB. 1992. Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* 267:16188–99
- Bosque PJ, Ryou C, Telling G, Peretz D, Legname G, DeArmond SJ, Prusiner SB. 2002. Prions in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:3812–17
- Brandner S, Isenmann S, Raeber A, Fischer M, Sailer A, *et al.* 1996a. Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* 379:339–43
- Brandner S, Raeber A, Sailer A, Blättler T, Fischer M, Weissmann C, Aguzzi A. 1996b. Normal host prion protein (PrP^C) is required for scrapie spread within the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:13148–51
- Brown DR, Herms J, Kretzschmar HA. 1994. Mouse cortical cells lacking cellular PrP survive in culture with a neurotoxic PrP fragment. *NeuroReport* 5:2057–60
- Brown DR, Schmidt B, Kretzschmar HA. 1996. Role of microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 380:345–47
- Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, *et al.* 1997. The cellular prion protein binds copper *in vivo*. *Nature* 390:684–87
- 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 DR, Clive C, Haswell SJ. 2001. Antioxidant activity related to copper binding of native prion protein. *J. Neurochem.* 76:69–76
- Brown DR, Nicholas RStJ, Canevari L. 2002. Lack of Prion Protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress. *J. Neuroscience Res.* 67:211–24
- Brown P. 1988. Human growth hormone therapy and Creutzfeldt-Jakob Disease : a drama in three acts. *Pediatrics* 81:85–92
- Brown P, Goldfarb LG, Kovanen J, Haltia M, Cathala F, Sulima M, Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC. 1992. Phenotypic characteristics of familial Creutzfeldt-Jakob disease associated with the codon 178Asn PRNP mutation. *Ann. Neurol.* 3:282–85
- Brown P, Gibbs CJ Jr, Rodgers-Johnson P, Asher DM, Sulima MP, Bacote A, Goldfarb LG, Gajdusek DC. 1994. Human spongiform encephalopathy: the National Institutes of Health series of 300 cases of experimentally transmitted disease. *Ann. Neurol.* 35:513–29
- Bruce ME, Fraser H, McBride PA, Scott JR, Dickinson AG. 1992. The basis of strain variation in scrapie. See Prusiner *et al.* 1992. pp.497–508

Bruce ME, Chree A, McConnell I, Foster J, Pearson G, Fraser H. 1994. Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* 343:405-11

Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnel I, Drummond D, *et al.* 1997. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by BSE agent. *Nature* 389:498-501

Büeler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, *et al.* 1992. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356:577-82

Büeler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, Weissmann C. 1993. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73:1339-47

Büeler H, Raeber A, Sailer A, Fischer M, Aguzzi A, Weissmann C. 1994. High prion and PrP^{Sc} levels but delayed onset of disease in scrapie-inoculated mice heterozygous for a disrupted PrP gene. *Mol. Med.* 1:19-30

Bugiani O, Giaccone G, Piccardo P, Morbin M, Tagliavini F, Ghetti B. 2000. Neuropathology of Gerstmann-Sträussler-Scheinker Disease. *Microscopy research and technique* 50:10-15

Bullock WO, Fernandez JM, Short JM. 1987. XL-1 Blue : a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* 5:376-78

Callebaut I, Tasso A, Brasseur R, Burny A, Portetelle D, Mornon JP. 1994. Common prevalence of alanine and glycine in mobile reactive centre loops of serpins and viral fusion peptides: Do prions possess a fusion peptide? *J. Computer-aided Molecular Design* 8:175-91

Capellari S, Parchi P, Russo CM, Sanford J, Sy MS, Gambetti P, Petersen RB. 2000. Effect of the E200K Mutation on Prion Protein Metabolism. *Am. J. Pathol.* 2:613-22

Caughey B, Race RE, Ernst D, Buchmeier MJ, Chesebro B. 1989. Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. *J. Virol.* 63:175-81

Caughey B, Raymond GJ. 1991a. The scrapie associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease and phospholipase-sensitive. *J. Biol. Chem.* 266:18217-23

Caughey B, Raymond GJ, Ernst D, Race RE. 1991b. N-terminal truncation of the scrapie-associated form of PrP by lysosomal protease(s): Implications regarding the site of conversion of PrP to the protease-resistant state. *J. Virol.* 65:6597-603

Caughey B, Dong A, Bhat KS, Ernst D, Hayes SF, Caughey WS. 1991c. Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry* 30:7672-80

Chapman J, Ben-Israel J, Goldhammer Y, Korczyn AD. 1994. The risk of developing Creutzfeldt-Jakob disease in subjects with the PRNP gene codon 200 point mutation. *Neurology* 9:1683-86

- Chardin P, McCormick F. 1999. Brefeldin A: The advantage of being uncompetitive. *Cell* 97: 153-55
- Chazot G, Broussolle E, Lapras C, Blättler T, Aguzzi A, Kopp N. 1996. New variant of Creutzfeldt-Jakob disease in a 26-year-old French man. *Lancet* 347:1181
- Chesebro B. 1999. Prion protein and the transmissible spongiform encephalopathy diseases. *Neuron* 24:503-06
- Chesebro B, Race R, Wehrly K, Nishio J, Bloom M, Lechner D, Bergstrom S, Robbins K, Mayer L, Keith JM, Garon C, Haase A. 1985. Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* 315:331-33
- Chessler SD, Byers PH. 1992. Defective folding and stable association with protein disulfide isomerase/prolyl hydroxylase of type I procollagen with a deletion in the pro $\alpha 2(I)$ chain that preserves the Gly-X-Y repeat pattern. *J. Biol. Chem.* 267:7751-57
- Chiarini LB, Freitas AR, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Linden R. 2002. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *EMBO J.* 13:3317-26
- Cochius JJ, Hyman N, Esiri MM. 1992. Creutzfeldt-Jakob Disease in a recipient of human pituitary-derived gonadotropin: a second case. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 55:1094-95
- Cohen FE, Prusiner SB. 1998. Pathologic conformations of prion proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 67:793-819
- Collinge J, Beck J, Campbell T, Estibeiro K, Will RG. 1996. Prion protein gene analysis in new variant cases of Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 348:56
- Collinge J, Palmer MS, Sidle KCL, Gowland I, Medori R, *et al.* 1995a. Transmission of fatal familial insomnia to laboratory animals. *Lancet* 346:569-70
- Collinge J, Palmer MS, Sidle KCL, Hill AF, Gowland I, *et al.* 1995b. Unaltered susceptibility to BSE in transgenic mice expressing human prion protein. *Nature* 378:779-83
- Collinge J, Rossor M. 1996. A new variant of prion disease. *Lancet* 347:916-17
- Collinge J, Sidle KCL, Meads J, Ironside J, Hill AF. 1996. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of "new variant" CJD. *Nature* 383:685-90
- Collinge J. 1997. Human prion diseases and bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Hum. Mol. Genet.* 6:1699-705
- Come JH, Fraser PE, Lansbury PT Jr. 1993. A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5959-63
- Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. 1996. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.* 65:801-47
- Craig EA, Gambill BD, Nelson RJ. 1993. Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol. Rev.* 57:402-14

