

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

**Funktionelle Analyse des Prion Proteins:**

- Bedeutung der C-terminalen Domäne des Prion Proteins für den Import in das Endoplasmatische Retikulum
- Untersuchung der Faltung des Prion Proteins *In Vivo*

Johanna Heske

aus

Ingolstadt

2003

---

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, in der Arbeitsgruppe von PD Dr. J. Tatzelt durchgeführt und vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie von Prof. Dr. M. Biel vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, 27.11.2003

Johanna Heske

Dissertation eingereicht am 27.11.2003

1. Gutachter: PD Dr. J. Tatzelt
2. Gutachter: Prof. Dr. M. Biel

Mündliche Prüfung am 9.2.2004

---

|   |           |
|---|-----------|
| <b><u>1. EINLEITUNG</u></b>   | <b>9</b>  |
| <b><u>1.1. Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE)</u></b>                                 | <b>9</b>  |
| <u>1.1.1. Historische Entwicklung von Prionerkrankungen</u>   | 10        |
| <u>1.1.2. Spongiforme Enzephalopathien beim Tier</u>  | 11        |
| <u>1.1.3. Spongiforme Enzephalopathien beim Menschen</u>  | 13        |
| <u>1.1.4. Transmissionsexperimente</u>  | 16        |
| <b><u>1.2. Das Prion Protein (PrP)</u></b>  | <b>19</b> |
| <u>1.2.1. Entdeckung</u>  | 19        |
| <u>1.2.2. Eigenschaften von PrP<sup>SC</sup></u>  | 20        |
| <u>1.2.3. Biogenese von PrP<sup>C</sup></u>   | 21        |
| <u>1.2.4. Struktur von PrP</u>  | 23        |
| <u>1.2.5. Das Prion-Konzept</u>   | 24        |
| <u>1.2.6. Neurodegeneration in Abwesenheit von PrP<sup>SC</sup>, C<sup>tm</sup>PrP und zyto-PrP</u> | 25        |
| <u>1.2.7. Funktion von PrP<sup>C</sup></u>  | 27        |
| <u>1.2.8. Zellkulturmodell</u>  | 28        |
| <b><u>1.3. Zellbiologische Grundlagen</u></b>   | <b>30</b> |
| <u>1.3.1. Proteinsynthese am ER</u>   | 30        |
| <u>1.3.2. Prozessierung der Proteine im ER und Golgi-Apparat</u>                                    | 33        |
| <u>1.3.3. Faltungskontrolle im ER</u>   | 36        |
| <b><u>1.4. Zielsetzung</u></b>  | <b>38</b> |
| <b><u>2. MATERIAL</u></b>   | <b>39</b> |
| <b><u>2.1. Biologisches Material</u></b>  | <b>39</b> |
| <u>2.1.1. Zelllinien</u>  | 39        |
| <u>2.1.2. Bakterienstämme</u>   | 39        |
| <u>2.1.3. Antikörper</u>  | 39        |

---

|  |           |
|--|-----------|
| <a href="#">2.1.4. Enzyme und Proteine</a>                                 | 40        |
| <a href="#">2.1.5. Standardgrößenmarker für Proteine und Nukleinsäuren</a> | 40        |
| <a href="#">2.1.6. Vektoren und Plasmide</a>                               | 41        |
| <a href="#">2.1.7. Synthetische Oligonukleotide</a>                        | 41        |
| <b><a href="#">2.2. Chemikalien</a></b>                                    | <b>42</b> |
| <b><a href="#">2.3. Lösungen und Puffer</a></b>                            | <b>44</b> |
| <b><a href="#">2.4. Kits</a></b>   | <b>48</b> |
| <b><a href="#">2.5. Medien</a></b>   | <b>48</b> |
| <b><a href="#">2.6. Sonstige Materialien</a></b>                           | <b>49</b> |
| <b><a href="#">2.7. Geräte</a></b>   | <b>50</b> |
| <b><a href="#">3. METHODEN</a></b>   | <b>52</b> |
| <b><a href="#">3.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</a></b>                | <b>52</b> |
| <a href="#">3.1.1. Rekombinante PCR</a>                                    | 52        |
| <a href="#">3.1.2. PCR-Bedingungen</a>                                     | 53        |
| <a href="#">3.1.3. Sequenzierungen</a>                                     | 53        |
| <a href="#">3.1.4. Klonierung von verschiedenen PrP-Konstrukten</a>        | 53        |
| <b><a href="#">3.2. Bakterienkultur</a></b>                                | <b>58</b> |
| <a href="#">3.2.1. Herstellung kompetenter Bakterien</a>                   | 58        |
| <a href="#">3.2.2. Transformation kompetenter Bakterien</a>                | 59        |
| <b><a href="#">3.3. DNA-Präparation</a></b>                                | <b>59</b> |
| <b><a href="#">3.4. Zellkultur</a></b>                                     | <b>60</b> |
| <a href="#">3.4.1. Kultivierung von Zellen</a>                             | 60        |
| <a href="#">3.4.2. Passagierung</a>  | 60        |

---

|                             |  |           |
|-----------------------------|--|-----------|
| <a href="#">3.4.3.</a>      | <a href="#">Ausplattieren</a>  | 61        |
| <a href="#">3.4.4.</a>      | <a href="#">Transfektion</a>   | 61        |
| <a href="#">3.4.5.</a>      | <a href="#">Ernte</a>  | 61        |
| <b><a href="#">3.5.</a></b> | <b><a href="#">Proteinpräparation und –analyse</a></b>                   | <b>62</b> |
| <a href="#">3.5.1.</a>      | <a href="#">SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</a>           | 62        |
| <a href="#">3.5.2.</a>      | <a href="#">Proteintransfer auf Nitrocellulose (<i>Western Blot</i>)</a> | 62        |
| <a href="#">3.5.3.</a>      | <a href="#">Immundetektion von Proteinen</a>                             | 62        |
| <a href="#">3.5.4.</a>      | <a href="#">Nachweis der Löslichkeit</a>                                 | 63        |
| <a href="#">3.5.5.</a>      | <a href="#">Nachweis der Protease-Resistenz</a>                          | 63        |
| <a href="#">3.5.6.</a>      | <a href="#">Nachweis der Glykosylierung</a>                              | 63        |
| <a href="#">3.5.7.</a>      | <a href="#">Nachweis von Oberflächenproteinen</a>                        | 64        |
| <a href="#">3.5.8.</a>      | <a href="#">Untersuchung der Membranverankerung</a>                      | 64        |
| <a href="#">3.5.9.</a>      | <a href="#">Nachweis der Sekretion</a>                                   | 65        |
| <a href="#">3.5.10.</a>     | <a href="#">TCA-Fällung</a>  | 65        |
| <a href="#">3.5.11.</a>     | <a href="#">Nachweis der Wiederaufnahme von sekretierten Proteinen</a>   | 65        |
| <a href="#">3.5.12.</a>     | <a href="#">Indirekte Immunfluoreszenz</a>                               | 66        |
| <a href="#">3.5.13.</a>     | <a href="#">Nachweis der intrazellulären Lokalisierung</a>               | 66        |
| <a href="#">3.5.14.</a>     | <a href="#">Expression und Charakterisierung von rekombinantem PrP</a>   | 67        |
| <a href="#">3.5.15.</a>     | <a href="#">Radioaktive Markierung</a>                                   | 68        |
| <a href="#">3.5.16.</a>     | <a href="#">Immunpräzipitation (IP)</a>                                  | 68        |
| <a href="#">3.5.17.</a>     | <a href="#">Behandlung mit proteasomalen Inhibitor</a>                   | 69        |
| <a href="#">3.5.18.</a>     | <a href="#">Autoradiodiagramme</a>                                       | 69        |
| <a href="#">3.5.19.</a>     | <a href="#">Phosphoimaging</a>   | 69        |
| <a href="#">3.5.20.</a>     | <a href="#">Quantifizierung der Immunpräzipitationsexperimente</a>       | 69        |
| <a href="#">3.5.21.</a>     | <a href="#">In <i>Vitro</i> Translation und PK-Verdau</a>                | 70        |
| <a href="#">3.5.22.</a>     | <a href="#">RNA-Nachweis (<i>Northern Blot</i>)</a>                      | 70        |

---

|   |           |
|---|-----------|
| <b>4. <u>ERGEBNISSE</u></b>   | <b>71</b> |
| <b>4.1. <u>Bedeutung der C-terminalen Domäne des Prion Proteins für den Import in das Endoplasmatische Retikulum</u></b>                  | <b>71</b> |
| 4.1.1. <u>C-terminale Verkürzungen beeinflussen die N-terminale Prozessierung von PrP</u>   | 72        |
| 4.1.2. <u>Der C-Terminus beeinflusst die Prozessierung und somit die Effizienz des proteasomalen Abbaus</u>                               | 75        |
| 4.1.3. <u>In Vitro Import der PrP Mutanten</u>  | 78        |
| 4.1.4. <u>Intrazelluläre Lokalisierung der PrP Konstrukte</u>   | 80        |
| 4.1.5. <u>Die C-terminale globuläre Domäne ist für den ER-Import ausreichend</u>  | 82        |
| 4.1.6. <u>Zusammenfassung</u>   | 86        |
| <b>4.2. <u>Untersuchung der Faltung des Prion Proteins In Vivo</u></b>  | <b>87</b> |
| 4.2.1. <u>Helix 1 ist für die komplexe Glykosylierung des PrP verantwortlich</u>  | 87        |
| 4.2.2. <u>Die Umwandlung von High Mannose Glykanen in komplexe Strukturen wird von Helix 1 beeinflusst</u>                                | 90        |
| 4.2.3. <u>Die Deletion von Helix 1 verhindert die Übertragung eines GPI-Ankers</u>  | 91        |
| 4.2.4. <u>Lokalisierung von verschiedenen PrP Konstrukten in intakten Zellen</u>  | 96        |
| 4.2.5. <u>Für die Faltung und Reifung von PrP<sup>C</sup> ist eine hydrophobe Aminosäure in Helix 3 nötig</u>                             | 99        |
| 4.2.6. <u>Die Glykosylierung von PrP wird von der C-terminalen Signalsequenz, der Faltung von PrP und der Membranverankerung bestimmt</u> | 102       |
| 4.2.7. <u>Die drei endständigen Glukoseeinheiten werden initial getrimmt</u>  | 107       |
| 4.2.8. <u>Missgefaltetes PrP aktiviert die Unfolded Protein Response nicht</u>  | 108       |
| 4.2.9. <u>Sekretiertes PrP kann von Zellen wiederaufgenommen werden</u>   | 109       |
| 4.2.10. <u>Zusammenfassung</u>  | 111       |

---

|   |            |
|---|------------|
| <b><u>5. DISKUSSION</u></b>   | <b>112</b> |
| <b><u>5.1. Import in das Endoplasmatische Retikulum</u></b>   | <b>112</b> |
| <u>5.1.1. Information im C-terminalen Teil des PrP ist für den Import in das ER notwendig</u>             | 114        |
| <u>5.1.2. Degradierung von PrP durch das Proteasom</u>  | 116        |
| <b><u>5.2. Faltung im Endoplasmatischen Retikulum</u></b>   | <b>117</b> |
| <u>5.2.1. Die Core Glykosylierung von PrP<sup>C</sup> ist von der C-terminalen Signalsequenz abhängig</u> | 118        |
| <u>5.2.2. Die Faltung von PrP beeinflusst das Anheften eines GPI-Ankers</u>                               | 119        |
| <u>5.2.3. Eine Membranverankerung ist für die Umwandlung in komplexe Glykane notwendig</u>                | 119        |
| <b><u>5.3. Implikationen für Prionerkrankungen</u></b>  | <b>120</b> |
| <b><u>6. ZUSAMMENFASSUNG</u></b>  | <b>123</b> |
| <b><u>7. LITERATUR</u></b>  | <b>124</b> |
| <b><u>8. VERÖFFENTLICHUNGEN</u></b>   | <b>141</b> |
| <b><u>9. DANKSAGUNG</u></b>   | <b>142</b> |
| <b><u>10. LEBENSLAUF</u></b>  | <b>144</b> |

---

## Abkürzungen

|                |   |
|----------------|---|
| Abb.           | Abbildung   |
| APS            | Ammoniumperoxodisulfat                                  |
| AS             | Aminosäure  |
| ATP            | Adenosintriphosphat                                     |
| BiP            | bindendes Protein ( <i>binding protein</i> )            |
| bp             | Basenpaare  |
| BSA            | Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )      |
| BSE            | Bovine Spongiforme Enzephalopathie                      |
| Ci             | Curie   |
| CJK            | Creutzfeldt-Jakob-Krankheit                             |
| CSP            | Castanospermin  |
| CWD            | <i>Chronic Wasting Disease</i>                          |
| dATP           | Deoxyadenosintriphosphat                                |
| dCTP           | Deoxycytosintriphosphat                                 |
| dGTP           | Deoxyguanosintriphosphat                                |
| dNTP           | Deoxynukleotidtriphosphat                               |
| DMEM           | <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>               |
| DMJ            | 1-Desoxymannojirimycin                                  |
| DMSO           | Dimethylsulfoxid  |
| DNA            | Desoxyribonukleinsäure                                  |
| DOC            | Desoxycholat  |
| DTT            | Dithiothreitol  |
| ECL            | <i>Enhanced Chemiluminescence</i>                       |
| <i>E. Coli</i> | <i>Escherichia Coli</i>                                 |
| EDTA           | Ethylendiamintetraessigsäure                            |
| EndoH          | Endo- $\beta$ -N-Acetylglucosamidase, Endoglykosidase H |
| ER             | Endoplasmatisches Retikulum                             |
| ERAD           | ER-assoziierte Degradierung                             |

---

|                 |  |
|-----------------|--|
| FCS             | Fötale Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )   |
| FFI             | Fatale Familiäre Insomnie  |
| FSE             | Feline Spongiforme Enzephalopathie   |
| Glc             | Glukose  |
| GNA             | N-Acetylglucosamin   |
| GPI             | Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol   |
| Grp             | Glukose reguliertes Protein  |
| GSS             | Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom   |
| HEPES           | N-(2-Hydroxyethyl)Piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure)  |
| HRP             | Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )                                   |
| Hsp             | Hitzeschockprotein   |
| IF              | Immunfluoreszenz   |
| kb              | Kilobasenpaare   |
| kDa             | 10 <sup>3</sup> Dalton, Molekulargewicht von Proteinen                                     |
| Man             | Mannose  |
| MEM             | <i>Minimum Essential Medium</i>  |
| Min.            | Minuten  |
| MG132           | Carboxybenzoyl-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucinal  |
| MOPS            | 3-Morpholinopropansulfonsäure  |
| NMR             | Kernresonanzspektroskopie  |
| OD <sub>x</sub> | optische Dichte bei $\lambda = x$ nm   |
| PAGE            | Polyacrylamid-Gelelektrophorese  |
| PBS             | Phosphat gepufferte physiologische Kochsalzlösung<br>( <i>phosphate buffered saline</i> )  |
| PCR             | Polymerase Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )                             |
| PEG             | Polyethylenglykol  |
| pH              | negativer dekadischer Logarithmus<br>der H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> -Ionenkonzentration |
| PK              | Proteinase K   |

---

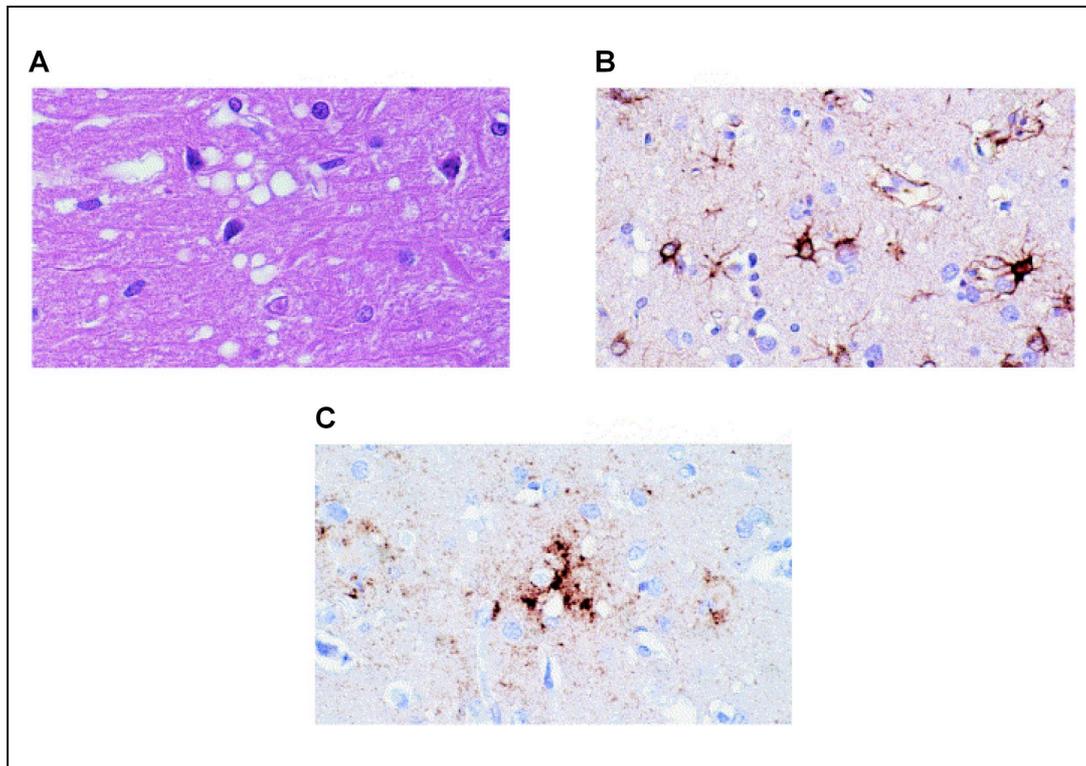
|                   |   |
|-------------------|---|
| PMSF              | Phenylmethylylsulfonylfluorid                                   |
| PrP               | Prion Protein   |
| PrP <sup>C</sup>  | zelluläres PrP  |
| PrP <sup>SC</sup> | Scrapie-Form des PrP  |
| RNA               | Ribonukleinsäure  |
| rpm               | Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )             |
| RT                | Raumtemperatur  |
| SAP               | Alkalische Phosphatase ( <i>shrimp alkaline phosphatase</i> )   |
| Sarkosyl          | N-Lauroylsarkosin   |
| SDS               | Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecylsulfate</i> )           |
| SOD               | Superoxiddismutase  |
| SRP               | Signalerkennungspartikel ( <i>signal recognition particle</i> ) |
| Tab.              | Tabelle   |
| TAE               | Tris-Acetat-EDTA  |
| TCA               | Trichloressigsäure  |
| TEMED             | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin                              |
| TE                | Tris-EDTA   |
| TM                | Transmembrandomäne  |
| TME               | Transmissible Nerz ( <i>Mink</i> ) Enzephalopathie              |
| TRAM              | <i>translocation chain associating membrane</i>                 |
| Tris              | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan                                |
| Triton X-100      | t-Octyl-Phenoxy-Polyethoxyethanol                               |
| TSE               | Transmissible Spongiforme Enzephalopathie                       |
| Tween 20          | Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat                              |
| UPR               | <i>Unfolded Protein Response</i>                                |
| wt                | Wildtyp   |

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

## 1. Einleitung

### 1.1. Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE)

Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE) sind tödlich verlaufende, neurodegenerative Erkrankungen und treten sowohl beim Tier als auch beim Menschen auf (Prusiner *et al.* 1998; Belay 1999; Collinge 2001; Collins *et al.* 2001). Allen TSE gemeinsam sind charakteristische Läsionen mit ausgedehnten Protein-Ablagerungen im Gehirn der erkrankten Individuen; durch die neuronale Vakuolisierung, die Hypertrophie der Astroglia und die Ablagerung von Plaques nimmt das Gehirn die Gestalt eines Schwammes an.



**Abbildung 1.** Charakteristische neuropathologische Merkmale von transmissiblen spongiformen Enzephalopathien in Hirnschnitten von einem CJK (Creutzfeldt-Jakob-Krankheit)-Patient. (A) Spongiforme, vakuolen-ähnliche Morphologie; (B) Proliferation der Astroglia; (C) Prion Protein Ablagerungen; alle Darstellungen aus (Glatzel und Aguzzi 2001).

TSE treten meist spontan auf, können aber auch durch Mutationen bedingt vererbt werden. Desweiteren können TSE durch Infektion übertragen werden, was sie von anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. der Alzheimerschen Krankheit oder Chorea Huntington unterscheidet.

### **1.1.1. Historische Entwicklung von Prionerkrankungen**

Im Jahre 1732 wurde zum ersten Mal in Großbritannien von der Traberkrankheit bei Schafen (Scrapie) berichtet (nach:(Mc Gowan 1922)). Auf Grund eines intensiven Juckreizes kratzten sich die Schafe ihre Wolle ab (engl.: *to scrape* - kratzen). Die ersten Berichte von einer TSE-Erkrankung beim Menschen erschienen in den Jahren 1920/1921. Hans Creutzfeldt und Alfons Jakob beschrieben unabhängig voneinander Patienten mit einem seltenem Syndrom, der *Spastischen Pseudosklerose* (Creutzfeldt 1920; Jakob 1921). Später wurde die Krankheit nach ihren Entdeckern benannt: Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK). Einige Jahrzehnte später wurde von Gajdusek und Zigas (Zigas und Gajdusek 1957) eine übertragbare Krankheit mit dem Namen Kuru beschrieben. Im Jahre 1959 konnten neuropathologische Ähnlichkeiten sowohl zwischen Kuru und Scrapie als auch zwischen CJK und Kuru beobachtet werden (Klatzo *et al.* 1959).

Der Auslöser der Erkrankung war zu diesem Zeitpunkt jedoch noch nicht erforscht.

Im Jahre 1985 trat der erste Fall einer neuen TSE-Erkrankung in Großbritannien bei Rindern auf (Wells *et al.* 1987). Seit diesem Zeitpunkt erkrankten mehr als 200.000 Rinder in Großbritannien und einige Tausend in anderen europäischen Ländern und in Japan an BSE (Bovine Spongiforme Enzephalopathie) (Brown *et al.* 2001). Kurz darauf wurden auch bei Zootieren und bei Katzen Spongiforme Enzephalopathien festgestellt (Schreuder 1994). 1993 hat die britische BSE-Epidemie ihren Höhepunkt überschritten; die Wirksamkeit des Tiermehl-Verfütterungsverbots wurde sichtbar. Im Jahre 1996 wurde bekannt, dass zehn Personen an einer neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (nvCJK) erkrankt waren (Will *et al.* 1996). Seit diesem Zeitpunkt stieg die Zahl der nvCJK-Erkrankungen stetig an und im Jahre 2002 waren bereits 141 Fälle bekannt.

| <b>Mensch</b> | <b>Jahr der Erstbeschreibung und Ort des Auftretens</b> | <b>Tier</b> | <b>Jahr der Erstbeschreibung und Ort des Auftretens</b> |
|---------------|---|-------------|---|
| sCJK          | 1920<br>Deutschland                                     | Scrapie     | 1732<br>Großbritannien                                  |
| fCJK          | 1924<br>Deutschland                                     | TME         | 1947<br>USA   |
| GSS           | 1928/1936<br>Österreich                                 | CWD         | 1980<br>USA   |
| Kuru          | 1957<br>Neu Guinea                                      | BSE         | 1986<br>Großbritannien                                  |
| iCJK          | 1974<br>USA   | EUE         | 1986<br>Großbritannien                                  |
| FFI           | 1986<br>Italien   | FSE         | 1990<br>Großbritannien                                  |
| nvCJK         | 1996<br>Großbritannien                                  |             |   |

**Tabelle 1.** Überblick aller Formen der Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathie (TSE) und deren ersten Auftreten.

sCJK, fCJK, iCJK, nvCJK: sporadische, familiäre, iatrogene, neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit; GSS: Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom; FFI: Fatale Familiäre Insomnie; TME: Transmissible Mink (Nerz) Enzephalopathie; CWD: *Chronic Wasting Disease*; BSE: Bovine Spongiforme Enzephalopathie; EUE: exotische Huftier-Enzephalopathie; FSE: Feline Spongiforme Enzephalopathie.

### 1.1.2. Spongiforme Enzephalopathien beim Tier

Die folgenden TSE-Erkrankungen sind bei Tieren (vgl. Tabelle 2) bekannt: Die Traberkrankheit (Scrapie) bei Schafen und Ziegen, die **Bovine Spongiforme Enzephalopathie** (BSE) bei Rindern, die **Feline Spongiforme Enzephalopathie** (FSE) bei Katzen, die chronisch zehrende Hirschkrankheit (*Chronic Wasting Disease*, CWD) bei Hirschen, die transmissible Nerz-Enzephalopathie (*Transmissible Mink*

*Encephalopathy*, TME) und die exotische Huftier-Enzephalopathie (*Exotic Ungulate Encephalopathy*, EUE) (Leopoldt 1759; Hartsough und Burger 1965; Williams und Young 1980; Wells *et al.* 1987; Pearson *et al.* 1991).

| Krankheit | Betroffene Tierart | Ursache   |
|-----------|--------------------|-----------|
| Scrapie   | Schaf              | unbekannt |
| CWD       | Elch, Hirsch       |           |
| BSE       | Rind               | Infektion |
| TME       | Nerz               |           |
| FSE       | Katze              |           |
| EUE       | Zootiere           |           |

**Tabelle 2.** Übersicht über die Spongiformen Enzephalopathien der Tiere. CWD: *Chronic Wasting Disease*; BSE: Bovine Spongiforme Enzephalopathie; TME: Transmissible Mink (Nerz) Enzephalopathie; FSE: Feline Spongiforme Enzephalopathie; EUE: exotische Huftier-Enzephalopathie.

Scrapie kann als die Musterkrankheit aller TSE-Erkrankungen bezeichnet werden. Sie stellt die häufigste natürliche TSE dar und trat bereits im Jahre 1732 in Großbritannien auf. In Deutschland wurde sie zum ersten Mal im Jahre 1759 von Leopoldt beschrieben (Leopoldt 1759). Zum einen wurde Scrapie als eine Infektionskrankheit betrachtet (Dickinson *et al.* 1965), und zum anderen wurde eine genetische Veranlagung angenommen (Parry 1962). Jedoch erkrankten auch viele Tiere durch die Verabreichung eines infektiösen Impfstoffes (Gordon 1946). Die Krankheit ist nahezu weltweit verbreitet, von Land zu Land bestehen jedoch große Unterschiede in Bezug auf die Häufigkeit (Hörnlimann *et al.* 1995). Den an Scrapie erkrankten Schafen kommt eine Schlüsselstellung bei der Genese der Bovinen Spongiformen Enzephalopathie (BSE) zu.

Seit dem Auftreten der ersten BSE-Fälle in Großbritannien im Jahre 1986 ist die Bovine Spongiforme Enzephalopathie von besonderer Bedeutung. Sie ist bis jetzt die einzige epidemisch auftretende TSE-Erkrankung bei Tieren. Grund für dieses epidemische Auftreten ist sehr wahrscheinlich die Verfütterung von Tiermehl, das aus

Schafen hergestellt wurde, von denen einige mit Scrapie infiziert waren. Das Verfahren zur Herstellung dieses Tiermehls wurde Ende der siebziger Jahre umgestellt; bis dahin hatte man durch bestimmte Herstellungsverfahren den Erreger unwissentlich unschädlich gemacht.

Die Transmissible Mink Enzephalopathie (TME) und die Feline Spongiforme Enzephalopathie (FSE) sind ebenfalls infektiösen Ursprungs (Hanson *et al.* 1971; Pearson *et al.* 1991).

Seit den achtziger Jahren wird aus Colorado und Wyoming (USA) von einigen Scrapie-ähnlichen Krankheiten bei Tieren aus der Familie *Cervidae* berichtet, die man *Chronic Wasting Disease* (CWD) nennt (Williams und Young 1993). Betroffen sind der Maultierhirsch (*Odocoileus hemionus*), der Weißwedelhirsch (*Odocoileus virginianus*) und der Rocky-Mountain-Rothirsch (*Cervus elaphus nelsoni*) (Salman 2003).

Scrapie bei Schafen macht sich vor allem durch Verhaltens- und Bewegungsstörungen bemerkbar. Dies gilt auch für BSE bei Rindern, die besonders durch Übererregbarkeit und Gangstörungen auffallen. Die Inkubationszeit beträgt bei Schafen ein bis zwei, bei Rindern ca. vier bis fünf Jahre. Der Tod der Tiere tritt sechs bis zwölf Monate nach Ausbruch der Krankheit ein.

### **1.1.3. Spongiforme Enzephalopathien beim Menschen**

Zu den TSE beim Menschen (vgl. Tabelle 3) zählen die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK), das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS), die Kuru-Krankheit und die Fatale Familiäre Insomnie (FFI) (Creutzfeldt 1920; Jakob 1921; Gerstmann *et al.* 1936; Gajdusek und Zigas 1957; Lugaresi *et al.* 1986).

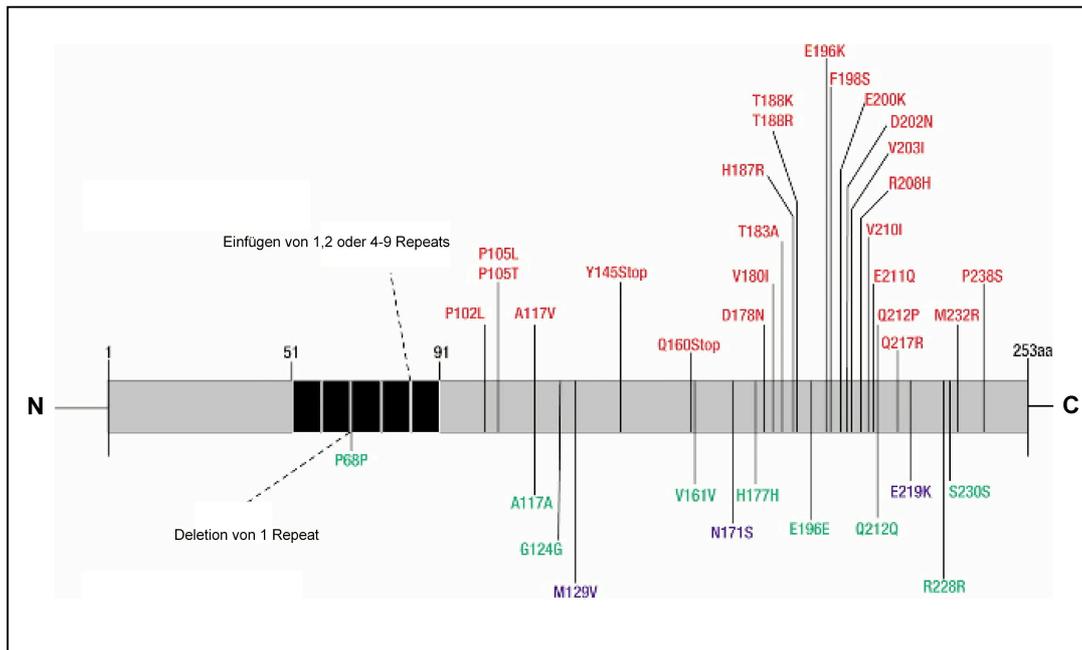
| Krankheit | Ursache                                      |
|-----------|--|
| FFI       | Keimbahn-Mutation im PrP-Gen                 |
| GSS       |  |
| fCJK      |  |
| sCJK      | Somatische Mutation oder spontane Erkrankung |
| iCJK      | Infektion durch ärztliche Behandlung         |
| nvCJK     | Infektion                                    |
| Kuru      | Ritueller Kannibalismus                      |

**Tabelle 3.** Spongiforme Enzephalopathien des Menschen.  
 FFI: Fatale Familiäre Insomnie; GSS: Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom; fCJK: familiäre CJK; sCJK: sporadische CJK; iCJK: iatrogene CJK; nvCJK: neue Variante der CJK.

Die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK) stellt die wichtigste TSE-Erkrankung beim Menschen dar. Sie ist sehr selten und kommt in der Bevölkerung mit einer Häufigkeit von eins zu einer Million vor. Von der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit sind vier Formen oder Varianten bekannt:

- Sporadische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (sCJK)
- Familiäre Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (fCJK)
- Iatrogene Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (iCJK)
- Neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (nvCJK)

Die Sporadische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (sCJK) ist die häufigste Form der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit; ca. 90% der CJK-Fälle werden spontan hervorgerufen. Rund 10% der CJK-Fälle werden durch Mutationen hervorgerufen und autosomal dominant vererbt (familiäre Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (fCJK)). Auch bei dem Gestmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) und der Fatalen Familiären Insomnie (FFI) ist eine Mutation im PrP-Gen der Auslöser.



**Abbildung 2.** Schematische Darstellung der pathogenen Mutationen (rot) und der polymorphen Varianten (grün und blau) des Prion Proteins. Abbildung aus (Collinge 2001).

Wie aus der Abbildung 2 hervorgeht liegen die Mutationen des Prion Proteins vor allem im strukturierten C-Terminus (Hsiao *et al.* 1989; Dlouhy *et al.* 1992; Petersen *et al.* 1992; Poulter *et al.* 1992; Gabizon *et al.* 1993). Es kommen sowohl Punkt- und Deletionsmutationen als auch Mutationen mit zusätzlichen Oktarepeats (Wiederholungen von den acht Aminosäuren PQGGTWGQ) vor.