- Craiu A, Gaczynska M, Akopian T, Gramm CF, Fenteany G, *et al.* 1997. Lactacystin and clasto-lactacystin beta-lactone modify multiple proteasome beta-subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation. *J. Biol. Chem.* 272:13437-45
- Cuillé J, Chelle PL. 1936. La Maladie dite tremblante du mouton est-elle inocuable? *C.R. Acad. Sci.* 203:1552-54
- Daude N, Lehmann S, Harris DA. 1997. Identification of intermediate steps in the conversion of a mutant prion protein to a scrapie-like form in cultured cells. *J. Biol. Chem.* 272:11604-12
- DeArmond, SJ, Yang SL, Lee A, Bowler R, Taraboulos A, Groth D, Prusiner, SB. 1993. Three scrapie prion isolates exhibit different accumulation patterns of the prion protein scrapie isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6449-53
- DeArmond SJ, Qiu Y, Sanchez H, Spilman PR, Ninchak-Casey A, Alonso D, Daggett V. 1999. PrPc glycoform heterogeneity as a function of brain region: implications for selective targeting of neurons by prion strains. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58:1000-09
- DeBurman SK, Raymond GJ, Caughey B, Lindquist S. 1997. Chaperone-supervised conversion of prion protein to its protease-resistant form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:13938-43
- De Fea K, Calayag M, Yost C, Mirels L, Prusiner SB, Lingappa VR. 1994. Determinants of carboxyl-terminal domain translocation during prion protein biogenesis. *J. Biol. Chem.* 269:16810-20
- Demart S, Fournier JG, Creminon C, Frobert Y, Lamoury F, Marce D, Lasmezas C, Dormont D, Grassi J, Deslys JP. 1999. New insight into abnormal prion protein using monoclonal antibodies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265:652-57
- Deslys JP, Lasmezas CI, Streichenberger N, Hill A, Collinge J, Dormont D, Kopp N. 1997. New variant Creutzfeldt-Jakob disease in France. *Lancet* 349:30-31
- Dickinson AG, Meikle VM. 1971. Host-genotype and agent effects in scrapie incubation: change in allelic interaction with different strains of agent. *Mol. Gen. Genet.* 112:73-79
- Diringer H, Gelderblom H, Hilmert H, Ozel M, Edelbluth C, Kimberlin RH. 1983. Scrapie infectivity, fibrils and low molecular weight protein. *Nature* 306:476-78
- Dodelet VC, Cashman NR. 1998. Prion protein expression in human leukocyte differentiation. *Blood* 91:1556-61
- Doh-ura K, Tateishi J, Sasaki H, Kitamoto T, Sakaki Y. 1989. Pro-Leu change at position 102 of prion protein is the most common but not the sole mutation related to Gerstmann-Sträussler syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163:974-79
- Donne DG, Viles JH, Groth D, Mehdorn I, James TL, Cohen FE, Prusiner SB, Wright PE, Dyson HJ. 1997. Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N-terminus is highly flexible. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:13452-56

- Donnelly CA, Ferguson NM, Ghani AC, Anderson RM. 2002. Implications of BSE infection screening data for the scale of the British BSE epidemic and current European infection levels. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 269:2179-90
- Dürig J, Giese A, Schulz-Schaeffer W, Rosenthal C, Schmücker U, Bieschke J, Dührsen U, Kretzschmar HA. 2000. Differential constitutive and activation-dependent expression of prion protein in human peripheral blood leucocytes. *Br. J. Haematol.* 108:488-95
- Eigen M. 1996. Prionics or the kinetic basis of prion diseases. *Biophys. Chem.* 63:A1-A18
- Ellgaard L, Molinari M, Helenius A. 1999. Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* 286:1882-88
- Endo T, Groth D, Prusiner SB, Kobata A. 1989. Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. *Biochemistry* 28:8380-88
- Ettaiche M, Pichot R, Vincent JP, Chabry J. 2000. *In vivo* cytotoxicity of the Prion Protein Fragment 106-126. *J. Biol. Chem.* 47:36487-90
- Farrington M. 1995. Use of surgical instruments in Creutzfeldt-Jakob Disease (letter). *Lancet* 345:194
- Fernandez-Lopez S, Kim HS, Choi EC, Delgado M, Granja JR, Khasanov A, Kraehenbuhl K, *et al.* 2001. Antibacterial agents based on the cyclic D,L-alpha-peptide architecture. *Nature* 412:452-55
- Fischer M, Rulicke T, Raber A, Sailer A, Oesch B, *et al.* 1996. Prion protein (PrP) with amino terminal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J.* 15:1255-64
- Fischer MB, Roeckl C, Parizek P, Schwarz HP, Aguzzi A. 2000. Binding of disease-associated prion protein to plasminogen. *Nature* 408:479-83
- Ford MJ, Burton LJ, Li H, Graham CH, Frobert Y, Grassi J, Hall SM, Morris RJ. 2002. A marked disparity between the expression of prion protein and its message by neurones of the CNS. *Neuroscience* 111:533-51
- Forloni G, Angeretti N, Chiesa R, Monzani E, Salmona M, *et al.* 1993. Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 362:543-46
- Forloni G, Bo RD, Angeretti N, Chiesa R, Smirolto S, Doni R, Ghibaudi E, Salmona M, *et al.* 1994. A neurotoxic prion protein fragment induces rat astroglial proliferation and hypertrophy. *Eur. J. Neurosci.* 6:1415-22
- Fraser H, Dickinson AG. 1968. The sequential development of the brain lesions of scrapie in three strains of mice. *J. Comp. Path.* 78:301-11
- Gabizon R, McKinley MP, Prusiner SB. 1987. Purified prion proteins and scrapie infectivity copartition into liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4017-21

- Gabizon R, McKinley MP, Groth D, Prusiner SB. 1988. Immunoaffinity purification and neutralization of scrapie prion infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6617-21
- Gabizon R, Telling G, Meiner Z, Halimi M, Kahana I, Prusiner SB. 1996. Insoluble wild-type and protease-resistant mutant prion protein in brains of patients with inherited prion disease. *Nat Med.* 1:59-64
- Gabriel JM, Oesch B, Kretzschmar H, Scott M, Prusiner SB. 1992. Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:9097-101
- Gajdusek DC, Gibbs CJ Jr, Alpers MP. 1966. Experimental transmission of a kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* 209:794-96
- Galvez S, Masters C, Gajdusek C. 1980. Descriptive epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease in Chile. *Arch. Neurol.* 37:11-14
- Gambetti P, Parchi P, Petersen RB, Chen SG, Lugaresi E. 1995. Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob Disease: clinical, pathological and molecular features. *Brain Pathologie* 5:43-51
- Gething MJ, Sambrook J. 1992. Protein folding in the cell. *Nature* 355:33-45
- Gerstmann J, Sträussler E, Scheinker I. 1936. Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems. Zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns. *Z. Neur. Psychiat.* 154:736-62
- Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC, Asher DM, Alpers MP, Beck E, *et al.* 1968. Creutzfeldt-Jakob Disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science* 161:388-89
- Gibbs CJ Jr, Joy A, Heffner R, Franko M, Miyazaki M, Asher DM, Parisi JE, Brown PW, Gajdusek DC. 1985. Clinical and pathological features and laboratory confirmation of Creutzfeldt-Jakob Disease in a recipient of pituitary-derived human growth hormone. *N. Engl. J. Med.* 313:734-38
- Giese A, Groschup MH, Hess B, Kretzschmar HA. 1995. Neuronal cell death in scrapie-infected mice is due to apoptosis. *Brain Pathol.* 5:213-21
- Giese A, Brown DR, Groschup MH, Feldmann C, Haist I, Kretzschmar HA. 1998. Role of microglia in neuronal cell death in prion disease. *Brain Pathol.* 8:449-57
- Gilmore R, Blobel G. 1983. Transient involvement of signal recognition particle and its receptor in the microsomal membrane prior to protein translocation. *Cell* 35:677-85
- Gossen M, Bujard H. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5547-51
- Gottesman S, Maurizi MR. 1992. Regulation by proteolysis: energy-dependent proteases and their targets. *Microbiol. Rev.* 56:593-621
- Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Forlenza OV, Cabral AL, *et al.* 2000a. Cellular prion protein binds laminin and mediates neurogenesis. *Brain. Res.* 76:85-92

- Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Martins VR, Jay DG, Brentani RR. 2000b. Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. *FEBS Lett.* 482:257-60
- Griffith JS. 1967. Self replication and scrapie. *Nature* 215:1043-44
- Hadlow WJ. 1959. Scrapie and kuru. *Lancet* 2:289-90
- Haik S, Peyrin JM, Lins L, Rosseneu MY, Brasseur R, Langeveld JP, Tagliavini F, *et al.* 2000. Neurotoxicity of the Putative Transmembrane Domain of the Prion Protein. *Neurobiol. of Disease* 7:644-56
- 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
- Harlow E, Lane D. 1988. Antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Harmey JH, Doyle D, Brown V, Rogers MS. 1995. The cellular isoform of the prion protein, PrP^C, is associated with caveolae in mouse neuroblastoma (N2a) cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 210:753-59
- Harris DA, Lele P, Snider WD. 1993. Localization of the mRNA for a chicken prion protein by in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:4309-13
- Hartsough GR, Burger D. 1965. Encephalopathy of mink – 1. Epizootiologic and clinical observations, 2. Experimental and natural transmission. *J. Infect. Dis.* 115:387-99
- Hay B, Barry RA, Lieberburg I, Prusiner SB, Lingappa VR. 1987a. Biogenesis and transmembrane orientation of the cellular isoform of the scrapie prion protein. *Mol. Cell. Biol.* 7:914-20
- Hay B, Prusiner SB, Lingappa VR. 1987b. Evidence for a secretory form of the cellular prion protein. *Biochemistry* 26:8110-15
- Hayward PA, Bell JE, Ironside JW. 1994. Prion protein immunocytochemistry: reliable protocols for the investigation of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 20:375-83
- Hegde RS, Mastrianni JA, Scott MR, DeFea KA, Tremblay P, Torchia M, *et al.* 1998. A Transmembrane Form of the Prion Protein in Neurodegenerative Disease. *Science* 279:827-34
- Hegde RS, Tremblay P, Groth D, DeArmond SJ, Prusiner SB, Lingappa VR. 1999. Transmissible and genetic prion diseases share a common pathway of neurodegeneration. *Nature* 402:822-26
- Herms JW, Kretschmar HA, Titz S, Keller BU. 1995. Patch-clamp analysis of synaptic transmission to cerebellar Purkinje cells of prion protein knockout mice. *Eur. J. Neurosci.* 7:2508-12

- Hermes JW, Korte S, Gall S, Schneider I, Dunker S, Kretzschmar HA. 2000. Altered intracellular calcium homeostasis in cerebellar granule cells of prion protein-deficient mice. *J. Neurochem.* 75:1487-92
- Hershko A, Ciechanover A. 1998. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67:425-79
- Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, Sidle KCL, Gowland I, Collinge J. 1997. The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 389:448-50
- Hill AF, Antoniou M, Collinge J. 1999a. Protease-resistant prion protein produced *in vitro* lacks detectable infectivity. *J. Gen. Virol.* 80:11-14
- Hill AF, Butterworth RJ, Joiner S, Jackson GS, Rossor MN, *et al.* 1999b. Investigation of variant Creutzfeldt Jakob disease and other human prion disease with tonsil biopsy samples. *Lancet* 353:183-89
- Hochstrasser M. 1996. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.* 30:405-39
- Hogan RN, Cavanagh HD. 1995. Transplantation of corneal tissue from donors with diseases of the central nervous system. *Cornea* 14:547-53
- Hornshaw MP, McDermott JR, Candy JM. 1995a. Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 207:621-29
- Hornshaw MP, McDermott JR, Candy JM, Lakey JH. 1995b. Copper binding to the N-terminal tandem repeat region of mammalian and avian prion protein structural studies using synthetic peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214:993-99
- Hosszu LLP, Baxter NJ, Jackson GS, Power A, Clarke AR, *et al.* 1999. Structural mobility of the human prion protein probed by backbone hydrogen exchange. *Nat. Struct. Biol.* 6:740-43
- 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, Scott M, Foster D, Groth DF, DeArmond SJ, Prusiner SB. 1990. Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein. *Science* 250:1587-90
- Hsiao K, Cass C, Schellenberg GD, Bird T, Devine-Gage E, Wisniewski H, Prusiner SB. 1991. A prion protein variant in a family with the telencephalic form of Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome. *Neurology* 41:681-84
- Hsiao K, Groth D, Scott M, Yang S-L, Serban H, Rapp D, *et al.* 1994. Serial transmission in rodents of neurodegeneration from transgenic mice expressing mutant prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9126-30
- Hurtley SM, Helenius A. 1989. Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5:277-307
- Ivanova L, Barmada S, Kummer T, Harris DA. 2001. Subcellular localization of mutant PrP. *J. Biol. Chem.* 276:42409-21

- Jackson GS, Hosszu LL, Power A, Hill AF, Kenney J, Saibil H, Craven CJ, *et al.* 1999. Reversible conversion of monomeric human prion protein between native and fibrilogenic conformation. *Science* 283:1935-37
- Jackson GS, Beck JA, Navarette C, Brown J, Sutton PM, Contreras M, Collinge J. 2001. HLA-DQ7 antigen and resistance to variant CJD. *Nature* 414:269-70
- James TL, Liu H, Ulyanov NB, Farr-Jones S, Zhang H, *et al.* 1997. Solution structure of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:10086–91
- Jarret JT, Lansbury PT Jr. 1993. Seeding „one-dimensional crystallization“ of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 73:1055-58
- Jeffrey M, Wells GA. 1988. Spongiform encephalopathy in a nyala (*Tragelaphus angasi*). *Vet. Pathol.* 25:398-99
- Jin T, Gu Y, Zanusso G, Sy MS, Kumar A, Cohen M, Gambetti P, Singh N. 2000. The Chaperone Protein BiP Binds to a Mutant Prion Protein and Mediates Its Degradation by the Proteasome. *J. Biol. Chem.* 49:38699-704
- Johnston JA, Ward CL, Kopito RR. 1998. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J. Cell Biol.* 143:1883-98
- Kaneko K, Zulianello L, Scott M, Cooper CM, Wallace AC, James TJ, *et al.* 1997. Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:10069-74
- Kascsak RJ, Rubenstein R., Merz PA, Tonna-DeMasi M, Fersko R, Carp RI, Wisniewski HM, Diringier H. 1987. Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins. *J. Virol.* 61:3688-93
- Kaufman RJ. 1999. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.* 13:1211-33
- Kellings K, Meyer N, Mirenda C, Prusiner SB, Riesner D. 1992. Analysis of nucleic acids in purified scrapie prion preparations. *Arch. Virol. Suppl.* 7:215-25
- Kellings K, Meyer N, Mirenda C, Prusiner SB, Riesner D. 1993. Further analysis of nucleic acids in purified scrapie prion preparations by improved return refocusing gel electrophoresis. *J. Gen. Virol.* 73:1025-29
- Kimberlin RH, Cole S, Walker CA. 1986. Transmissible mink encephalopathy (TME) in Chinese hamsters: identification of two strains of TME and comparisons with scrapie. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 12:197-206
- Kimberlin RH, Walker CA, Fraser H. 1989. The genomic identity of different strains of mouse scrapie is expressed in hamsters and preserved on reisolation in mice. *J. Gen. Virol.* 70:2017-25