Weniger als 1% der CJK-Fälle wurden durch medizinische Eingriffe unbeabsichtigt auf den Menschen übertragen (Iatrogene Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (iCJK)). Hervorgerufen wurden die Infektionen durch kontaminierte chirurgische Instrumente, durch Transplantation infizierten Gewebes und durch Injektion des Wachstumshormons Somatotropin, das aus Hypophysen von Leichen, unter denen sich ein unentdeckter CJK-Fall befunden hat, gewonnen wurde (Duffy *et al.* 1974; Bernoulli *et al.* 1977; Kondo und Kroina 1981; Will und Matthews 1982; Davanipour *et al.* 1984).

Auch die neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (nvCJK) wird durch Infektion erworben und steht höchstwahrscheinlich im Zusammenhang mit der BSE-Krankheit der Rinder (siehe Kapitel 1.1.4.).

Die Kuru-Krankheit tritt bei den Fore, einem Volk in Papua-Neuginea auf. Kuru wurde durch einen speziellen Ritus zum Zwecke der Verehrung von Verstorbenen hervorgerufen: dem Verspeisen von bestimmten Organteilen, unter anderem auch dem Hirn (Gajdusek und Zigas 1957). Kuru nahm zeitweise epidemische Ausmaße an; seit 1957 sollen ihr 2.600 Personen zum Opfer gefallen sein (Prusiner 1995). Nachdem der rituelle Kannibalismus 1959 verboten wurde, konnte ein deutlicher Rückgang an Kuru-Erkrankungen festgestellt werden. Heute werden nur noch einige wenige Kuru-Fälle festgestellt, wobei keiner der Patienten nach dem Verbot des Ritus geboren wurde (Gajdusek 1996).

Alle TSE-Erkrankungen beim Menschen zeichnen sich durch eine lange Inkubationszeit aus. Unterschiede bestehen allerdings in der Symptomatik, der Krankheitsdauer und dem pathologischen Bild. Während der Ausbruch der Krankheit bei sCJK erst im Alter von 60 bis 70 Jahren auftritt, wird die nvCJK bei verhältnismäßig jungen Patienten (Durchschnittsalter 29 Jahre) mit untypischem Krankheitsbild diagnostiziert (Chazot *et al.* 1996; Will *et al.* 1996). So konnten ungewöhnliche *Florid-Plaques* (lat.: *floridus* – blühend) (Plaques umgeben von einem Ring von spongiformen Veränderungen) in dem Gehirn von nvCJK-Patienten festgestellt werden (Will *et al.* 1996). Der Krankheitsverlauf von nvCJK ist im Vergleich zu sCJK länger (Zeidler *et al.* 1997a; Zeidler *et al.* 1997b).

Bei den verschiedenen Krankheiten sind unterschiedliche Regionen des Gehirns betroffen. Die Symptome sind anfangs Seh-, Sprach- und Bewegungsstörungen; im weiteren Verlauf der Krankheit sind starke Persönlichkeitsveränderungen und Gedächtnisstörungen festzustellen. Der totale Ausfall des Großhirns führt schließlich zum Tod der Patienten.

#### **1.1.4. Transmissionsexperimente**

Eine Analogie der verschiedenen TSE von Mensch und Tier wurde postuliert, nachdem Gemeinsamkeiten zwischen Scrapie, Kuru und der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit erkannt wurden (Hadlow 1959; Klatzo *et al.* 1959). Um die Übertragbarkeit

verschiedener TSE-Formen zwischen den Spezies zu untersuchen, wurden bereits in den siebziger Jahren erste Transmissionsexperimente durchgeführt: im Jahre 1961 konnte Scrapie auf Mäuse, im Jahre 1966 Kuru auf Schimpansen und im Jahre 1968 CJK auf Schimpansen übertragen werden (Chandler 1961; Gajdusek *et al.* 1966; Gibbs *et al.* 1968). Diese Ergebnisse konnten zum ersten Mal die Übertragbarkeit der Krankheit nachweisen und der Begriff „Transmissible Spongiforme Enzephalopathie“ (lat. *transmittere* - übertragen) wurde eingeführt.

Die Übertragung der Krankheit ist jedoch nicht immer möglich. So konnte zum Beispiel noch nie gezeigt werden, dass Scrapie auf den Menschen übertragbar ist. Tiere dagegen, wie zum Beispiel der Nerz, sind gegenüber Scrapie hoch sensitiv (Barlow und Rennie 1970; Hanson *et al.* 1971). Dies zeigt, dass die Übertragung zwischen verschiedenen Spezies nicht immer möglich ist. Dieses Phänomen wird Speziesbarriere genannt (Pattison 1965).

Das wichtigste Beispiel für die Überwindung der Speziesbarriere stellt die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) dar. Man geht davon aus, dass die nvCJK durch den Konsum infizierter Rinderbestandteile hervorgerufen wird. So konnte das Auftreten von nvCJK in einem gewissen zeitlichen Abstand zu BSE sowie eine regionale Beschränkung auf das besonders von BSE betroffene Großbritannien festgestellt werden. Um den Zusammenhang zwischen der Krankheit und der Nahrungsaufnahme von infiziertem Material zu untersuchen, wurden verschiedene Experimente durchgeführt. So konnte gezeigt werden, dass BSE-Material durch orale Infektion auf Schafe (Bradley und Wilesmith 1993), Ziegen (Bradley und Wilesmith 1993) und Mäuse (Barlow und Middleton 1990), nicht jedoch auf Hühner und Schweine (Bradley und Wilesmith 1993) übertragen werden kann. Interessanterweise konnten auch Kühe mit Scrapie-Material aus Schafen infiziert werden (Cutlip *et al.* 1994), was die Vermutung nahe legt, dass die BSE-Epidemie wirklich durch den Scrapie-Erreger hervorgerufen wurde. Um darüber hinaus die Übertragung von BSE auf den Menschen zu verifizieren, wurden weitere Experimente durchgeführt :

- Es konnte gezeigt werden, dass Makaken-Hirne, die mit BSE infiziert wurden, die gleichen charakteristischen *Florid-Plaques* aufweisen wie sie auch in nvCJK Patienten gefunden wurden (Lasmezas *et al.* 1996).
- PrP<sup>SC</sup> (Scrapie-Form des PrP) aus dem Hirn von Mäusen, Katzen und Makaken, welche mit PrP<sup>BSE</sup> (BSE-Form des PrP) infiziert wurden, zeigen das

gleiche Glykosylierungsmuster wie das PrP<sup>SC</sup> aus dem Gehirn von nvCJK-Patienten (Collinge *et al.* 1996).

- Transgene Mäuse, welche nur humanes PrP exprimieren, konnten mit BSE-Material infiziert werden (Hill *et al.* 1997).
- Wildtyp-PrP exprimierende Mäuse wurden mit BSE-Material und mit nvCJK-Material infiziert. Beide zeigen dieselben Läsionen und identische Inkubationszeiten (Bruce *et al.* 1997).
- In einem *Cell free Conversion Assay* (zellfreiem Konversionsversuch) konnte humanes PrP<sup>C</sup> (zelluläre Form des PrP) in die Isoform PrP<sup>SC</sup> umgewandelt werden, wenn PrP<sup>BSE</sup> als Startermolekül diente (Raymond *et al.* 1997).
- Rinder-PrP exprimierende transgene Mäuse wurden mit BSE- und mit nvCJK-Material infiziert. Beide weisen dieselbe Inkubationszeit, PrP<sup>SC</sup>-Isoform und Neuropathologie auf (Scott *et al.* 1999).

Diese verschiedenen Studien zeigen, dass BSE höchstwahrscheinlich auf den Menschen übertragen werden kann.

Ein verlässlicher Nachweis, dass durch die Nahrung aufgenommenes infiziertes Rindfleisch den Auslöser der Krankheit darstellt, fehlt jedoch.

## 1.2. Das Prion Protein (PrP)

### 1.2.1. Entdeckung

Nach Feststellung der Analogien von Kuru, CJK und Scrapie folgte die Suche nach der Identität des infektiösen Agens. Anfangs ging man von einer *slow virus* - Erkrankung aus. Sehr ungewöhnlich ist aber die hohe Resistenz des infektiösen Materials gegenüber Desinfektionsmaßnahmen und Verfahren, die gewöhnliche Viren und auch andere Krankheitserreger unschädlich machen. Experimente, bei denen das infektiöse Material hoher ionisierender Strahlung ausgesetzt wurde, blieben ohne Wirkung auf die Infektiosität (Alper *et al.* 1966), so dass angenommen wurde, dass sich der Erreger ohne Nukleinsäure vermehrt (Alper *et al.* 1967). Kurze Zeit später wurde erstmals ein Zellmembranprotein als Erreger der TSE vorgeschlagen (Gibson und Hunter 1967). Stanley Prusiner verfolgte diese These und stellte fest, dass durch Prozeduren, die Proteine zerstören oder modifizieren, die Infektiosität erlischt (Prusiner *et al.* 1981). So wurde der Ausdruck „**Prion**“ (*proteinaceous infectious particles*) geprägt (Prusiner *et al.* 1981; Prusiner 1982).

Bei der Aufreinigung des infektiösen Agens aus den Ablagerungen in Gehirnen infizierter syrischer Goldhamster isolierte man ein 27-30 kDa schweres Protein, genannt PrP<sup>27-30</sup> (PrP, Prion Protein). Dieses bildet *in vitro* schwer lösliche Aggregate, die denen in den Ablagerungen infizierter Gehirne ähneln (Bolton *et al.* 1982; Prusiner *et al.* 1982; Mc Kinley *et al.* 1983). PrP<sup>27-30</sup> ist ein Aufreinigungsartefakt, das durch die Anwendung von Proteinase K entstanden ist; ihm fehlen ca. 67 Aminosäuren (AS) des N-Terminus. Aber auch dieses verkürzte PrP ist infektiös. Mit einer abgeleiteten DNA-Sonde konnte das kodierende Gen PRNP identifiziert werden. Überraschenderweise handelte es sich dabei um ein Wirts- und kein Fremdprotein (Bolton *et al.* 1982; Prusiner 1982; Oesch *et al.* 1985). Weitergehende Untersuchungen zeigten, dass das Gen sowohl in gesunden als auch in infizierten Hamstern in gleichem Maße exprimiert wird (Oesch *et al.* 1985). Es existieren also zwei verschiedene Formen dieses Proteins, eine potentiell infektiöse Form (PrP<sup>SC</sup>, *Prion Protein Scrapie-Isoform*) und eine nichtinfektiöse Form (PrP<sup>C</sup>,

*Prion Protein Cellular*, zelluläre Form des PrP). Hauptbestandteil der infektiösen Partikel (Prionen) ist PrP<sup>SC</sup>. Daneben wurden ca. 10% Polysaccharide und ca. 1% Lipide gefunden (Riesner 2003).

### 1.2.2. Eigenschaften von PrP<sup>SC</sup>

PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>SC</sup> besitzen zwar eine identische Aminosäuresequenz, doch unterscheiden sie sich in ihren biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften. Messungen des Circular dichroismus (CD) und Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FTIR) mit hoch aufgereinigtem PrP<sup>C</sup> ergaben einen hohen Anteil an  $\alpha$ -Helix, wohingegen PrP<sup>SC</sup> einen großen Anteil an  $\beta$ -Faltblatt-Struktur aufweist (Caughey und Raymond 1991; Gasset *et al.* 1993; Pan *et al.* 1993). Die nichtinfektiöse Form unterscheidet sich von der infektiösen durch leichte Abbaubarkeit durch Proteasen und bessere Löslichkeit. Da chemisch keine Unterschiede zwischen beiden Proteinen festgestellt werden konnten, handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Konformationsisomere.

|  | PrP <sup>C</sup>        | PrP <sup>SC</sup>        |
|--|-------------------------|--------------------------|
| <b>Löslichkeit<br/>in Detergenzien</b> | ja                      | nein                     |
| <b>PK-Sensitivität</b>                 | ja                      | nein                     |
| <b>Struktur</b>                        | Meist $\alpha$ -helical | Meist $\beta$ -Faltblatt |
| <b>Infektiösität</b>                   | nein                    | ja                       |

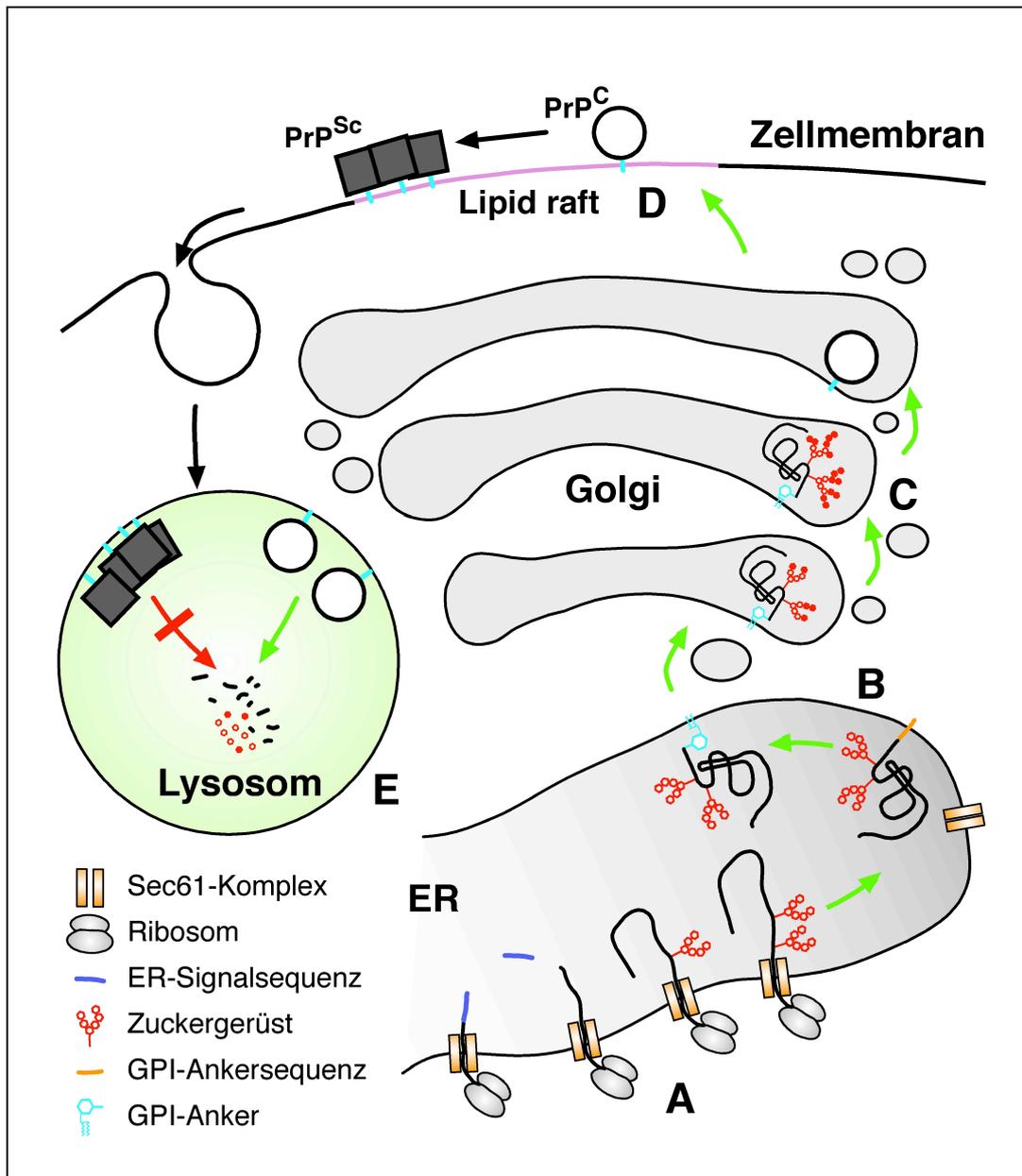
**Tabelle 4.** Eigenschaften von PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>SC</sup>. Es sind die Unterschiede bezüglich der Löslichkeit, PK-Sensitivität, Struktur und Infektiösität gezeigt.

### 1.2.3. Biogenese von PrP<sup>C</sup>

Das PrP-kodierende Gen PRNP enthält drei Exons, wobei der komplette Leserahmen in Exon 3 enthalten ist.

Das Prion Protein ist ein glykosyliertes Zelloberflächenprotein und wird als 256 AS (Maus-PrP) langes Präprotein synthetisiert. Während des cotranslationalen Imports (siehe Kapitel 1.3.1.) in das Endoplasmatische Retikulum (ER) wird die 22 AS lange N-terminale Präsequenz abgespalten und Zuckerketten werden mit dem Protein verknüpft. Die hydrophoben C-terminalen 23 AS fungieren als Erkennungssequenz für einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI) - Anker, welcher als Ganzes im ER an die sogenannte  $\square$ -site (AS 231, Maus-PrP) übertragen wird. Im Golgi-Apparat wird das Protein komplex glykosyliert (siehe Kapitel 1.3.2.) und schließlich gelangt es an die Zellmembran, wo es mit dem GPI-Anker angeheftet ist. PrP reichert sich zusammen mit anderen GPI-verankerten Proteinen an der Zelloberfläche in Domänen mit bestimmter Fettsäurezusammensetzung (sogenannten *lipid rafts*) an (Harmey *et al.* 1995; Vey *et al.* 1996).

Das Prion Protein wird in fast allen Geweben exprimiert, hauptsächlich jedoch im Gehirn und in Lymphozyten (Cashman *et al.* 1990; Bendheim *et al.* 1992).

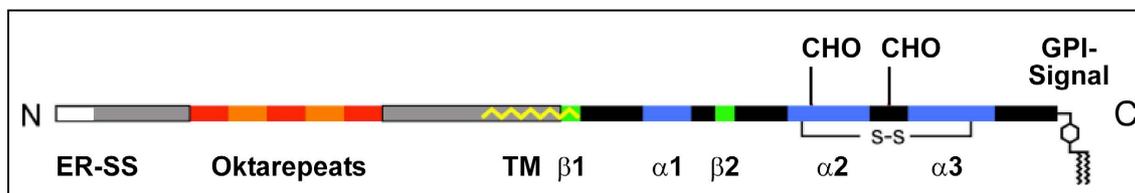


**Abbildung 3.** Biogenese des PrPs.

(A) PrP wird in das raue Endoplasmatische Retikulum (ER) importiert. Während des Imports wird die ER-Signalsequenz abgespalten und Zuckerketten werden mit dem Protein verknüpft. (B) Die GPI-Ankersequenz wird durch einen vorgeformten GPI-Anker ersetzt. (C) Im Golgi-Apparat werden die Zuckerketten komplex modifiziert. (D) PrP reichert sich auf der Zellmembran in Arealen mit spezieller Fettsäurezusammensetzung an (lipid rafts). (E) Während PrP<sup>C</sup> im Lysosom abgebaut werden kann, widersteht PrP<sup>Sc</sup> der Degradation und reichert sich an.

### 1.2.4. Struktur von PrP

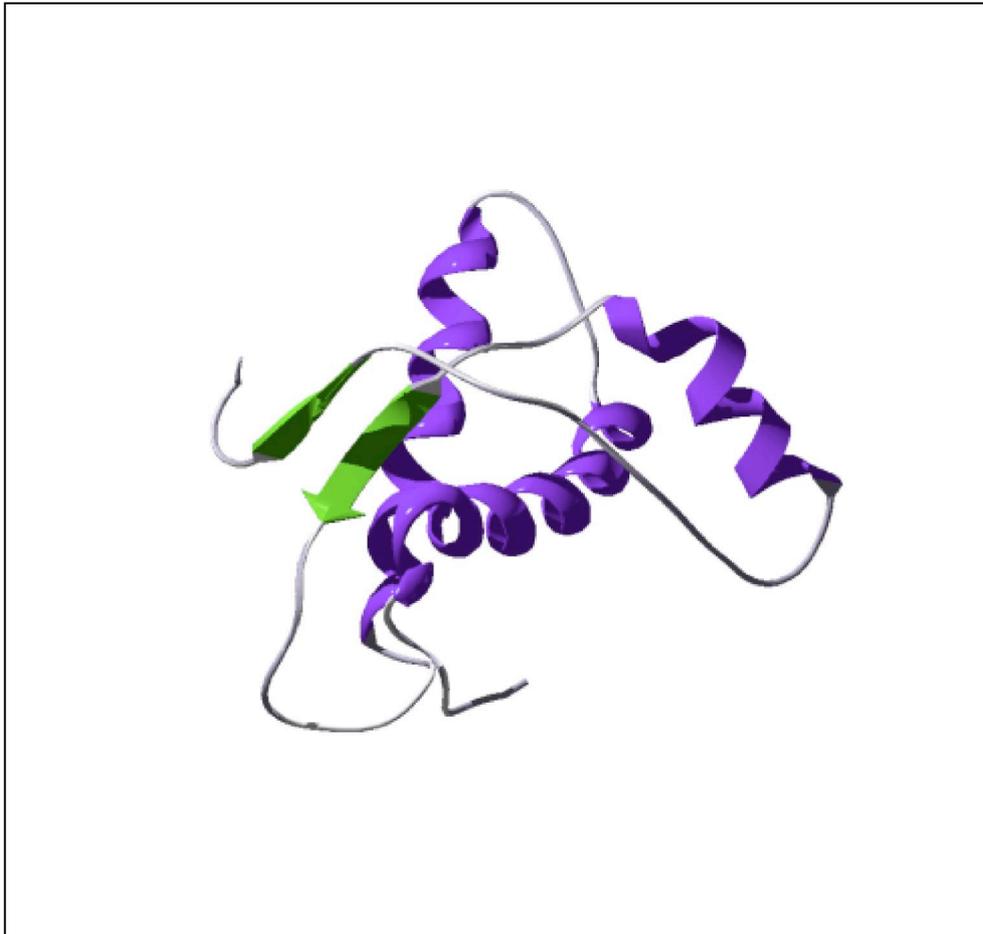
Das Prion Protein besitzt einen unstrukturierten N-Terminus (Riek *et al.* 1996; James *et al.* 1997; Riek *et al.* 1997b; Lopez *et al.* 2000; Zahn *et al.* 2000) und einen strukturierten C-Terminus. In dem N-terminalen Teil des Proteins liegen die Signalsequenz (Abb. 4, ER-SS), welche für den Import des Protein in das Endoplasmatische Retikulum benötigt wird, und fünf Oktarepeats (Wiederholungen von den acht Aminosäuren PQGGTWGQ), welche Kupferbindungseigenschaften haben (Brown *et al.* 1997a; Stöckel *et al.* 1998; Viles *et al.* 1999; Aronoff-Spencer *et al.* 2000).



**Abbildung 4.** Schematische Darstellung des Prion Proteins.

N: N-terminales Ende; C: C-terminales Ende; ER-SS (weiß): Signalsequenz für das Endoplasmatische Retikulum; Oktarepeats (rot-orange); TM (gelb): Transmembrandomäne;  $\alpha$ 1-3 (blau):  $\alpha$ -Helices;  $\beta$ 1-2 (grün):  $\beta$ -Faltblätter; CHO: Glykosylierungsstelle; S-S: Disulfidbrücke; GPI-Signal: Glykosylphosphatidylinositol-Anker-Signal

Die strukturierte Domäne bildet der C-terminale Teil des Proteins. Hier befindet sich die potenzielle Transmembrandomäne (Abb. 4, TM). Die erste Helix wird durch zwei kleine antiparallele Faltblätter eingeschlossen; daran schließen sich zwei weitere Helices an (Abb. 4 und 5) (Riek *et al.* 1996; Donne *et al.* 1997; Riek *et al.* 1997a). Durch eine Disulfidbrücke wird der Struktur Stabilität verliehen. Das Prion Protein wird an den Positionen Asp 180 und Asp 196 (Maussequenz) komplex glykosyliert (Endo *et al.* 1989; Haraguchi *et al.* 1989; Rudd *et al.* 1999; Stimson *et al.* 1999). Am C-Terminus erfolgt die Anheftung eines Phosphatidylinositolglykolipids (GPI-Anker), mit dem das Protein an der äußeren Zellmembran verankert ist (Stahl *et al.* 1987; Stimson *et al.* 1999).



**Abbildung 5.** NMR-Struktur von Maus-PrP 121-231. Bändermodell der Struktur der Maus Prion Protein-Domäne PrP121-231, welches die Position der drei Helices (blau) und der zwei antiparallelen Faltschichten (grün) zeigt (Riek *et al.* 1996).

Es gibt zwar eine NMR-Struktur von einem verkürzten Maus-PrP (AS 121-231), welches rekombinant aus *E.Coli* gewonnen wurde (Riek *et al.* 1996) (Abb. 5), doch die Struktur von PrP<sup>SC</sup> konnte auf Grund der Unlöslichkeit noch nicht geklärt werden.

### 1.2.5. Das Prion-Konzept

Das Prion-Konzept beruht auf der Protein-only Hypothese von Stanley Prusiner, welche besagt, dass das Prion Protein in seiner Scrapie Form (PrP<sup>SC</sup>) den Hauptbestandteil der infektiösen Partikel (Prionen) darstellt (Prusiner 1982). Dieser neuartige Erreger kommt ohne Nukleinsäuren aus (Prusiner 1982). Die Bestätigung, dass das Prion Protein unmittelbar mit der Ausbildung von TSE verbunden ist,

ergaben Experimente mit transgenen Mäusen. Mäuse mit deletiertem PRNP ( $Prnp^{0/0}$ -Mäuse) sind nicht infizierbar und können den Erreger nicht propagieren. Durch eine Wiedereinführung des PRNP-Gens in eine  $Prnp^{0/0}$ -Mauslinie wird die Infizierbarkeit wiederhergestellt (Büeler *et al.* 1993). Die Expression von  $PrP^C$  ist damit für eine Infektion nötig.

Für die Vermehrung des infektiösen Materials im Gehirn ist eine Umwandlung von dem zellulären  $PrP^C$  in die infektiöse Form  $PrP^{SC}$  notwendig (Pan *et al.* 1993). Für diese Konversion wurde ein direkter Kontakt der Isoformen entweder in endosomalen Kompartiment oder auf der Zelloberfläche postuliert (Caughey und Raymond 1991; Borchelt *et al.* 1992; Taraboulos *et al.* 1995). Wie die Umwandlung von der zellulären Form  $PrP^C$  in die infektiöse Isoform  $PrP^{SC}$  abläuft, ist nicht geklärt. Es gibt zahlreiche Konversionsmodelle, wobei die Modelle von Prusiner und von Lansbury am meisten diskutiert werden. Beide Modelle beruhen auf einer Konformationsumwandlung des  $PrP$  als primären Ereignis.

Bei dem Heterodimer-Modell von Prusiner stellt die Bildung eines Heterodimers aus  $PrP^C$  und  $PrP^{SC}$  den kritischen Schritt dar. Ein  $PrP^{SC}$  kann jeweils ein  $PrP^C$  in einer autokatalytischen Reaktion umwandeln (Prusiner 1991). Die Konversion konnte erfolgreich *in vitro* durchgeführt werden (Caughey *et al.* 1995), doch die *in vitro* Herstellung von infektiösem Material ist fehlgeschlagen. Dies führte zu der Annahme, dass noch ein zusätzlicher Faktor, genannt Protein X, für die Bildung von pathogenen Prionen nötig ist (Telling *et al.* 1995).

In dem Lansbury-Modell ist die Bildung eines Kristallisationskeims nötig. Ausgehend von diesem Kristallisationskeim akkumuliert das Protein, wobei es für die Propagierung von  $PrP^{SC}$  eine bestimmte Mindestgröße erreichen muss (Jarrett und Lansbury 1993).

### **1.2.6. Neurodegeneration in Abwesenheit von $PrP^{SC}$ : $C^{tm}PrP$ und zyto- PrP**

Wie aus zahlreichen biochemischen, pathologischen und genetischen Studien hervorgeht, stellt  $PrP^{SC}$  die wichtigste und die am weitesten verbreitete toxische Form

des Prion Proteins dar. Jedoch wurden auch zwei weitere Formen des PrPs gefunden, die in Abwesenheit von PrP<sup>SC</sup> eine Neurodegeneration hervorrufen können: <sup>Ctm</sup>PrP (transmembranes PrP) und zyto-PrP (zytosolisches PrP).

PrP kann an der ER-Membran in drei unterschiedlichen Formen vorliegen. Die häufigste Form ist die sogenannte <sup>Sec</sup>PrP-Form, in der das Protein ganz in das ER-Lumen transloziert ist und mittels eines GPI-Ankers an der Zellmembran verankert ist. Jedoch kann das Protein auch an der in Computeranalysen vorhergesagten Transmembrandomäne (AS 114-133) in die ER-Membran integriert sein, woraus zwei weitere Formen des PrPs resultieren; bei <sup>Ntm</sup>PrP liegt der N-Terminus im ER-Lumen und bei <sup>Ctm</sup>PrP der C-Terminus. Diese Topologien konnten zuerst in zellfreien Translationssystemen mit Kaninchen-Retikulozytenlysate und Weizenkeimextrakten nachgewiesen werden (Lopez *et al.* 1990; Yost *et al.* 1990; Hegde *et al.* 1998a). Es wurde festgestellt, dass Mutationen in der Signalsequenz und an oder nahe der Transmembrandomäne die relativen Mengen an <sup>Ctm</sup>PrP, <sup>Ntm</sup>PrP und <sup>Sec</sup>PrP beeinflussen können (Hegde *et al.* 1998a; Kim *et al.* 2001). So konnte bei GSS-Patienten mit der A117V Mutation und bei transgenen Mäusen mit einer Mutation in der Transmembrandomäne (AV3; AS 112, 114 und 117 von Alanin zu Valin mutiert) eine erhöhte Synthese der <sup>Ctm</sup>PrP-Form festgestellt werden (Hegde *et al.* 1998a). Die erhöhte Expression von <sup>Ctm</sup>PrP führte in Abwesenheit von PrP<sup>SC</sup> zu einer Neurodegeneration. Auch nach einer Infektion von Mäusen mit Scrapie wurde eine erhöhte Menge an <sup>Ctm</sup>PrP gefunden (Hegde *et al.* 1999).

Desweiteren wurde kürzlich gezeigt, dass zytosolisches PrP an der Pathogenese beteiligt sein kann. In Zellkultur konnte nach Behandlung mit einem proteasomalen Inhibitor ein Anstieg an unglykosylierten, unlöslichen PrP im Zytosol festgestellt werden, was zum Zelltod führte. Darüberhinaus entwickelten transgene Mäuse, die PrP im Zytoplasma exprimierten, eine starke Neurodegeneration (Ma *et al.* 2002). PrP-Mißfaltung, Anhäufung von PrP im Zytoplasma, Abbau durch das Proteasom und selektive Neurotoxizität stehen damit in einem engen Zusammenhang.

Eine Fehlregulierung in der Proteinbiogenese und eine alternative Topologie an der ER-Membran kann damit auch in Abwesenheit von PrP<sup>SC</sup> an der Entstehung einer Neurodegeneration beteiligt sein.

### 1.2.7. Funktion von PrP<sup>C</sup>

Die Funktion von PrP<sup>C</sup> konnte bis heute noch nicht nachgewiesen werden. Die Untersuchung von PrP- *knock out*- Mäusen zeigte keine prägnanten Erkenntnisse, welche zur Klärung der Funktion von PrP<sup>C</sup> beitragen. Die erste Maus, in der das PRNP-Gen deletiert wurde, wurde 1992 generiert und zeigte - wie auch in anderen Studien (Manson *et al.* 1994) - keinen signifikanten Phänotyp im Vergleich zu Wildtyp Mäusen (Büeler *et al.* 1992). Bei anderen PrP<sup>0/0</sup>-Mäusen wurden Abweichungen im zirkadianen Rhythmus und Veränderungen im Schlafverhalten festgestellt (Tobler *et al.* 1996).

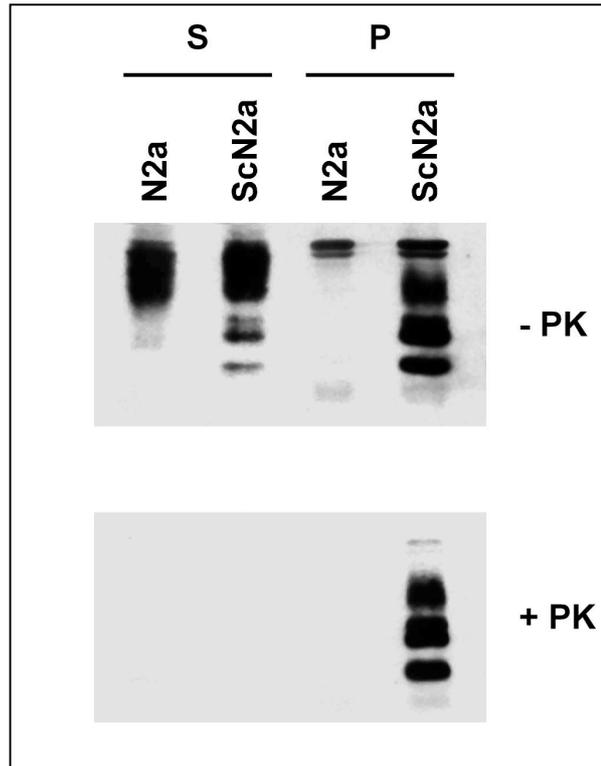
Bei der weiteren Suche nach der Funktion von PrP<sup>C</sup> wurde eine Beteiligung an der Signaltransduktion untersucht. PrP wurde in einer Studie mittels eines Antikörpers dimerisiert. Daraufhin konnte eine veränderte Phosphorylierung der Tyrosin-Kinase Fyn beobachtet werden, was eine Hochregulierung der Fyn-Kinase zur Folge hatte (Mouillet-Richard *et al.* 2000). Wie jedoch das zytosolische Fyn mit dem an der Oberfläche befindlichen PrP<sup>C</sup> interagieren soll, wurde nicht gezeigt. Des Weiteren wird eine neuroprotektive Signalwirkung von PrP in Erwägung gezogen. So konnte das Stress-induzierbare Protein 1 (STI 1) als ein mögliches mit PrP interagierendes Protein an der Plasmamembran ausfindig gemacht werden (Zanata *et al.* 2002). Es konnte gezeigt werden, dass eine Interaktion von PrP<sup>C</sup> mit STI 1 Neuronen vor einer Anisomycin-induzierten Apoptose schützt.