- Kitamoto T, Tateishi J, Tashima T, Takeshita I, Barry RA, DeArmond SJ, Prusiner SB. 1986. Amyloid plaques in Creutzfeldt-Jakob-Disease stain with prion protein antibodies. *Ann. Neurol.* 20:204-8
- Kitamoto T, Yi R, Mohri S, Tateishi J. 1990. Cerebral amyloid in mice with Creutzfeldt-Jakob Disease is influenced by the strain of the infectious agent. *Brain Res.* 508:165-7
- Kitamoto T, Muramoto T, Mohri S, Doh-Ura K, Tateishi J. 1991. Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Virol.* 65:6292-95
- Klatzo I, Gajdusek DC, Zigas V. 1959. Pathology of kuru. *Lab. Invest.* 8:799-847
- Klausner RD, Sitia R. 1990. Protein degradation in the endoplasmic reticulum. *Cell* 62:611-14
- Klein MA, Frigg R, Flechsig E, Raeber AJ, Kalinke U, Bluethmann H, Bootz F, Suter M, Zinkernagel RM, Aguzzi A. 1997. A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature* 390:687-90
- Klein MA, Frigg R, Raeber AJ, Flechsig E, Hegyi I, Zinkernagel RM, Weissmann C, Aguzzi A. 1998. PrP expression in B lymphocytes is not required for prion neuroinvasion. *Nat. Med.* 4:1429-33
- Koch TK, Berg BO, DeArmond SJ, Gravina RF. 1985. Creutzfeldt-Jakob Disease in a young adult with idiopathic hypopituitarism – possible relation to the administration of cadaveric human growth hormone. *N. Engl. J. Med.* 313:731-33
- Kocisko DA, Come JH, Priola SA, Chesebro B, Raymond GJ, *et al.* 1994. Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* 370:471–74
- Kocisko DA, Priola SA, Raymond GJ, Chesebro B, Lansbury PT Jr, Caughey B. 1995. Species specificity in the cell-free conversion of prion protein to protease-resistant forms: a model for the scrapie species barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3923–27
- Kopito RR. 1997. ER quality control: the cytoplasmic connection. *Cell* 88:427-30
- Krasemann S, Groschup MH, Harmeyer S, Hunsmann G, Bodemer W. 1996. Generation of monoclonal antibodies against human prion proteins in PrP^{0/0} mice. *Mol. Med.* 2:724-34
- Kretzschmar HA, Prusiner SB, Stowring LE, DeArmond SJ. 1986a. Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am. J. Pathol.* 122:1-5
- Kretzschmar HA, Stowring LE, Westaway D, Stubblebine WH, Prusiner SB, DeArmond SJ. 1986b. Molecular cloning of a human prion protein cDNA. *DNA* 5:315-24
- Kretzschmar HA. 1998. Übertragbare spongiforme Enzephalopathien (Prion-Krankheiten): molekulare Grundlagen und *in-vitro*-Modelle. *Wien. Medizin. Wochenschr.* 148:67-73
- Kretzschmar HA, Windl O. 1998. Spongiforme Enzephalopathien. In *Neurogenetik*, S. 95-107, Springer-Verlag Berlin Heidelberg

- Kühn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewski K. 1995. Inducible Gene Targeting in Mice. *Science* 269:1427-29
- Kunkel TA. 1985. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-92
- Kurschner C, Morgan JI. 1995. The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 30:165–68
- Kurschner C, Morgan JI. 1996. Analysis of interaction sites in homo- and heteromeric complexes containing Bcl-2 family members and the cellular prion protein. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 37:249–58
- Kyhse-Andersen J. 1984. Electroblotting of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 10:203-09
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-85
- Lasmézas CI, Deslys JP, Demaimay R, Adjou KT, Dormont D, Robain O, Ornside J, Hauw JJ. 1996. BSE transmission to macaques. *Nature* 381:743-44
- Lasmézas CI, Cesbron JY, Deslys JP, Demaimay R, Adjou KT, Rioux R, Lemaire C, Loch C, Dormont D. 1996b. Immune system-dependent and - independent replication of the scrapie agent. *Virology* 70:1292-95
- Lasmézas CI, Deslys JP, Robain O, Jaegly A, Beringue V, *et al.* 1997. Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science* 275:402–05
- Laszlo L, Lowe J, Self T, Kenward N, Landon M, McBride T, Farquhar C, McConnell I, Brown J, Hope J. 1992. Lysosomes as key organelles in the pathogenesis of prion encephalopathies. *J. Pathol.* 166:333-41
- Lee KS, Magalhaes AC, Zanata SM, Brentani RR, Martins VR, Prado MAM. 2001. Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion mutants in living cells. *J. Neurochem.* 79:79-87
- Lehmann S, Harris DA. 1995. A mutant prion protein displays an aberrant membrane association when expressed in cultured cells. *J. Biol. Chem.* 270:24589-97
- Lehmann S, Harris DA. 1996a. Mutant and infectious prion proteins display common biochemical properties in cultured cell. *J. Biol. Chem.* 271:1633-37
- Lehmann S, Harris DA. 1996b. Two mutant prion proteins expressed in cultures cells acquire biochemical properties reminiscent of the scrapie isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:5610-14
- Lehmann S, Harris DA. 1997. Blockade of glycosylation promotes acquisition of Scrapie-like properties by the prion protein in cultured cells. *J. Biol. Chem.* 272:21479-87

- Lehmann S, Daude N, Harris DA. 1997. A wild-type prion protein does not acquire properties of the scrapie isoform when coexpressed with a mutant prion protein in cultured cells. *Brain Res Mol Brain Res* 1:139-45
- Levine H. 1995. Soluble multimeric Alzheimer beta(1-40) pre-amyloid complexes in dilute solution. *Neurobiol. Aging* 16:755-64
- Li R, Liu D, Zanusso G, Liu T, Fayen JD, Huang JH, Petersen RB, Gambetti P, Sy MS. 2001. The expression and potential function of the cellular prion protein in human lymphocytes. *Cell. Immun.* 207:49-58
- Lingappa VR, Lingappa JR, Prasad R, Ebner KF, Blobel G. 1978. Coupled cell-free synthesis, segregation, and core glycosylation of a secretory protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:2338-42
- Lippincott-Schwartz J, Yuan LC, Bonifacino S, Klausner RD. 1989. Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: A evidence for membrane cycling from the Golgi to ER. *Cell* 56:801-13
- Lledo PM, Tremblay P, DeArmond SJ, Prusiner SB, Nicoll RA. 1996. Mice deficient for prion protein exhibit normal neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:2403-7
- 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. USA* 83:6372-76
- Lopez CD, Yost CS, Prusiner SB, Myers RM, Lingappa VR. 1990. Unusual topogenic sequence directs prion protein biogenesis. *Science* 248:226-29
- Lorenz H, Windl O, Kretzschmar HA. 2002. Cellular phenotyping of secretory and nuclear prion proteins associated with inherited prion diseases. *J. Biol. Chem.* 277:8508-16
- Low MG. 1989. The glycosyl-phosphatidyl anchor of membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 988:427-54
- Lugaresi E, Montagna P, Baruzzi A, Cortelli P, Tinuper P, Zucconi M, Gambetti PL, Medori R. 1986. Fatal familial insomnia with a malignant course: a new thalamic disease. *Rev. Neurol.* 142:791-92
- Ma J, Lindquist S. 1999. *De novo* generation of a PrP^{Sc}-like conformation in living cells. *Nat. Cell Biol.* 1:358-61
- 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. USA* 26:14955-60
- Ma J, Lindquist S. 2002. Conversion of PrP to a Self-Perpetuating PrP^{Sc}-like Conformation in the Cytosol. *Science*. Scienceexpress published ahead of print. 10.1126/science.1073619