Die wohl wichtigste und meist untersuchte Funktion des PrP<sup>C</sup> hängt mit dessen Kupferbindungseigenschaft zusammen (Broussolle *et al.* 1989; Stöckel *et al.* 1998; Viles *et al.* 1999). Die im unstrukturierten N-Terminus befindlichen Oktarepeats sind in der Lage Kupferionen zu binden (Miura *et al.* 1996; Brown *et al.* 1997a). In PrP<sup>0/0</sup>-Mäusen wurde eine verminderte synaptosomale Kupferkonzentration festgestellt (Collinge *et al.* 1994; Manson *et al.* 1995), was einerseits auf dem Verlust des an das Prion Protein gebundenen Kupfers als auch auf eine verminderte Wiederaufnahme des bei der synaptischen Vesikelfreisetzung in den synaptischen Spalt gelangenden Kupfers (Hörnlimann *et al.* 2001) zurückzuführen ist. Freie Kupferionen im synaptischen Spalt können den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor beeinträchtigen (Sharonova *et al.* 1998). Desweiteren konnte eine verminderte Aktivität des kupferabhängigen Enzyms Superoxiddismutase (SOD) beobachtet werden (Brown *et al.* 1997b), welcher die

Aufgabe des Abfangens von schädlichen Radikalen zukommt. Diese Superoxiddismutase Aktivität von PrP<sup>C</sup> konnte jedoch von Hutter *et al.* nicht bestätigt werden (Hutter *et al.* 2003). Alternativ könnte die Bindung von Kupfer durch PrP<sup>C</sup> primär der Wiederaufnahme von Kupfer in die Präsynapse über eine Endocytose von PrP<sup>C</sup> dienen (Shyng *et al.* 1994; Pauly *et al.* 1998) oder aber nur von struktureller Bedeutung für den N-Terminus von PrP<sup>C</sup> sein (Marcotte *et al.* 1999). Interessanterweise kann auch die beobachtete Veränderung im Wach-Schlaf-Rhythmus (Tobler *et al.* 1996; Tobler *et al.* 1997) durch einen Kupfermangel erklärt werden. So steht die Synthese des für den Schlafrhythmus wichtigen Hormons Melatonin (Mc Arthur *et al.* 1991) in Abhängigkeit eines kupferabhängigen Enzyms der Monoaminoxidase (Oxenkrug *et al.* 1998).

### **1.2.8. Zellkulturmodell**

Ein wertvolles System zur Untersuchung von Prionen stellt die N2a-Zelllinie der Maus (ATCC-Nr. CCI 131) von immortalisierten neuronalen Zellen dar. Diese Zellen sind infizierbar und replizieren Infektiösität (Butler *et al.* 1988; Caughey *et al.* 1989). In der ScN2a-Zelllinie wurden N2a-Zellen mit angereicherten Prionen, welche aus Gehirnen von mit Scrapie infizierten Mäusen gewonnen wurde, infiziert. Die unterschiedlichen Eigenschaften von PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>SC</sup> lassen sich gut anhand eines Western Blotes analysieren.



**Abbildung 6.** PrP<sup>C</sup> ist löslich in Detergenzien, während PrP<sup>Sc</sup> unlöslich und Protease-resistent ist. N2a und ScN2a Zellen (Scrapie infizierte N2a-Zellen) wurden geerntet und in 0.5% Triton-DOC lysiert. Durch Zentrifugation wurde der lösliche (S) vom unlöslichen Teil (P) getrennt. Nach PK-Verdau (+PK bzw. -PK) wurden die Proben auf einem SDS-Gel aufgetrennt und PrP nach Western Blot mittels des A7 Antikörpers detektiert.

Auf diesem Western Blot sind deutlich die Löslichkeit und die PK-Sensitivität von PrP<sup>C</sup> erkennbar (Abb. 6, N2a, +PK). PrP<sup>Sc</sup> hingegen ist resistent gegen eine Proteinase K-Behandlung (ScN2a, +PK). Es entsteht ein ca. 27-30 kDa großes Fragment, welches durch die proteolytische Abspaltung des N-terminalen Bereiches entsteht.

Der Unterschied in der PK-Sensitivität dient auch als Grundlage für sämtliche Priontests.

### 1.3. Zellbiologische Grundlagen

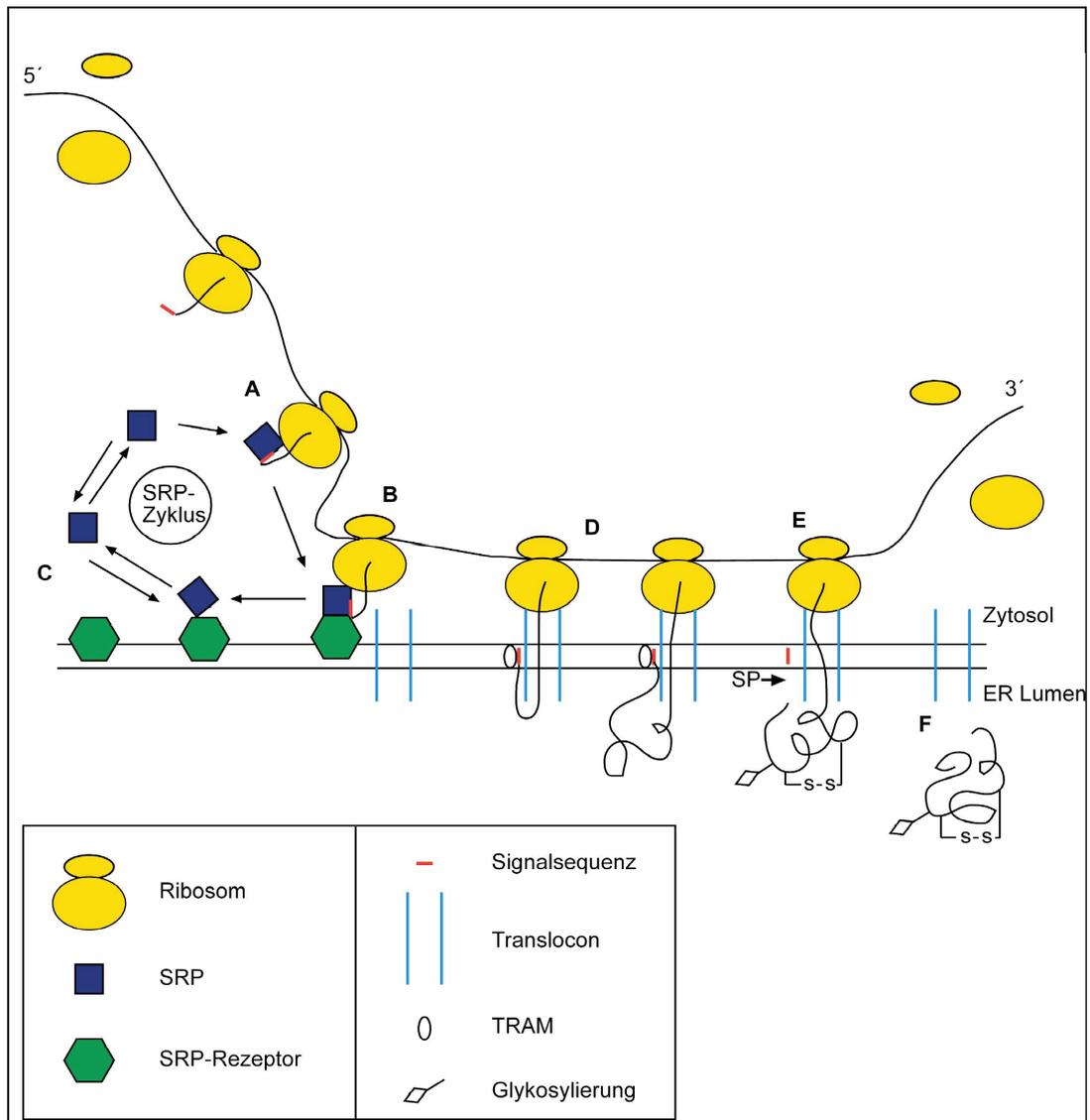
#### 1.3.1. Proteinsynthese am ER

Die Synthese eines Proteins beginnt an freien Ribosomen im Zytosol. Die entstehende aus dem Ribosom austretende Polypeptidkette enthält normalerweise eine N-terminale Signalsequenz, welche das entstehende Protein an die ER-Membran dirigiert. Fehlt eine Signalsequenz, so bleibt das Ribosom frei im Zytosol.

Die Signalsequenz ist normalerweise 20-30 AS lang und kann in drei Regionen eingeteilt werden (von Heijne 1985): (a) eine kurze, positiv geladene N-terminale Region, (b) eine zentrale hydrophobe Region, und (c) eine polare C-terminale Region, die die Schnittstelle für die Signalpeptidase enthält. Obwohl die Signalsequenzen sehr wichtig sind, sind sie in der Sequenz sehr verschieden. Doch zwei Merkmale scheinen für einen cotranslationalen Import wichtig zu sein: Ein bestimmtes Maß an Hydrophobizität muss erreicht sein (Valent *et al.* 1995) und sie muss in der Lage sein, eine  $\alpha$ -helikale Konformation einzunehmen (Bruch *et al.* 1989; McKnight *et al.* 1989; Rothe und Lehle 1998).

In Säugetierzellen werden sekretorische Proteine in der Regel cotranslational in das ER importiert. Wenn Ribosomen sekretorische Proteine oder Membranproteine translatieren, so werden diese mit Hilfe eines Ribonucleoproteins, das als Signalerkennungspartikel (SRP, *signal recognition particle*) bezeichnet wird, zum ER gebracht (Walter und Blobel 1980; Walter und Blobel 1982). Dieses besteht aus einem RNA-Molekül mit 300 Nucleotiden (als 7SL-RNA bezeichnet) und sechs verschiedenen Polypeptidketten (benannt nach deren Molekulargewicht: SRP9, SRP14, SRP19, SRP54, SRP68, SRP72). Der SRP-Zyklus (vgl. Abb. 7) beginnt, indem SRP an das Ribosom und an die hydrophobe N-terminale Signalsequenz bindet, welche aus dem Ribosom austritt. Während der Bindung von SRP wird die Elongation der Polypeptidkette verlangsamt oder gestoppt. Der SRP-Ribosomen-Komplex diffundiert dann zur ER-Membran und bindet dort mittels einer GTP-abhängigen Interaktion an den SRP-Rezeptor, welcher mit der Translokationspore (Sec 61-Komplex) interagiert (Meyer und Dobberstein 1980; Gilmore *et al.* 1982a; Gilmore *et al.* 1982b). Daraufhin wird der SRP-SRP-Rezeptor-Komplex von dem Ribosomen-Polypeptidketten-Komplex freigelassen (Connolly und Gilmore 1989)

und somit kann die Elongation am Ribosom fortgesetzt werden (Pohlschroder *et al.* 1997; Matlack *et al.* 1998; Johnson und van Waes 1999). Durch GTP-Hydrolyse wird der SRP-SRP-Rezeptor-Komplex gespalten (Miller und Walter 1993). Damit ist der SRP-Zyklus beendet. Das Ribosom befindet sich nun an der Translokationsmaschinerie (Translocon), einem aus vielen Untereinheiten bestehendem Aggregat aus integralen und peripheren Membranproteinen, das auch Sec 61-Komplex (mit den Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ ) genannt wird (Görlich *et al.* 1992; Sanders *et al.* 1992). Unter Kontrolle des Signalpeptids wird der Kanal geöffnet und die Signalsequenz assoziiert mit dem integralen TRAM-Protein (*translocating chain associating membrane*) (Görlich *et al.* 1992; Voigt *et al.* 1996b). Die wachsende Polypeptidkette wird in Schleifenform in das ER-Lumen geschoben. Schließlich schneidet die Signalpeptidase, welche an der luminalen Seite der ER-Membran lokalisiert ist, die Signalsequenz ab (Johnson und van Waes 1999), und die Synthese des Proteins kann vollendet werden.



**Abbildung 7.** Schematische Darstellung des cotranslationalen Imports in das ER. (A) SRP bindet an das Signalpeptid und das Ribosom. (B) SRP bindet an den SRP-Rezeptor. (C) Der SRP-SRP-Rezeptorkomplex dissoziiert. (D) Das Ribosom bindet an das Translocon und die Elongation läuft weiter. (E) Die Signalpeptidase (SP) schneidet die Signalsequenz ab. (F) Das Protein gelangt vollständig in das ER. (Abbildung in Anlehnung an (Walter *et al.* 1984; Alberts *et al.* 1999; Stryer 1999)).

Der Transport von Proteinen durch die ER-Membran kann *in vitro* unter Verwendung von gereinigtem Sec61 Komplex, TRAM und dem SRP-Rezeptor nachvollzogen werden (Görlich und Rapoport 1993; Voigt *et al.* 1996a). Für einen erfolgreichen ER-Import des Prion Proteins wird allerdings ein weiterer Faktor, der sogenannte TRAP (*translocon-associated protein*)-Komplex, benötigt (Fons *et al.* 2003).

Neben dem erläuterten cotranslationalen Importweg, welchen in der Regel sekretorische Proteine in Säugetierzellen einschlagen, gibt es noch den

posttranslationalen Importweg in das ER, welcher für kleine Proteine mit einer Länge von weniger als 75 AS in Säugetierzellen und für Proteine in Hefezellen beschrieben ist. Hierbei wird das fertig synthetisierte Protein als Ganzes in das ER eingebracht, unabhängig von dem im cotranslationalen Weg verwendeten SRP-System (*signal recognition particle*, Signalerkennungspartikel) (siehe oben) (Müller und Zimmermann 1987; Schlenstedt und Zimmermann 1987).

### 1.3.2. Prozessierung der Proteine im ER und Golgi-Apparat

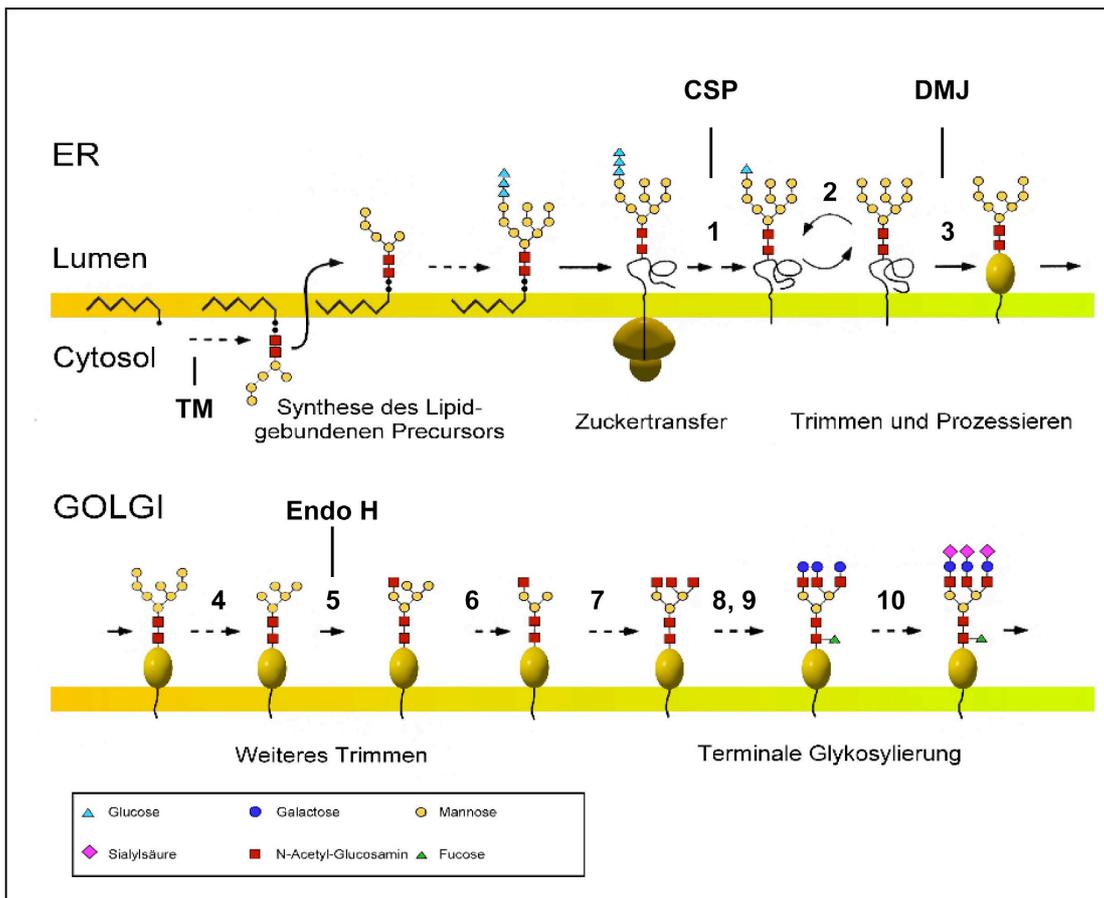
Die wichtigste Prozessierung der Proteine ist ihre Glykosylierung, die sich sukzessive über das ER und die proximalen, mittleren und distalen Golgi-Zisternen erstreckt. Phosphorylierungen über ATP und Sulfatierungen über 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) finden ebenfalls im Golgi-Apparat statt.