- Ma J, Wollmann R, Lindquist S. 2002. Neurotoxicity and Neurodegeneration When PrP Accumulates in the Cytosol. *Science*. Scienceexpress published ahead of print. 10.1126/science.1073725
- Mallucci GR, Campbell TA, Dickinson A, Beck J, Holt M, Plant G, de Pauw KW, Hakin RN, *et al.* 1999. Inherited prion disease with an alanine to valine mutation at codon 117 in the prion protein gene. *Brain* 122:1823-37
- Mallucci GR, Ratté S, Asante EA, Linehan J, Gowland I, *et al.* 2002. Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *EMBO J.* 21:202-10
- Manson J, West JD, Thomson V, McBride P, Kaufman MH, Hope J. 1992. The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development* 115:117-22
- Manson JC, Clarke AR, Hooper ML, Aitchison L, McConnell I, Hope J. 1994. 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol. Neurobiol.* 8:121-27
- Masters CL, Gajdusek DC, Gibbs CJ Jr. 1981. Creutzfeldt-Jakob disease virus isolations from the Gerstmann-Straussler syndrome with an analysis of the various forms of amyloid plaque deposition in the virus-induced spongiform encephalopathies. *Brain* 104:559-88
- Mastrianni JA, Curtis MT, Oberholtzer JC, Da Costa MM, DeArmond S, Prusiner SB, Garbern JY. 1995. Prion disease (PrP-A117V) presenting with ataxia instead of dementia. *Neurology* 45:2042-50
- Mastrianni JA, Iannicola C, Myers RM, DeArmond S, Prusiner SB. 1996. Mutation of the prion protein gene at codon 208 in familial Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 47:1305-12
- McGowan JP. 1922. Scrapie in sheep. *Scott. J. Agric.* 5:365-75
- McKinley MP, Meyer RK, Kenaga L, Rahbar F, Cotter R, Serban A, Prusiner SB. 1991a. Scrapie prion rod formation *in vitro* requires both detergent extraction and limited proteolysis. *J. Virol.* 65:1340-51
- McKinley MP, Taraboulos A, Kenaga L, Serban D, Stieber A, DeArmond SJ, Prusiner SB, Gonatas N. 1991b. Ultrastructural localization of scrapie prion proteins in cytoplasmic vesicles of infected cultured cells. *Lab. Invest.* 65:622-30
- Medori R, Montagna P, Tritschler HJ, LeBlanc A, Cortelli P, *et al.* 1992. Fatal familial insomnia: a second kindred with mutation of prion protein gene at codon 178. *Neurology* 42:669-70
- Merz PA, Somerville RA, Wisniewski HM, Iqbal K. 1981. Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathol.* 54:63-74
- Meyer N, Rosenbaum V, Schmidt B, Gilles K, Mirenda C, Groth D, Prusiner SB, Riesner D. 1991. Search for a putative scrapie genome in purified prion fractions reveals a paucity of nucleic acids. *J. Gen. Virol.* 72:37-50

- Mishra RS, Gu Y, Bose S, Verghese S, Kalepu S, Singh N. 2002. Cell surface accumulation of a truncated transmembrane prion protein in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease P102L. *J. Biol. Chem.* 277:24554-61
- Misumi Y, Miki K, Takatsuki A, Tamura G, Ikehara Y. 1986. Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 261:11398-403
- Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY. 1997. Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388:882-87
- Mouillet-Richard S, Ermonval M, Chebassier C, Laplanche JL, Lehmann S, *et al.* 2000. Signal Transduction through Prion Protein. *Science* 289:1925-28
- Mullis KB, Faloona FA. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* - a polymerase chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155:335-50
- Muramoto T, Scott M, Cohen FE, Prusiner SB. 1996. Recombinant scrapie-like prion protein of 106 amino acids is soluble. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:15457-62
- Naslavsky N, Stein R, Yanai A, Friedlander G, Taraboulos A. 1997. Characterization of Detergent-insoluble Complexes Containing the Cellular Prion Protein and Its Scrapie Isoform. *J. Biol. Chem.* 10:6324-31
- Negro A, Ballarin C, Bertoli A, Massimino ML, Sorgato C. 2001. The Metabolism and Imaging in Live Cells of the Bovine Prion Protein in its native Form or carrying single amino acid substitutions. *Mol. Cell. Neuroscience.* 17:521-38
- Neugut RH, Neugut AI, Kahana E, Stein Z, Alter M. 1979. Creutzfeldt-Jakob disease: familial clustering among Libyan-born Israelis. *Neurology* 2:225-31
- Nishida N, Harris DA, Vilette D, Laude H, Frobert Y, Grassi J, Casanova D, Milhavel O, Lehmann S. 2000. Successful Transmission of Three Mouse-Adapted Scrapie Strains to Murine Neuroblastoma Cell Lines Overexpressing Wild-Type Mouse Prion Protein. *J. Virol.* 74:320-25
- Nishimura A, Morita M, Nishimura Y, Sugino Y. 1990. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Research* 18:6169
- Nitrini R, Rosemberg S, Passos-Bueno MR, Teixeira da Silva LS, Iughetti P, Papadopoulos M, Carrilho PM, *et al.* 1997. Familial spongiform encephalopathy associated with a novel prion protein gene mutation. *Ann. Neurol.* 42:138-46
- Oda K, Hirose S, Takami N, Misumi Y, Takatsuki A, Ikehara Y. 1987. Brefeldin A arrests the intracellular transport of a precursor of complement C3 before its conversion site in rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 214:135-38
- Oesch B, Westaway D, Wälchli M, McKinley M P, 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* 40:735-46

- Okimoto N, Yamanaka K, Suenaga A, Hata M, Hoshino T. 2002. Computational Studies on Prion Proteins: Effect of Ala¹¹⁷ → Val Mutation. *Biophys. J.* 82:2746-57
- Palmer MS, Dryden AJ, Hughes JT, Collinge J. 1991. Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* 352:340-42
- Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Servan A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, Prusiner SB. 1993. Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10962-66
- Pan T, Li R, Wong BS, Liu T, Gambetti P, Sy MS. 2002. Heterogeneity of normal prion protein in two-dimensional immunoblot: presence of various glycosylated and truncated forms. *J. Neurochem.* 81:1092-101
- Panegyres PK, Toufexis K, Kakulas BA, Cernevakova L, Brown P, Ghetti B, Piccardo P, Dlouhy SR. 2001. A New *PRNP* Mutation (G131V) Associated With Gerstmann-Sträussler-Scheinker Disease. *Arch. Neurol.* 58:1899-1902
- Parchi P, Castellani R, Capellari S, Ghetti B, Young K, Chen SG, Farlow M, *et al.* 1996. Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann. Neurol.* 39:767-78
- Parchi P, Capellari S, Chen SG, Petersen RB, Gambetti P, Kopp N, Brown P, Kitamoto T, Tateishi J, Giese A, Kretschmar HA. 1997. Typing prion isoforms. *Nature* 386:232-33
- Parchi P, Giese A, Capellari S, Brown P, Schulz-Schaeffer W, Windl O, Zerr I, Budka H, Kopp N, Piccardo P, *et al.* 1999. Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann. Neurol.* 46:224-33
- Parodi AJ. 2000. Protein glucosylation and its role in protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* 69:69-93
- Pauly PC, Harris DA. 1998. Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J. Biol. Chem.* 273:33107-10
- Pattison IH. 1961. Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome. *J. Comp. Path.* 71:101-08
- Perutz MF, Finch JT, Berriman J, Lesk A. 2002. Amyloid fibers are water-filled nanotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 8:5591-95
- Petersen RB, Parchi P, Richardson SL, Urig CB, Gambetti P. 1996. Effect of the D178N mutation and the codon 129 polymorphism on the metabolism of the prion protein. *J. Biol. Chem.* 271:12661-68
- Peyrin J, Lasmézas C, Haik S, Tagliavini F, Salmona M, Williams A, Richie D, Deslys J, Dormont D. 1999. Microglial cells respond to amyloidogenic PrP peptide by the production of inflammatory cytokines. *Neuroreport* 10:723-29