Es werden folgende Glykosylierungsarten von Proteinen unterschieden:

Die N-Glykosylierung an Asparaginresten, die durch das Motiv -Asn-X-Ser/Thr- (X beliebige AS außer Pro) charakterisiert sind, beginnt cotranslational im ER und setzt sich im Golgi-Apparat fort.

Die O-Glykosylierung an einem Serin- oder Threoninrest beginnt posttranslational im ER oder erst im Golgi-Apparat mit der Bindung eines GalNAc-Rests an die OH-Gruppe der Aminosäure.

Die Übertragung des Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Ankers bei GPI-verankerten Proteinen stellt eine Lipidierung dar. Dieser GPI-Anker verankert das Protein an der Plasmamembran. Solche Proteine haben eine C-terminale GPI-Anker-Präsequenz, welche aus mehreren hydrophoben Aminosäuren besteht. Diese wird im ER durch den kompletten GPI-Anker ersetzt, indem die C-terminale Carboxylgruppe des Proteins mit dem NH<sub>2</sub>-Gruppe des endständigen Ethanolaminphosphats im GPI-Anker verbunden wird.



**Abbildung 8.** Schematische Darstellung der Glykosylierung in ER und Golgi. Die an Asparagin gebundenen Oligosaccharide werden im ER und in den drei Golgi-Kompartimenten prozessiert. Folgende Enzyme katalysieren diese Schritte: (1) Glucosidase I, (2) Glucosidase II, (3)  $\alpha$ -1,2-Mannosidase des ER, (4) Mannosidase I des Golgi-Apparates, (5) GlcNAc-Transferase I, (6) Mannosidase II, (7) GlcNAc-Transferase II und IV, (8) Fucosyltransferase, (9) Galactosyltransferase, (10) Sialyltransferase. TM: Tunicamycin, CSP: Castanospermin, DMJ: Desoxymannojirimycin.

Die Synthese der N-glykosidischen Oligosaccharidketten ist außerordentlich komplex und beginnt auf der zytosolischen Seite des ER mit der Bildung eines Dolicholdiphosphat-Man<sub>5</sub>GluNAc<sub>2</sub>; Dolichol ist ein sehr lipophiles Polyprenol in der ER-Membran. Durch „Umklappen“ des Dolicholmoleküls innerhalb eines nicht näher charakterisierten Proteinkomplexes wird der Lipid-gebundene Precursor auf die luminal Seite des ER transferiert. Dort wird dieser verlängert, indem die Zuckerreste nun einzeln oder an Dolicholphosphat gebunden in ähnlicher Weise aus dem Zytoplasma in das Lumen gebracht werden und dort durch Transferasen angehängt werden (Kornfeld und Kornfeld 1985). Sobald der Precursor die Struktur des aktiven Core-Oligosaccharids (Dolicholdiphosphat-Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlucNAc<sub>2</sub>) erreicht hat, wird er als Ganzes mit Hilfe der Oligosaccharyltransferase auf einen Asparaginrest der

wachsenden Polypeptidkette übertragen. Nun hat das entstehende Protein das sogenannte Core Glykan erhalten. Noch während sich das Glykoprotein im ER befindet, werden die drei endständigen Glukoseeinheiten des Core Glykans schnell abgespalten. Wenn das Protein jedoch falsch oder noch nicht gefaltet ist, wird wieder Glukose angehängt (Suh *et al.* 1989; Sousa *et al.* 1992; Trombetta *et al.* 1996). Im ER laufen mehrere Zyklen von Glukoseaddition und Glukoseabspaltung ab (Hebert *et al.* 1996), wobei die Glucosyltransferase und die Glucosidase II beteiligt sind. Sind ein oder mehrere Glukosereste an dem N-gebundenen Oligosaccharid gebunden, so interagiert es mit den Chaperonen Calnexin (membrangebunden) und Calreticulin (löslich) (Hebert *et al.* 1996). Nach vollständiger Faltung des Glykoproteins im ER wird die endständige Glukose abgespalten und nicht mehr erneut angehängt. Das gefaltete Glykoprotein wird von Calnexin freigesetzt. Somit sind mehrere Zyklen der Glykosylierung und Glukoseabspaltung und die ausschließliche Bindung glykosylierter Glykoproteine an das Calnexin von zentraler Bedeutung für die Qualitätskontrolle im ER (Calnexin-Zyklus) (Parodi 2000; Helenius und Aebi 2001). Im Golgi-Apparat finden weitere Modifikationen der Zuckerketten statt. Doch hier ist Dolicholphosphat als Carrier nicht enthalten. Die Zucker werden in aktiver Form als Nukleotide durch spezifische Translokatoren im Antiport gegen die Nucleosiddi- bzw. monophosphate in die Golgi-Zisternen transportiert und durch entsprechende Transferasen an die Ketten angehängt (siehe Abb. 8). Die Kohlenhydratprozessierung im Golgi-Apparat wird als terminale Glykosylierung bezeichnet, im Gegensatz zur Core Glykosylierung, die im ER stattfindet.

Zur Untersuchung des Prozessierungsstatus eines Proteins stehen verschiedene Substanzen zur Verfügung, welche die unterschiedlichen an der Prozessierung beteiligten Enzyme hemmen. Ein wichtiger antibiotischer Inhibitor der N-Glykosylierung ist Tunicamycin (TM). Es hemmt die Addition von N-Acetylglucosamin an Dolicholphosphat, also den ersten Schritt bei der Bildung des Core Glykans. Castanospermin (CSP) ist ein Stoff, der die Glucosidase I hemmt, wobei die Prozessierung auf der Stufe des Core Glykans gestoppt wird (vgl. Abb. 8, CSP). Durch den Einsatz von Desoxymannojirimycin (DMJ) wird die  $\alpha$ -Mannosidase gehemmt. Hierdurch wird die Prozessierung der Zucker auf der Stufe gestoppt, an der die endständigen Glukosereste erfolgreich abgespalten wurden und der Calnexin-Zyklus durchlaufen wurde. Durch Vergleich der mit CSP bzw. DMJ behandelten Zellen kann festgestellt werden, ob vom Core Glykan die drei endständigen Zucker

abgespalten wurden und damit der Calnexin-Zyklus erfolgreich durchlaufen wurde. Auch die terminale Glykosylierung kann gut in Zellkultur analysiert werden. Durch einen N-Glycosidase F (PNGase F) -Verdau können die Zucker von terminal glykosylierten Proteinen abgespalten werden. Die Endoglykosidase H (Endo H) hingegen spaltet spezifisch Hybridstrukturen oder zwischen zwei N-Acetyl-Glukosamin-Resten, an denen mindestens fünf Mannoseeinheiten hängen (siehe Abb. 8). Die Verwendung dieser Enzyme ermöglicht eine Untersuchung des Glykosylierungszustandes und lässt erkennen, ob High Mannose Strukturen (Endo H) oder terminal glykosylierte Strukturen (PNGase F) vorliegen.

### **1.3.3. Faltungskontrolle im ER**

Die geringe Häufigkeit von spontanen TSE-Erkrankungen könnte daran liegen, dass die Zelle mit verschiedenen Mechanismen ausgestattet ist, um einerseits eine Fehlfaltung zu verhindern und andererseits missgefaltete Proteine zu eliminieren.

Die „molekularen Chaperone“ (franz. *chaperone* - Anstandsdame) gewährleisten eine richtige Faltung und verhindern eine Proteinaggregation in der Zelle. Sie sind essentiell für das Überleben aller Zellen (Hartl 1996; Netzer und Hartl 1998; Ellis und Hartl 1999; Agashe und Hartl 2000; Feldman und Frydman 2000; Hartl und Hayer-Hartl 2002; Walter und Buchner 2002). In der *de novo* Proteinsynthese können die Chaperone entweder „passiv“ die Aggregation verhindern (kleine Chaperone) oder auch in aktiver Weise die Faltung vermitteln (Hsp60, Hsp70, Hsp90) (engl. *heat shock protein* - Hitzeschockprotein) (Agashe und Hartl 2000). Das häufigste im ER vorkommende Chaperon ist das Bindungsprotein BiP, ein 78kDa großes Protein aus der Hsp70-Familie. Ein weiteres wichtiges Chaperon im ER ist Grp94 (Glukose reguliertes Protein). Zusätzlich zu den Chaperonen findet man im Lumen des ER weitere Proteine, die für die Faltung und Prozessierung neu entstehender Polypeptidketten von essentieller Bedeutung sind. Die Protein-Disulfid-Isomerase beschleunigt die Proteinfaltung, indem sie die Ausbildung korrekter Disulfidbrücken katalysiert. Auch die Peptidyl-Propyl-Isomerasen sind wichtig, da sie die cis/trans-Isomerisierung der nicht frei drehbaren Peptidyl-Propyl-Bindung in Proteinen katalysieren.

Sollten Proteine im ER trotzdem nicht falten oder mißfallen, so besitzt die Zelle Qualitätskontrollmechanismen, um missgefaltete Proteine zu eliminieren. Neben dem in Kapitel 1.3.2. beschriebenen Calnexin-Zyklus sind zwei weitere Qualitätskontrollmechanismen vorhanden, um der Anhäufung missgefalteter Proteine entgegenzuwirken: Die *Unfolded Protein Response* (UPR) und die ER-assoziierte Degradierung (ERAD). Die *Unfolded Protein Response* (UPR) stellt eine komplexe Signaltransduktionskaskade dar (Lee 1987; Kozutsumi *et al.* 1988; Gething und Sambrook 1992). Hierdurch wird die Transkription verschiedener Gene aktiviert, deren Produkte die Faltung der Proteine unterstützen sollen (Mori *et al.* 1992). Induziert werden unter anderem die Chaperone BiP und Grp94 sowie die Protein-Disulfid-Isomerase PDI (Dorner *et al.* 1990; Little und Lee 1995). Desweiteren werden auch Untereinheiten des Proteasoms verstärkt exprimiert, wodurch faltungsinkompetente Proteine degradiert werden (Ng *et al.* 2000). Die ER-assoziierte Degradierung (ERAD) ist ein Mechanismus, der ungefaltete Proteine und Untereinheiten nicht korrekt assemblierter Proteinkomplexe aus dem ER entfernt und der Degradierung durch das zytosolische 26S-Proteasom zuführt (Finley *et al.* 1984; Jentsch *et al.* 1987; Hurtley und Helenius 1989; Klausner und Sitia 1990; Sommer und Jentsch 1993; Jensen *et al.* 1995). Zunächst müssen missgefaltete Proteine im ER erkannt werden, woran vermutlich die im ER lokalisierten Chaperone und die Glykosylierungsmaschinerie beteiligt sind (McCracken und Brodsky 1996; Plemper *et al.* 1997; Jakob *et al.* 1998). Der zweite Schritt besteht aus dem retrograden Transport durch die zentrale Translokationspore (sec61-Komplex), die auch am Protein-Import beteiligt ist (Wiertz *et al.* 1996; Plemper *et al.* 1997; Zhou und Schekman 1999). Anschließend kommt es zu einer Polyubiquitinierung, was als Signal für den Abbau durch das 26S-Proteasom dient (Schlesinger *et al.* 1975; Chau *et al.* 1989).

ERAD und UPR sind eng miteinander verknüpft. So verursacht eine fehlende ERAD die konstitutive Aktivierung der UPR. Mutationen, die beide Mechanismen ausschalten, sind synthetisch letal (Friedlander *et al.* 2000; Ng *et al.* 2000; Travers *et al.* 2000).

#### 1.4. Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Biogenese des Prion Proteins der Maus in Zellkultur und *In Vitro* zu untersuchen. Es sollte der Einfluß von bestimmten Domänen des PrP auf den effizienten Import in das ER analysiert werden. Desweiteren sollte untersucht werden, welche Determinanten die korrekte Faltung von PrP<sup>C</sup> und das Anheften des GPI-Ankers beeinflussen. Um bestimmte Domänen des Prion Proteins ausfindig zu machen, welche den physiologischen Faltungsweg von PrP<sup>C</sup> beeinflussen, sollten verschiedene Deletionsmutanten hergestellt und in Zellkultur exprimiert werden. Ein wichtiges Zellkulturmodell in der Prionforschung stellen immortalisierte neuronale Zellen der Maus, die N2a-Zelllinie, dar. Diese Zellen sind infizierbar und sie können die Infektiösität replizieren (Butler *et al.* 1988; Caughey *et al.* 1989).

Eine eingehende biochemische und zellbiologische Charakterisierung von verschiedenen - teils auch pathogenen - PrP Mutanten kann zum besseren Verständnis der Biogenese des Prion Proteins einen wichtigen Beitrag leisten.

## 2. Material

### 2.1. Biologisches Material

#### 2.1.1. Zelllinien

|         |  |
|---------|--|
| N2a     | Typ: murine Neuroblastomzellen<br>ATCC-Nr. CCI 131 |
| SH-SY5Y | Typ: humane Neuroblastomzellen<br>DSMZ-Nr. ACC 209 |

#### 2.1.2. Bakterienstämme

|              |  |
|--------------|--|
| DH5 $\alpha$ | Genotyp: <i>supE44, _lac169,</i><br>( <i>_80lacZ_M15</i> ), <i>hsdR17, recA1, endA1,</i><br><i>gyrA96, thi-1, relA1</i><br>Herkunft: Hanahan, 1983 |
|--------------|--|

#### 2.1.3. Antikörper

|   |  |
|---|--|
| 3F4   | Signet Laboratories, Dedham, MA, USA<br>Verdünnung: 1:5000   |
| A7  | Verdünnung: 1: 2500<br>Hergestellt durch Immunisierung von<br>Kaninchen mit gereinigtem rekombinaten<br>PrP (Winklhofer <i>et al.</i> 2003a) |
| Anti-Kaninchen Antikörper<br>(HRP-gekoppelt) aus Esel | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg   |
| Anti-Maus Antikörper<br>(HRP-gekoppelt) aus Schaf     | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg   |

---

|                          |                                |
|--------------------------|--------------------------------|
| Anti-Maus Antikörper Cy3 | Dianova, Hamburg               |
| Anti-Grp 94              | Stressgen, Victoria, BC Canada |

#### 2.1.4. Enzyme und Proteine

|                                      |  |
|--------------------------------------|--|
| Benzonase                            | Merck, Darmstadt                       |
| BSA                                  | USB, Cleveland, OH, USA                |
| Endoglycosidase H                    | New England Biolabs, Schwalbach        |
| Lysozym                              | Sigma, Deisenhofen                     |
| N-Glycosidase F                      | Roche Diagnostics, Mannheim            |
| Pfu-Polymerase                       | Promega, Mannheim                      |
| Phosphatidylinositol phospholipase C | Roche Diagnostics, Mannheim            |
| Proteinase K                         | Boehringer Mannheim, Mannheim          |
| Restriktionsendonukleasen            | New England Biolabs, Schwalbach        |
| Shrimp-Alkaline-Phosphatase          | Roche Diagnostics, Mannheim            |
| T4-DNA-Ligase                        | New England Biolabs, Schwalbach        |
| Trypsin                              | Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe |

#### 2.1.5. Standardgrößenmarker für Proteine und Nukleinsäuren

##### Referenzproteine für SDS-Page

|                   |                       |
|-------------------|-----------------------|
| See Blue Plus2    | Invitrogen, Karlsruhe |
| Dalton Mark VII-L | Sigma, Deisenhofen    |

##### DNA-Längenstandards

|                   |                             |
|-------------------|-----------------------------|
| 1 kb DNA-Leiter   | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| 100 bp DNA-Leiter | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |

### 2.1.6. Vektoren und Plasmide

|                 |                                      |
|-----------------|--------------------------------------|
| pcDNA3.1/ZEO(+) | Invitrogen, Karlsruhe                |
| pcDNA-CD4-flag  | Herrmann Schätzel                    |
| pPROEX-HTa      | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg |

### 2.1.7. Synthetische Oligonukleotide

Die Synthese der Primer wurde von der Firma Metabion, Martinsried durchgeführt. Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen.