- Piccardo P, Dlouhy SR, Lievens PMJ, Young K, Bird TD, Nochlin D, *et al.* 1998. Phenotypic Variability of Gerstmann-Sträussler-Scheinker Disease is Associated with Prion Protein Heterogeneity. *J. Neuropath. Exper. Neurol.* 57:979-88
- Piccardo P, Liepnieks JJ, William A, Dlouhy SR, Farlow MR, Young K, Nochlin D, Bird TD, Nixon RR, Ball MJ, DeCarli C, Burgiani O, *et al.* 2001. Prion Proteins with Different Conformations Accumulate in Gerstmann-Sträussler-Scheinker Disease Caused by A117V and F198S Mutations. *Am. J. Pathol.* 158:2201-07
- Pillot T, Lins L, Goethals M, Vanloo B, Baert J, Vandekerckhove J, Rosseneu M, Brasseur R. 1997. The 118-135 peptide of the human prion protein forms amyloid fibrils and induces liposome fusion. *J. Mol. Biol.* 274:381-93
- Priola SA, Caughey B, Race RE, Chesebro B. 1994. Heterologous PrP Molecules Interfere with Accumulation of Protease-Resistant PrP in Scrapie-Infected Murine Neuroblastoma Cells. *J. Virol.* 68:4873-78
- Priola SA. 1996. Similar protein signatures for BSE and vCJD. *Nat. Med.* 2:1303-04
- Priola SA, Chesebro B. 1998. Abnormal properties of prion protein with insertional mutations in different cell types. *J. Biol. Chem.* 273:11980-85
- Prusiner SB. 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216:136-44
- Prusiner SB, McKinley MP, Bowman KA, Bolton DC, Bendheim PE, Groth DF, Glenner GG. 1983. Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* 35:349-58
- Prusiner SB, Groth DF, Bolton DC, Kent SB, Hood LE. 1984. Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell* 38:127-34
- Prusiner SB, Scott M, Foster D, Pan KM, Groth D, *et al.* 1990. Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell* 63:673-86
- Prusiner SB. 1991. Molecular biology of prion diseases. *Science* 252:1515-22
- Prusiner SB, DeArmond SJ. 1994. Prion diseases and neurodegeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 17:311-39
- Prusiner SB. 1997. Prion diseases and the BSE crisis. *Science* 278:245-51
- Prusiner SB. 1998. Prions. *Natl. Acad. Sci. USA* 95:13363-83
- Prusiner SB. 1999. Prion Biology and Diseases. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory
- Race RE, Fadness LH, Chesebro B. 1987. Characterization of scrapie infection in mouse neuroblastoma cells. *J. Gen. Virol.* 68:1391-99

- Race RE, Caughey B, Graham K, Ernst D, Chesebro B. 1988. Analyses of frequency of infection, specific infectivity, and prion protein biosynthesis in scrapie-infected neuroblastoma cell clones. *J. Virol.* 62:2845-49
- Ridley RM & Baker HF. 1996. Variation on a theme of Creutzfeldt-Jakob disease: Implications of new cases with a young age at onset. *J. Gen. Virol.* 77:2895-904
- Riek R, Hornemann S, Wider G, Billeter M, Glockshuber R, Wüthrich K. 1996. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). *Nature* 382:180-82
- Riek R, Hornemann S, Wider G, Glockshuber R, Wüthrich K. 1997. NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP (23-231). *FEBS Lett.* 413:282-88
- Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, *et al.* 1994. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78:761-71
- 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. USA* 90:3182-86
- 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. USA* 96:13044-49
- Rudd PM, Wormald MR, Wing DR, Prusiner SB, Dwek RA. 2001. Prion glycoprotein: structure, dynamics, and roles for the sugars. *Biochemistry* 40:3759-66
- Saborio GP, Soto C, Kascasak RJ, Levy E, Kascasak R, Harris DA, Frangione B. 1999. Cell-Lysate Conversion of Prion Protein into its Protease-Resistant Isoform Suggests the Participation of a Cellular Chaperone. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 258:470-75
- Saborio GP, Permanne B, Soto C. 2001. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 411:810-13
- Safar J, Roller PP, Gajdusek DC, Gibbs CJ. 1993. Thermal stability and conformational transitions of scrapie amyloid (prion) protein correlate with infectivity. *Prot. Sci.* 2:2206-16
- Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, *et al.* 1998. Eight prion strains have PrP^{Sc} molecules with different conformations. *Nat. Med.* 10:1157-65
- Saiki RK, Gelfland DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-91
- Sakaguchi S, Katamine S, Shigematsu K, Nakatani A, Moriuchi R, Nishida N, Kurokawa K, Nakaoke R, Sato H, Jishage K, *et al.* 1995. Accumulation of proteinase K-resistant prion protein (PrP) is restricted by the expression level of normal PrP in mice inoculated with a mouse-adapted strain of the Creutzfeldt-Jakob Disease agent. *J. Virol.* 69:7586-92

- Sakaguchi S, Katamine S, Nishida N, Moriuchi R, Shigematsu K, *et al.* 1996. Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted *PrP* gene. *Nature* 380:528-31
- Salmona M, Forloni G, Diomede L, Algeri M, De Gioia L, Angeretti N, Giaccone G, Tagliavini F, Bugiani O. 1997. A neurotoxic and gliotrophic fragment of the prion protein increases plasma membrane microviscosity. *Neurobiol. Dis.* 4:47-57
- Samaia HB, Mari JD, Vallada HP, Moura RP, Simpson AJG, Brentani RR. 1997. A prion-linked psychiatric disorder. *Nature* 390:241
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-67
- Sanger F, Coulson AR. 1978. The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing. *FEBS Lett.* 87:107-10
- Sauer B, Henderson N. 1988. Site-specific DANN recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5166-70
- Schägger H, von Jagow G. 1987. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochem.* 166:368-79
- Schätzl HM, Da Costa M, Taylor L, Cohen F, Prusiner SB. 1995. Prion protein gene variation among primates. *J. Mol. Biol.* 245:362-74
- Schätzl HM, Laszlo L, Holtzman DM, Tatzelt J, DeArmond SJ, Weiner RI, Mobley WC, Prusiner SB. 1997. A Hypothalamic Neuronal Cell Line Persistently Infected with Scrapie Prions Exhibits Apoptosis. *J. Virol.* 11:8821-31
- Schwartz P. 1968. in "Amyloidosis" (Mandema E, Ruinen L, Scholten JH, Cohen AS). p. 400ff *Excerpta Medica*, Amsterdam
- Scott M, Safar J, Telling G, Nguyen O, Groth D, Torchia M, Koehler R, Tremblay P, Walther D, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB. 1997. Identification of a prion protein epitope modulating transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:14279-84
- Scott M, Foster D, Mirenda C, Serban D, Coufal F, Walchli M, Torchia M, Groth D, Carlson G, DeArmond SJ, *et al.* 1989. Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell* 59:847-57
- Scott M, Groth D, Foster D, Torchia M, Yang SL, DeArmond SJ, Prusiner SB. 1993. Propagation of prions with artificial properties in transgenic mice expressing chimeric PrP genes. *Cell* 73:979-88
- Scott M, Will R, Ironside JW, Nguyen HOB, Tremblay P, DeArmond SJ, *et al.* 1999. Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:15137-42