|          |                 |
|----------|-----------------|
| A/AGCTT  | <i>Hind</i> III |
| G/GCGCC  | <i>Kas</i> I    |
| C/TCGAG  | <i>Xho</i> I    |
| G/GTNACC | <i>BstE</i> II  |

|                          |   |  |    |
|--------------------------|---|--|----|
|                          | 5'  |  | 3' |
| PrP- <i>Hind</i> III-5': | AAACTT <u>AAGCTT</u> GGTACCGAGCTCGGATCCACT    |  |    |
| PrP- <i>Kas</i> I-3':    | CTCGAG <u>GGCGCC</u> ATCCCCAAACAGTGGCTTCTT    |  |    |
| <i>Xho</i> I-3':         | CCCTCTAGAC <u>TCGAG</u> GGCGCCATCCCCAAACAGTGG |  |    |
| <i>BstE</i> II-3':       | TATCACCATCAAGCAGCACAC <u>GGTCACC</u> ACCACCAC |  |    |
| □TM-PrP-5':              | ACCAACATGAAGCATATGGCAAGCAGGCCCATGATCCATTT     |  |    |
| □TM-PrP-3':              | AAAATGGATCATGGGCCTGCTTGCCATATGCTTCATGTTGGT    |  |    |
| □gpi-5':                 | AAGGAGTCCCAGGCCTATTACTGAGGGAGGCCTTCCTGCTTG    |  |    |
| □gpi-3':                 | CAAGCAGGAAGGCCTCCCTCAGTAATAGGCCTGGGACTCCTT    |  |    |
| mtGPI-5':                | GACGGGAGAAGAACCACCACCACCGTGCTTTTCTCC          |  |    |
| mtGPI-3':                | GGAGAAAAGCACGGTGGTGGTGGTTCTTCTCCCGTC          |  |    |
| □H1-5':                  | AGCAGGCCCATGATCCATTTTAACAACCTTCGTGCACGACTGC   |  |    |
| □H1-3':                  | GCAGTCGTGCACGAAGTTGTAAAATGGATCATGGGCCTGCT     |  |    |
| □H1*-5':                 | AGCAGGCCCATGATCCATTTTCTAACCAAGTGTACTACAGG     |  |    |
| □H1*-3':                 | CCTGTAGTACACTTGGTTAGGAAAATGGATCATGGGCCTGCT    |  |    |
| M204S-5':                | TTCACCGAGACCGATGTGAAGAGTATGGAGCGCGTGGTGGGA    |  |    |

M204S-3': CTCCACCACGCGCTCCATACTCTTCACATCGGTCTCGGTGAA  
M204R-5': TTCACCGAGACCGATGTGAAGAGGATGGAGCGCGTGGTGGGA  
M204R-3': CTCCACCACGCGCTCCATCCTCTTCACATCGGTCTCGGTGAA  
□N-5': GGCTCTGCAAAAAGCGGCCACAAGGAGGGGGTACCCATAA  
□N-3': ATTATGGGTACCCCTCCTTGTGGCCGCTTTTTGCAGAGGCC  
□27-156-5': GGCTCTGCAAAAAGCGGCCACCTAACCAAGTGTACTACAG  
□27-156-3': CCTGTAGTACACTTGGTTAGGTGGCCGCTTTTTGCAGAGGCC  
P101Stop-5': ACCATAATCAGTGGAACAAGAGCACCGTGCTTTTCTCCTCC  
P101Stop-3': GGAGGAGAAAAGCACGGTGCTCTTGTTCCTACTGATTATGGG  
A115Stop-5': ATGAAGCATATGGCAGGGGCTAGCACCGTGCTTTTCTCCTCC  
A115Stop-3': GGAGGAGAAAAGCACGGTGCTAGCCCCTGCCATATGCTTCA  
W144Stop-5': CATTTTGGCAACGACTGGGAGAGCACCGTGCTTTTCTCCTCC  
W144Stop-3': GGAGGAGAAAAGCACGGTGCTCTCCAGTCGTTGCCAAAAT  
Q159Stop-5': ATGTACCGCTACCCTAACCAAGCACCGTGCTTTTCTCCTCC  
Q159Stop-3': GGAGGAGAAAAGCACGGTGCTTTGGTTAGGGTAGCGGTACA  
□2-22-5': GATCTAGAATCAGTCATCATGAAAAAGCGGCCAAAGCCTGG  
□2-22-3': TCCAGGCTTTGGCCGCTTTTTTCATGATGACTGATTCTAGATCT  
WH-SS-5a': GGCTCCTGACCTTCAGCCTGCTCTGCCTGCTGTGGCCTCAAG  
AGGCTGGTGCTAAAAAGCGGCCAAAGCCTGGAG  
WH-SS-5b': CCCAAGCTTATGGCTGCAGACTCTCAGACTCCCTGGCTCCTG  
ACCTTCAGCCTGCTCTG

## 2.2. Chemikalien

|                   |                                      |
|-------------------|--------------------------------------|
| Aceton            | Merck, Darmstadt                     |
| Agarose           | Serva, Heidelberg                    |
| Ampicillin        | Boehringer Mannheim, Mannheim        |
| Amplify           | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg |
| APS               | USB, Cleveland, OH, USA              |
| □-Mercaptoethanol | Merck, Darmstadt                     |
| Bacto Agar        | Difco Laboratories, Detroit, MI, USA |
| Bromphenolblau    | Merck, Darmstadt                     |
| Castanospermin    | Merck, Darmstadt                     |

---

|   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| Complete Protease-Inhibitor                           | Boehringer Mannheim, Mannheim        |
| Desoxycholat  | Sigma, Deisenhofen                   |
| Desoxymannojirimycin                                  | Merck, Darmstadt                     |
| Desoxynucleosidtriphosphate<br>dATP, dCTP, dGTP, dTTP | Sigma, Deisenhofen                   |
| Dinatriumhydrogenphosphat                             | Merck, Darmstadt                     |
| EDTA  | USB, Cleveland, OH, USA              |
| Essigsäure  | Merck, Darmstadt                     |
| Ethanol   | Sigma, Deisenhofen                   |
| Ethidiumbromid  | Sigma, Deisenhofen                   |
| FCS   | Invitrogen, Karlsruhe                |
| Ficoll 400  | Merck, Darmstadt                     |
| Formamid  | Merck, Darmstadt                     |
| Geneticin   | Sigma, Deisenhofen                   |
| Glycerol  | USB, Cleveland, OH, USA              |
| Glycin  | USB, Cleveland, OH, USA              |
| Harnstoff   | Sigma, Deisenhofen                   |
| Hefeextrakt   | Difco Laboratories, Detroit, MI, USA |
| Immersionsöl  | Merck, Darmstadt                     |
| Instant-Magermilchpulver                              | Uelzena, Uelzen                      |
| Kaliumacetat  | Sigma, Deisenhofen                   |
| Kaliumchlorid   | USB, Cleveland, OH, USA              |
| Kaliumdihydrogenphosphat                              | Merck, Darmstadt                     |
| Kupfersulfat  | Sigma, Deisenhofen                   |
| Lachsspermien-DNA                                     | Roche Diagnostics, Mannheim          |
| Magnesiumchlorid                                      | USB, Cleveland, OH, USA              |
| Manganchlorid   | Sigma, Deisenhofen                   |
| Meglumin-Diatrizoat                                   | Sigma, Deisenhofen                   |
| Methanol  | Merck, Darmstadt                     |
| MG 132  | Merck, Darmstadt                     |
| Natriumchlorid  | Merck, Darmstadt                     |
| Natriumcitrat   | Merck, Darmstadt                     |
| Natrium-Diatrizoat                                    | Sigma, Deisenhofen                   |
| Natriumhydroxid-Plätzchen                             | Merck, Darmstadt                     |

|  |                                       |
|--|---------------------------------------|
| Oligolabeling-Kit                                    | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg  |
| PBS Dulbecco's +/- Mg/Ca                             | Invitrogen, Karlsruhe                 |
| PBS Dulbecco's -/- Mg/Ca                             | Invitrogen, Karlsruhe                 |
| Pepton   | Difco Laboratories, Detroit, MI, USA  |
| Ponceau S  | Sigma, Deisenhofen                    |
| Polyacrylamid/Bisacrylamid (29:1) 40%                | Roth, Karlsruhe                       |
| ProMix <sup>35</sup> S-Methionin/Cystein             | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg  |
| Proteasominhibitor MG132                             | Calbiochem, Bad Soden                 |
| Protein A-Trisacryl-Matrix                           | Pierce, KMF Laborchemie, St. Augustin |
| Rubidiumchlorid                                      | Sigma, Deisenhofen                    |
| Salzsäure  | Merck, Darmstadt                      |
| Sarkosyl   | USB, Cleveland, OH, USA               |
| SDS  | Roth, Karlsruhe                       |
| TEMED  | USB, Cleveland, OH, USA               |
| <u>Transfektionsreagenz:</u>                         |                                       |
| Lipofectamine Reagent                                | Invitrogen, Karlsruhe                 |
| Plus Reagenz   | Invitrogen, Karlsruhe                 |
| Tris   | USB, Cleveland, OH, USA               |
| Triton X-100   | USB, Cleveland, OH, USA               |
| Trypan Blau  | Invitrogen, Karlsruhe                 |
| Trypton  | Difco Laboratories, Detroit, MI, USA  |
| Tunicamycin  | Sigma, Deisenhofen                    |
| Tween-20   | USB, Cleveland, OH, USA               |
| Wasserstoffperoxid 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Merck, Darmstadt                      |
| Zellkulturzusatz                                     | Invitrogen, Karlsruhe                 |
| Penicillin/Streptomycin/Glutamin                     |                                       |

### 2.3. Lösungen und Puffer

|                                       |                                      |
|---------------------------------------|--------------------------------------|
| APS-Lösung                            | 10% Ammoniumperoxodisulfat in PBS-/- |
| <i>Blocking Milk</i> für Western Blot | 5% Magermilchpulver                  |
|                                       | 1x PBST ad 100 ml                    |

---

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| BSA 100x                      | New England Biolabs, Schwalbach   |
| Castanospermin                | 5 mg/ml in PBS -/-  |
| Coomassie-Entfärbelösung      | 40% Methanol<br>7% Essigsäure   |
| Denhardt 100x                 | 2% Ficoll 400<br>2% PVP<br>2% BSA   |
| DEPC-Wasser                   | 1ml DEPC in 1l Wasser<br>o/n 37°C, dann autoklavieren                                     |
| Detergenzpuffer, nichtionisch | 0,1% Triton X-100 in PBS -/-  |
| Detergenzpuffer, ionisch      | 0,5% Triton X-100<br>0,5% DOC<br>in PBS -/-   |
| Desoxymannojirimycin          | 5mg/ml in PBS -/-   |
| DNA-Probenpuffer (6x)         | 0.25% Bromphenolblau<br>30% Glycerol  |
| Elutionspuffer 1              | 8M Harnstoff<br>100mM Natriumacetat, pH4.6  |
| Elutionspuffer 2              | 8M Harnstoff<br>200mM Imidazol<br>100mM Natriumphosphat, pH7                              |
| IP-Puffer                     | 0,5% Triton X-100<br>0.5% DOC<br>Protease-Inhibitor-Tablette<br>in PBS -/-                |
| Laemmli-Probenpuffer (2x)     | 120 mM Tris pH 6.8<br>2% SDS<br>20% Glycerol<br>0.5% Bromphenolblau<br>2% Mercaptoethanol |

|  |   |
|--|---|
| Laemmli-Probernpuffer (4x)                   | 240 mM Tris pH 6,8<br>4% SDS<br>40% Glycerol<br>1% Bromphenolblau<br>4% Mercaptoethanol   |
| Laufpuffer für SDS-Page (10x)                | 250 mM Tris, pH 6,8<br>1,9 M Glycin<br>1% SDS   |
| MG132  | 10 mM MG132 in DMSO   |
| MOPS (10x)                                   | 0,2 M MOPS<br>10 mM Na-Acetat<br>10 mM EDTA   |
| PBS (10x)                                    | 80 g NaCl<br>2 g KCl<br>14,4 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O<br>2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>   |
| PBST (10x)                                   | 1% Tween 20 in 1 x PBS  |
| Pfu-Polymerase-Puffer (10x)                  | Promega, Mannheim   |
| Ponceau S – Färbelösung                      | 0,2 g Ponceau S<br>5 ml Essigsäure<br>H <sub>2</sub> O ad 100 ml  |
| RNA-Ladepuffer 5x                            | 16µl Bromphenolblau, gesättigt<br>80µl 500 mM EDTA, pH 8,0<br>720µl Formaldehyd 37%<br>2ml Glycerol<br>3084µl Formamid<br>4 ml 10 x MOPS<br>+ 100µl Rnase-freies H <sub>2</sub> O |
| Tunicamycin                                  | 10 mg/ml in H <sub>2</sub> O  |
| Sammelgelpuffer für SDS-Page<br>(Upper Tris) | 0,5M Tris, pH 6,8<br>0,4% SDS<br>pH 6,8   |
| Shrimp-Alkaline-Phosphatase-Puffer           | Roche Diagnostics, Mannheim   |

---

|  |  |
|--|--|
| SSC 20x  | 3M NaCl  |
|  | 0,3M Na <sub>3</sub> -citrat                           |
| T4-DNA-Ligase-Puffer (10x)                           | MBI Fermentas, St. Leon-Rot                            |
| TAE-Puffer (50x)                                     | 2 M Tris-Base  |
|  | 57,1 ml Eisessig                                       |
|  | 50 mM Na <sub>2</sub> EDTA x 2H <sub>2</sub> O, pH 8,0 |
|  | H <sub>2</sub> O ad 1000 ml                            |
| TE-Puffer  | 10 mM Tris/HCl, pH 7,5                                 |
|  | 1 mM EDTA, pH 8,0                                      |
| TELT   | 50 mM Tris/HCl   |
|  | 62,5 mM EDTA   |
|  | 0,4% Triton X-100                                      |
|  | 2,5 M LiCl   |
| TFB1-Puffer  | 30 mM K-Acetat   |
|  | 100 mM RbCl  |
|  | 10 mM CaCl <sub>2</sub>                                |
|  | 50 mM MnCl <sub>2</sub>                                |
|  | 15% Glycerol   |
|  | pH 5,8   |
| TFB2-Puffer  | 10 mM MOPS   |
|  | 75 mM CaCl <sub>2</sub>                                |
|  | 10 mM RbCl   |
|  | 15% Glycerol   |
|  | pH 6,5   |
| Transferpuffer für Western Blot                      | 20 mM Tris-Base  |
|  | 150 mM Glycin  |
|  | 0,01% SDS  |
|  | 20% Methanol   |
| Trenngelpuffer für SDS-Page<br>( <i>Lower Tris</i> ) | 1,5M Tris, pH 8,8                                      |
|  | 0,4% SDS   |
|  | pH 8,8   |

## 2.4. Kits

|  |                                      |
|--|--------------------------------------|
| ECL RPN 2106   | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg |
| QIAprep Spin Plasmidextraktionskit<br>Mini/Maxi          | Qiagen, Hilden                       |
| QIAquick Gelextraktionskit                               | Qiagen, Hilden                       |
| QIAquick PCR-Reinigungs-<br>kit                          | Qiagen, Hilden                       |
| RNeasy Minikit   | Qiagen, Hilden                       |
| TNT T7 Quick Coupled<br>Transcription/Translation System | Promega, Mannheim                    |

## 2.5. Medien

|   |  |
|---|--|
| <i>Dulbecco's Modified</i>                          | Invitrogen, Karlsruhe  |
| <i>Eagle's Medium</i> (DMEM)                        |  |
| <i>Minimal Essential Medium</i> (MEM)               | Invitrogen, Karlsruhe  |
| <i>Minimal Essential Medium</i><br>ohne L-Methionin | Invitrogen, Karlsruhe  |
| OPTIMEM 1   | Invitrogen, Karlsruhe  |
| LB-Medium   | 1% NaCl<br>1% Bacto Trypton<br>0,5% Hefeextrakt<br>Ampicillin wird nach dem Autoklavieren<br>(20 min 120 °C) in einer<br>Endkonzentration von 100 µg/ml<br>zugegeben |
| LB-Agar   | LB-Medium + 1,5% Bacto Agar<br>Ampicillin wird nach dem Autoklavieren<br>(20 min 120 °C) in einer<br>Endkonzentration von 100 µg/ml<br>zugegeben.                    |