- Shaked GM, Fridlander G, Meiner Z, Taraboulos A, Gabizon R. 1999. Protease-resistant and detergent-insoluble prion protein is not necessarily associated with prion infectivity. *J. Biol. Chem.* 274:17981–86
- Shaked GM, Shaked Y, Kariv-Inbal Z, Halimi M, Avraham I, Gabizon R. 2001. A Protease-resistant Prion Protein Isoform is present in urine of animals and humans affected with Prion Diseases. *J. Biol. Chem.* 34:31479-82
- Shtilerman MD, Ding TT, Lansbury PT. 2002. Molecular Crowding Accelerates Fibrillization of α -Synuclein: Could an Increase in the Cytoplasmic Protein Concentration Induce Parkinson's Disease? *Biochemistry* 41:3855-60
- Shmerling D, Hegyi I, Fischer M, Blättler T, Brandner S, *et al.* 1998. Expression of aminoterminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell* 93:203–14
- Shyng SL, Huber MT, Harris DA. 1993. A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 268:15922-28
- Shyng SL, Lehmann S, Moulder KL, Harris DA. 1995. Sulfated glycans stimulate endocytosis of the cellular isoform of the prion protein, PrP^C, in cultured cells. *J. Biol. Chem.* 270:30221-29
- Sigurdsson B. 1954. A chronic encephalitis of sheep- with general remarks on infectins which develop slowly and some of their special characteristics. *B. Vet. J.* 110:341-54
- Simonc T, Duga S, Strumbo B, Asselta R, Ceciliani F, Ronchi S. 2000. cDNA cloning of turtle prion protein. *FEBS Lett.* 469:33-38
- Singh N, Zanusso G, Chen SG, Fujioka H, Richardson S, Gambetti P, Petersen RB. 1997. Prion protein aggregation reverted by low temperature in transfected cells carrying a prion protein gene mutation. *J. Biol. Chem.* 45:28461-70
- Spector DL, Goldman RD, Leinwand LA. 1998. Cells. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Spielhauer C, Schätzl HM. 2001. PrP^C directly interacts with proteins involved in signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 276:44604-12
- Stahl N, Baldwin MA, Teplow DB, Hood L, Gibson BW, Burlingame AL, Prusiner SB. 1993. Structural studies of the scrapie prion protein using massspectrometry 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* 51:229-40
- Stewart RS, Harris DA. 2001. Most pathogenic mutations do not alter the membrane topology of the prion protein. *J. Biol. Chem.* 276:2212-20

- Stewart RS, Drisaldi B, Harris D. 2001. A Transmembrane Form of the Prion Protein Contains an Uncleaved Signal Peptide and is Retained in the Endoplasmic Reticulum. *Mol. Biol. Cell* 12:881-89
- 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* 38:4885-95
- Stöckel J, Safar J, Wallace AC, Cohen FE, Prusiner SB. 1998. Prion protein selectively binds copper(II) ions. *Biochemistry* 37:7185-93
- Stöckel J, Hartl FU. 2001. Chaperonin-mediated *de novo* Generation of Prion Protein Aggregates. *J. Mol. Biol.* 313:861-72
- Strumbo B, Ronchi S, Bolis LC, Simonic T. 2001. Molecular cloning of the cDNA coding for *Xenopus laevis* prion protein. *FEBS Lett.* 508:170-74
- Supattapone S, Bosque P, Muramoto T, Wille H, Aagaard C, Peretz D, *et al.* 1999. Prion protein of 106 residues creates an artificial transmission barrier for prion replication in transgenic mice. *Cell* 96:869-78
- 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.* 294:912-17
- Tagliavini F, Prelli F, Verga L, Giaccone G, Sarma R, *et al.* 1993. Synthetic peptides homologous to prion protein residues 106-147 form amyloid-like fibrils in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:9678-82
- Taraboulos A, Serban D, Prusiner SB. 1990. Scrapie prion proteins accumulate in the cytoplasm of persistently infected cultured cells. *J. Cell Biol.* 110:2117-32
- Taraboulos A, Raeber AJ, Borchelt DR, Serban D, Prusiner SB. 1992. Synthesis and trafficking of prion proteins in cultured cells. *Mol. Biol. Cell* 3:851-63
- 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.* 129:121-32
- Tateishi J, Kitamoto T, Doh-ura K, Sakaki Y, Steinmetz G, Tranchant C, Warter JM, Heldt N. 1990. Immunochemical, molecular genetic, and transmission studies on a case of Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome. *Neurology* 40:1578-81
- Tateishi J, Kitamoto T. 1995. Inherited prion diseases and transmission to rodents. *Brain Path.* 5:53-59
- Tateishi J, Brown P, Kitamoto T, Hoque ZM, Roos R, Wollman R, Cervenakova L, Gajdusek DC. 1995. First experimental transmission of fatal familial insomnia. *Nature* 376:434-35
- Tateishi J, Kitamoto T, Hoque MZ, Furukawa H. 1996. Experimental transmission of Creutzfeldt-Jakob disease and related disorders to rodents. *Neurology* 46:532-37

Tatzelt J, Prusiner SB, Welch WJ. 1996. Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein. *EMBO J.* 15:6363-73

Telling GC, Scott M, Mastrianni J, Gabizon R, Torchia M, *et al.* 1995. Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* 83:79-90

Telling GC, Haga T, Torchia M, Tremblay P, DeArmond SJ, Prusiner SB. 1996a. Interactions between wild-type and mutant prion proteins modulate neurodegeneration in transgenic mice. *Genes Dev.* 10:1736-50

Telling GC, Parchi P, DeArmond SJ, Cortelli P, Montagna P, Gabizon R, *et al.* 1996b. Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science* 274:2079-82

Thackray AM, Klein MA, Aguzzi A, Bujdoso R. 2002. Chronic Subclinical Prion Disease Induced by Low-Dose Inoculum. *J. Virol.* 5:2510-17

The BSE Inquiry. 2000. The Inquiry into BSE and variant CJD in the United Kingdom. Vol. 1-16. www.bseinquiry.gov.uk

Tintner R, Brown P, Hedley-Whyte ET, Rappaport EB, Piccardo CP, Gajdusek DC. 1986. Neuropathologic verification of Creutzfeldt-Jakob Disease in the exhumed American recipient of human pituitary growth hormone: epidemiologic and pathogenetic implications. *Neurology* 36:932-36

Tobler I, Gaus SE, Deboer T, Achermann P, Fischer M, Rülicke T, *et al.* 1996. Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* 380:639-42

Tobler I, Deboer T, Fischer M. 1997. Sleep and sleep regulation in normal and prion protein-deficient mice. *J. Neuroscience* 17:1869-79

Towbin H, Staehlin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-54

Tranchant C, Sergeant N, Wattez A, Mohr M, Warter JM, Delacourte A. 1997. Neurofibrillary tangles in Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome with the Ala¹¹⁷ → Val prion gene mutation. *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 63:240-46

Tremblay P, Meiner Z, Galou M, Heinrich C, Petromilli C, *et al.* 1998. Doxycycline control of prion protein transgene expression modulates prion disease in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:12580-85

Tsien RY. 1998. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67:509-44

Vey M, Pilkuhn S, Wille H, Nixon R, DeArmond SJ, Smart EJ, Anderson RG, Taraboulos A, Prusiner SB. 1996. Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14945-49

- Voges D, Zwickl P, Baumeister W. 1999. The 26S Proteasome: A Molecular Machine Designed For Controlled Proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 68:1015-68
- Wadsworth JDF, Hill AF, Joiner S, Jackson GS, Clarke AR, Collinge J. 1999. Strain-specific prion-protein conformation determined by metal ions. *Nat. Cell Biol.* 1:55-59
- Wagner I, Heike A, van Dyke L, Langer T, Neupert W. 1994. Molecular chaperones cooperate with PIM1 protease in the degradation of misfolded proteins in mitochondria. *EMBO J.* 13:5135-45
- Walmsley AR, Zeng F, Hooper NM. 2001. Membrane topology influences N-glycosylation of the prion protein. *EMBO J.* 4:703-12
- Walz R, Amaral OB, Rockenbach IC, Roesler R, Izquierdo I, *et al.* 1999. Increased sensitivity to seizures in mice lacking cellular prion protein. *Epilepsia* 40:1679-82
- Ward CL, Omura S, Kopito RR. 1995. Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* 83:121-27
- Weber T, Tumani H, Holdorff B, Collinge J, Palmer M, Kretzschmar HA, Felgenhauer K. 1993. Transmission of Creutzfeldt-Jakob Disease by handling of dura mater (letter). *Lancet* 341:123-24
- Wegner C, Romer A, Schmalzbauer R, Lorenz H, Windl O, Kretzschmar HA. 2002. Mutant prion protein acquires resistance to protease in mouse neuroblastoma cells. *J. Gen. Virol.* 83:1237-45
- Weissmann C, Büeler H, Fischer M, Aguet M. 1993. Role of the PrP gene in transmissible spongiform encephalopathies. *Intervirology* 35:164-75
- Welch WJ, Gambetti P. 1998. Chaperoning brain diseases. *Nature* 392:23-24
- Wells GAH, Scott AC, Johnson CT, Gunning RF, Hancock RD, *et al.* 1987. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.* 31:419-20
- Westaway D, Goodman PA, Mirinda CA, McKinley MP, Carlson GA, Prusiner SB. 1987. Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice. *Cell* 51:651-62
- Wickner S, Maurizi MR, Gottesman S. 1999. Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* 286:1888-93
- Wilesmith JW, Wells GA, Cranwell MP, Ryan JB. 1988. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet. Rec.* 123:638-44
- Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, *et al.* 1996. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 347:921-25
- Wille H, Baldwin MA, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB. 1996a. Prion protein amyloid: separation of scrapie infectivity from PrP polymers. In *CIBA Foundation Symposium* No. 199: The Nature and Origins of Amyloid Fibrils, pp. 181-201, Wiley, Chichester, England

Wille H, Zhang GF, Baldwin MA, Cohen FE, Prusiner SB. 1996b. Separation of scrapie prion infectivity from PrP amyloid polymers. *J. Mol. Biol.* 259:608–21

Wille H, Prusiner SB. 1999. Ultrastructural studies on scrapie prion protein crystals obtained from reverse micellar solutions. *Biophys. J.* 76:1048-62

Wille H, Prusiner SB, Cohen FE. 2000. Scrapie Infectivity is Independent of Amyloid Staining Properties of the N-Terminally Truncated Prion Protein. *J. Struct. Biol.* 130:323-38

Williams A, Lucassen PJ, Ritchie D, Bruce M. 1997. PrP deposition, microglial activation, and neuronal apoptosis in murine scrapie. *Exp. Neurol.* 144:433–38

Williams ES, Young S. 1980. Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J. Wildl. Dis.* 16:89-98

Windl O, Dempster M, Estibeiro P, Lathe R. 1995. A candidate marsupial PrP gene reveals two domains conserved in mammalian PrP proteins. *Gene* 159:181–86

Windl O, Dempster M, Estibeiro JP, Lathe R, de Silva R, Esmonde T, Will R, Springbett A, Campbell TA, Sidle KC, Palmer MS, Collinge J. 1996. Genetic basis of Creutzfeldt-Jakob disease in the United Kingdom: a systematic analysis of predisposing mutations and allelic variation in the PRNP gene. *Hum. Genet.* 98:259-64

Windl O, Giese A, Schulz-Schaeffer W, Zerr I, Skworc K, Arendt S, Oberdieck C, Bodemer M, Poser S, Kretzschmar HA. 1999a. Molecular genetics of human prion diseases in Germany. *Hum. Genet.* 105:244-52

Windl O, Lorenz H, Behrens C, Römer A, Kretzschmar HA. 1999b. Construction and characterization of murine neuroblastoma cell clones allowing inducible and high expression of the prion protein. *J. Virol.* 80:15-21

Woodcock DM., Crowther PJ, Doherty J, Jefferson S, DeCruz E, Noyer-Weidner M., Smith SS, Michael MZ, Graham MW. 1989. Quantitative evaluation of Escherichia coli host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucl. Acids Res.* 17:3469-78

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. *J. Mol. Biol.* 289:1163-78

Wyatt JM, Pearson GR, Smerdon TN, Gruffydd-Jones TJ, Wels GAH, Wilesmith JW. 1991. Naturally occurring scrapie-like spongiform encephalopathy in five domestic cats. *Vet. Rec.* 129:233-36

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.* 19:5383-91

Yost CS, Lopez CD, Prusiner SB, Myers RM, Lingappa VR. 1990. Non-hydrophobic extracytoplasmic determinant of stop transfer in the prion protein. *Nature* 343:669-72

Zaccolo M, De Giorgi F, Cho CY, Feng L, Knapp T, Negulescu PA, Taylor SS, Tsien RY, Pozzan T. 2000. A genetically encoded, fluorescent indicator for cyclic AMP in living cells. *Nat. Cell Biol.* 2:25-29

Zahn R, Liu A, Luhrs T, Riek R, von Schroetter C, Lopez Garcia F, Billeter M, Calzolari L, Wider G, Wuthrich K. 2000. NMR solution structure of the human prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:145-50

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.* 274:23396-404

Zentek J, Oberthür RC, Kamphues J, Kreienbrock L, Flachowsky G, Coenen M. 2002. Futtermittel tierischer Herkunft als mögliche Verbreitungsursache für die BSE in Deutschland. *Dt. Tierärztl. Wschr.* 109:43-51

Zigas V. 1957. Kuru: Clinical study of a new syndrom resembling Paralysis Agitans in natives of the Eastern Highlands of Australian New Guinea. *Med. J. Aust.* 2:245-54

Zulianello L, Kaneko K, Scott M, Erpel S, Han D, Cohen FE, Prusiner SB. 2000. Dominant-Negative Inhibition of Prion Formation Diminished by Deletion Mutagenesis of the Prion Protein. *J. Virol.* 74:4351-60

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. H. A. Kretzschmar danke ich für die Überlassung des Themas sowie die in jeder Hinsicht gewährte Unterstützung.

Herr Prof. Dr. H. MacWilliams hat auf sehr interessierte und entgegenkommende Art die Betreuung meiner Arbeit nach dem Umzug von Göttingen nach München übernommen, wofür ich ihm ganz herzlich danken möchte.

Herrn Dr. Otto Windl danke ich für seine ständige Bereitschaft zum wissenschaftlichen Gespräch, wodurch er mir viele wertvolle Anregungen geliefert und sehr beim Überwinden der unvermeidlichen „Durststrecken“ geholfen hat.

Mein Dank gilt auch allen jetzigen sowie ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, insbesondere Dr. Cornelia Dorner-Ciossek, Stefanie Arendt, Peter Schürmann und Stephanie Walther, für die gute Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank gilt meiner Frau Siegrun, welche durch viel Unterstützung, Verständnis und Rücksicht sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Lebenslauf

Name: Rüdiger Xaver Schmalzbauer
 Geburtsdatum: 19. Januar 1971
 Geburtsort: Rastatt
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: verheiratet

Beruflicher Werdegang

1977 – 1981 Grundschole Hebel-Schole, Gaggenau
 1981 – 1987 Goethe-Gymnasium, Gaggenau
 1987 – 1988 North Branch High School, Minnesota, USA
 1988 – 1991 Goethe-Gymnasium, Gaggenau
 Juni 1991 Abitur
 1991 – 1993 Zivildienst
 1993 – 1995 Grundstudium der Biologie (Diplom) an der Universität
 Kaiserslautern
 Juni 1995 Vordiplom
 1995 – 1997 Hauptstudium der Biologie an der Universität
 Kaiserslautern
 November 1997 Diplomprüfung
 1997 – 1998 Diplomarbeit am Deutschen Krebsforschungszentrum
 (DKFZ), Heidelberg
 Dez. 1998 – Mai 2000 Beginn der Doktorarbeit am Institut für Neuropathologie
 der Georg-August-Universität Göttingen
 Juni 2000 Umzug des Institutes an die Ludwig-Maximilians-
 Universität München
 Nov. 2000 – Nov. 2002 Fortführung der Doktorarbeit am Institut für
 Neuropathologie der Ludwig-Maximilians-Universität
 München