## 2.6. Sonstige Materialien

|   |   |
|---|---|
| Deckgläschen                                      | neoLab, Heidelberg                              |
| Einmalkanülen Neolus 26G 0.45mm                   | Terumo, Tokyo. Japan                            |
| Einmalpipetten, steril                            | Nunc, Wiesbaden                                 |
| Einmal-Pasteurpipetten                            | neoLab, Heidelberg                              |
| Einmalspritzen Omnifix-F1ml                       | Braun, Melsungen                                |
| Einmalspritzen 50 ml                              | Becton Dickinson, Heidelberg                    |
| Expositionskassetten<br>für Röntgenfilme          | Fischer Scientific, Nidderau                    |
| Faltenfilter Ø 90 mm                              | Schleicher & Schüll, Dassel                     |
| Gelladespitzen Sørensen                           | Roth, Karlsruhe                                 |
| MultiFlex Round Tips                              |   |
| Objekträger 76 x 26 mm                            | neoLab, Heidelberg                              |
| Petrischalen                                      | Greiner, Frickenhausen                          |
| Pipettenspitzen für Gilson P-Serie                | Continental Lab Products, San Diego,<br>CA, USA |
| Polypropylen-Zentrifugenröhren<br>15 ml und 50 ml | Falcon, Heidelberg                              |
| Polysterol-Röhrchen, steril, 18 x 95 mm           | Greiner, Frickenhausen                          |
| Protran Nitrocellulose                            | Schleicher & Schüll, Dassel                     |
| Nucleinsäure- und Proteintransfer                 |   |
| Röntgenfilme Kodak Biomax MR                      | Sigma, Deisenhofen                              |
| <u>Reaktionsgefäße:</u>                           |   |
| Safe-Lock Micro Test Tubes<br>1,5ml und 2ml       | Eppendorf, Hamburg                              |
| Schraubdeckel – Reaktionsgefäße<br>1,5ml und 2ml  | Sarstedt, Nürnberg                              |
| PCR-Reaktionsgefäße 0,2ml                         | Abgene, Hamburg                                 |
| Skalpellschneide                                  | Bayha, Tuttlingen                               |
| Sterilfilter Millex <sup>□</sup> -HA 0,45µm       | Millipore, Eschborn                             |
| Sterilfilter Millex <sup>□</sup> -GS 0,22µm       | Millipore, Eschborn                             |

---

|   |                                   |
|---|-----------------------------------|
| Whatman Chromatographie-Papier<br>3MM Chr | Schleicher & Schüll, Dassel       |
| Zellkulturflaschen                        | BD Biosciences Falcon, Heidelberg |
| Zellkulturschalen Ø3,5cm                  | BD Biosciences Falcon, Heidelberg |
| Zellschaber                               | Corning Inc., Corning, NY, USA    |

## 2.7. Geräte

|  |   |
|--|---|
| Agarosegel-Elektrophoresekammern         | Zentralwerkstatt, Max-Planck-Institut,<br>Martinsried |
| Autoklav GE2606                          | Getinge Van Dilk, Straelen                            |
| Brutschränke                             | Heraeus, Hanau  |
| Filmentwickler X-Omat                    | Kodak, Stuttgart                                      |
| <u>Gefrierschränke:</u>                  |   |
| Forma Scientific Bio Freezer (-80°C)     | ThermoQuest, Egelsbach                                |
| AEG Öko-Arctis (-20°C)                   | AEG, Frankfurt am Main                                |
| Gelbetrachter                            | MWG Biotech, Ebersberg                                |
| Geltrockner SGD300                       | Savant, Holbrook, NY, USA                             |
| Kühlschrank AEG Öko Santo                | AEG, Frankfurt am Main                                |
| Kultur-Schüttler Forma Scientific 4518   | ThermoQuest, Egelsbach                                |
| <u>Mikroskope:</u>                       |   |
| Axiovert 25                              | Carl Zeiss, Göttingen                                 |
| Axiovert 200M<br>mit Software Axiovision | Carl Zeiss, Göttingen                                 |
| Leica TCSNT/DMIRB                        | Leica, Heerbrugg, Schweiz                             |
| Kühlschrank AEG Öko Santo                | AEG, Frankfurt am Main                                |
| Kultur-Schüttler Forma Scientific 4518   | ThermoQuest, Egelsbach                                |
| Mikrowelle M633                          | Samsung, Schwalbach                                   |
| <u>PCR-Geräte:</u>                       |   |
| T3 Thermocycler                          | Biometra GmbH, Göttingen                              |
| GeneAmp PCR-System 2400                  | Perkin Elmer, Shelton, CT, USA                        |
| pH-Meter                                 | Fischer Scientific, Nidderau                          |
| Phosphoimager FLA-2000                   | Fuji Photo Film, Düsseldorf                           |

---

|  |   |
|--|---|
| mit Software AIDA                          |   |
| Pipetten Gilson                            | Abimed, Langenfeld                                    |
| P2, P10, P20, P200, P1000                  |   |
| Pipettierhilfe pipet-aid Drummond          | Scientific, Broomall, PA, USA                         |
| Polyacrylamidgel-Elektrophorese-           | Pharmacia Biotech, Freiburg                           |
| kammer Hoefer SE600                        |   |
| mit Power Supply EPS                       |   |
| Reinstwasseranlage Milli-Q <sub>PLUS</sub> | Millipore, Eschborn                                   |
| Schwenktisch GFL 3017                      | Merck eurolab, Ismaning                               |
| Spektralphotometer DU-640                  | Beckmann, Unterschleissheim                           |
| Thermoblöcke                               | Zentralwerkstatt, Max-Planck-Institut,<br>Martinsried |
| Transferkammer Hoefer TE-Serie             | Pharmacia Biotech, Freiburg                           |
| mit Power Supply EPS 2A200                 |   |
| Überkopfmischer Heidolph REAX 2            | Merck eurolab, Ismaning                               |
| Ultraschallbad                             | Roth, Karlsruhe                                       |
| UV-Tisch Foto/UV 21                        | Fotodyne, Hartland, WI, USA                           |
| Vortex                                     | Bender & Hobein, Zürich, Schweiz                      |
| <u>Waagen:</u>                             |   |
| Laborwaage Mettler Toledo PB602            | Mettler-Toledo GmbH, Giessen                          |
| Analysenwaage Mettler Toledo AG285         | Mettler-Toledo GmbH, Giessen                          |
| Wasserbad MT                               | Roth, Karlsruhe                                       |
| Zählkammer, Neubauer                       | Merck eurolab, Ismaning                               |
| Zellkulturschränke                         | ThermoQuest, Egelsbach                                |
| Forma Scientific 3111                      |   |
| <u>Zentrifugen:</u>                        |   |
| Kühlzentrifuge GS-6R                       | Beckmann, Unterschleissheim                           |
| mit Rotor GH3.8                            |   |
| Kühlzentrifuge J2-21M                      | Beckmann, Unterschleissheim                           |
| mit Rotor JA-14                            |   |
| Tischzentrifuge Biofuge A                  | Heraeus, Hanau  |
| Tischzentrifuge Centrifuge 5415C           | Eppendorf, Hamburg                                    |
| Ultrazentrifuge TLX-120                    | Beckman, Unterschleissheim                            |
| mit Rotor TLA-120.2                        |   |

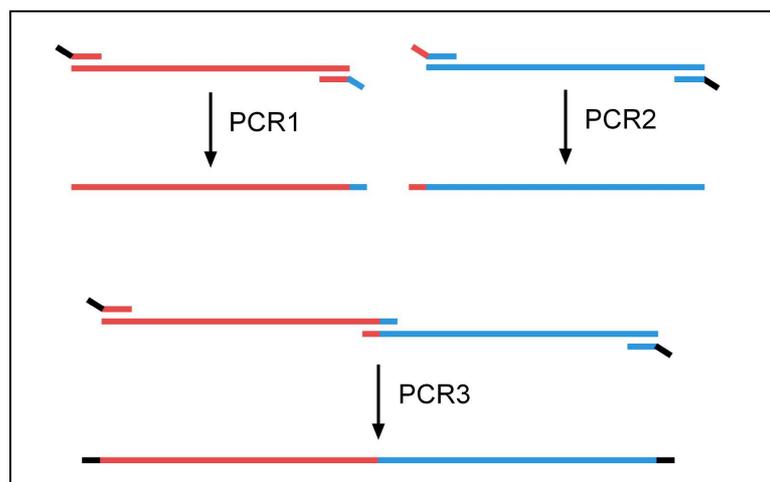
### 3. Methoden

#### 3.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) (Saiki *et al.* 1988) dient der selektiven Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels thermostabiler DNA-Polymerase und spezifischer Oligonukleotide (*Primer*).

##### 3.1.1. Rekombinante PCR

Um verschiedene Genabschnitte ohne das Einfügen von Restriktionsschnittstellen miteinander zu verknüpfen, wurde die rekombinante Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt (Higuchi 1990). Dabei werden in zwei getrennten Ansätzen Genfragmente mit *Primern* mit überlappender Sequenzhomologie amplifiziert (Abb. 9). Diese werden dann in einer zweiten Reaktion als Matrize eingesetzt, wobei die hybridisierenden Sequenzhomologien als innere *Primer* fungieren und beide Stränge der DNA vervollständigt werden. Die externen *Primer* sorgen für die Amplifikation des Produktes (Abb. 9). Durch die Wahl der internen *Primer* können Mutationen, Insertionen oder Deletionen in ein Gen eingefügt werden.



**Abbildung 9.** Klonierungsstrategie zur Verknüpfung zweier Genfragmente. (A) Die beiden zu verknüpfenden Fragmente werden separat per PCR amplifiziert. Dabei weisen die internen Primer am 5'-Ende jeweils Sequenzen des anderen Fragments auf. (B) In der folgenden PCR-Reaktion lagern sich die überlappenden Sequenzen aneinander und fungieren so als Primer. Fragmente mit der vollständigen Länge werden durch die externen Primer amplifiziert. Rot und Blau: Fragmente 1 bzw. 2; schwarz: nichthomologe Sequenzen für Restriktionsschnittstellen.

### 3.1.2. PCR-Bedingungen

Alle PCR-Reaktionen wurden mit dem vom Hersteller gelieferten Reaktionspuffer, 15 pmol *Primern*, je 0,25 mM dATP, dCTP, dGTP sowie dTTP, 50 ng Matrizen-DNA und 2,5 U Pfu-DNA-Polymerase durchgeführt. Nach einer einminütigen Denaturierungsphase bei 96°C wurde folgender Zyklus 28 mal wiederholt:

|                           |  |
|---------------------------|--|
| Denaturierung             | 96°C: 30 Sekunden  |
| <i>Primer</i> -Anlagerung | 48-60°C: 45 Sekunden (je nach Schmelztemperatur des <i>Primers</i> ) |
| Elongation                | 72°C: 2 Minuten pro Kilobasenpaare zu amplifizierender DNA-Länge     |

Abschließend wurde die Reaktion nochmals 10 Minuten bei 72°C inkubiert und dann bis zur weiteren Verarbeitung auf 4°C gekühlt.

### 3.1.3. Sequenzierungen

DNA-Sequenzierungen wurden nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.* 1977) von der Firma Medigenomix, Martinsried, durchgeführt.

### 3.1.4. Klonierung von verschiedenen PrP-Konstrukten

Zur Expression in N2a-Zellen und SH-SY5Y-Zellen wurden die PrP-Fragmente in den Vektor pcDNA3.1/ZEO(+), der unter der Kontrolle des CMV-Promotors steht, ligiert. Als Matrize diente das Plasmid pcDNA3.1-3F4, in dem PRND so modifiziert ist, dass es PrP mit den Mutationen L108M und V111M exprimiert. Diese Mutationen entsprechen den Aminosäuren des menschlichen PrP und erlauben eine Detektion des Proteins mit dem monoklonalen Antikörper 3F4 (Serban *et al.* 1990).

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die im Folgenden beschriebenen Konstrukte nach folgendem Schema hergestellt: Ausgehend vom Plasmid pcDNA3.1-3F4 wurde das N-terminale Fragment mit den Primern *HindIII*-5' und X-3' (wobei X für die jeweilige Konstruktbezeichnung steht) und das C-terminale Fragment mit den Primern

*KasI*-3' (bzw. *XhoI*-3') und X-5' amplifiziert. Die Fragmente wurden verknüpft und über die Schnittstellen *HindIII* und *KasI* (bzw. *XhoI*) in das Plasmid pcDNA3.1 ligiert.

Hierbei beziehen sich alle Aminosäureangaben auf die Sequenz von Maus-PrP.

#### **3.1.4.1. PrP mit deletierter Transmembrandomäne: $\square$ TM**

Hergestellt wurde das Konstrukt unter Verwendung der Primerpaare *HindIII*-5' /  $\square$ TM-PrP-3' und *KasI*-3' /  $\square$ TM-PrP-5' (siehe 3.1.4).

Bei der Mutante  $\square$ TM ist die potentielle Transmembrandomäne deletiert. Dies entspricht einer Deletion der Aminosäuren 113-133.

#### **3.1.4.2. PrP ohne GPI-Anker: $\square$ GPI bzw. S230Stop**

Hergestellt wurde das Konstrukt unter Verwendung der Primerpaare *HindIII*-5' /  $\square$ gpi-3' und *KasI*-3' /  $\square$ gpi-5' (siehe 3.1.4).

Das Konstrukt kodiert wt PrP ohne die GPI-Anker-Erkennungssequenz bis zur Aminosäure 229.

#### **3.1.4.3. PrP mit mutierter GPI-Anker-Erkennungssequenz: mtGPI**

Hergestellt wurde das Konstrukt unter Verwendung der Primerpaare *HindIII*-5' / mtGPI-3' und *KasI*-3' / mtGPI-5' (siehe 3.1.4).

An der  $\square$ -Site des GPI-Ankers wurden die Serine an den Stellen 229-231 durch Threonine ersetzt. Dadurch kann die GPI-Anker-Erkennungssequenz nicht mehr erkannt werden (Nuoffer *et al.* 1993) und es entsteht ein Konstrukt mit gleicher Länge wie wtPrP, das jedoch keinen funktionellen GPI-Anker besitzt.

#### **3.1.4.4. PrP mit heterologem CD4-Anker**

Ausgehend vom Plasmid pcDNA3.1-CD4-flag, welches einen Flag-Tag enthält, wurde ein den CD4-Anker enthaltendes Fragment mittels der Primer *BstEII*-5' und *XhoI*-3' amplifiziert. Über die Schnittstellen *BstEII* und *XhoI* wurde das Fragment in das Plasmid pcDNA3.1 ligiert.

Anstatt des GPI-Ankers enthält dieses Konstrukt den C-terminalen Membrananker des T-Zell-Oberflächenproteins CD4 der Maus.

#### **3.1.4.5. PrP mit deletiertem $\beta$ 1-Faltblatt und Helix1: $\beta$ H1**

Hergestellt wurde das Konstrukt unter Verwendung der Primerpaare *Hind*III-5' /  $\beta$ H1-3' und *Kas*I-3' /  $\beta$ H1-5' (siehe 3.1.4).

In diesem Konstrukt ist die erste  $\beta$ -Helix und das zweite  $\beta$ -Faltblatt deletiert, was einer Deletion der Aminosäuren 141-171 entspricht.

#### **3.1.4.6. PrP mit deletierter Helix 1: $\beta$ H1\***

Hergestellt wurde das Konstrukt unter Verwendung der Primerpaare *Hind*III-5' /  $\beta$ H1\*-3' und *Kas*I-3' /  $\beta$ H1\*-5' (siehe 3.1.4).

Im Gegensatz zu dem Konstrukt  $\beta$ H1 wurde hier ausschließlich die erste Helix deletiert, was einer Deletion der Aminosäuren 141-156 entspricht.

#### **3.1.4.7. PrP mit Punktmutation zur Destabilisierung der Helix1: M204S und M204R**

##### **M204S**

Hergestellt wurde das Konstrukt unter Verwendung der Primerpaare *Hind*III-5' / M204S-3' und *Kas*I-3' / M204S-5' (siehe 3.1.4).

Die unpolare Aminosäure Methionin an Stelle 204 wurde durch die ungeladene polare Aminosäure Serin ersetzt. Dadurch wird die Helix 1 destabilisiert (siehe Kapitel 4.2.5.), wobei die Länge dieses Konstrukts der von wt PrP entspricht.

##### **M204R**

Hergestellt wurde das Konstrukt unter Verwendung der Primerpaare *Hind*III-5' / M204R-3' und *Kas*I-3' / M204R-5' (siehe 3.1.4).

Die unpolare Aminosäure Methionin an Stelle 204 wurde durch die basische Aminosäure Arginin ersetzt. Dadurch wird die Helix 1 destabilisiert (siehe Kapitel 4.2.5.), wobei die Länge dieses Konstrukts der von wt PrP entspricht.

#### **3.1.4.8. PrP Mutante ohne GPI-Anker: M204S $\beta$ GPI**

Analog des Konstrukts M204S wurde das Plasmid M204S $\beta$ GPI hergestellt. Als Matrize diente hier das Plasmid  $\beta$ GPI.

Somit hat dieses Plasmid keine GPI-Anker-Erkennungssequenz, beinhaltet jedoch auch die Helix 1 destabilisierende Punktmutation.

### 3.1.4.9. PrP mit deletiertem N-Terminus: $\square$ N

Hergestellt wurde das Konstrukt unter Verwendung der Primerpaare *HindIII*-5' /  $\square$ N-3' und *KasI*-3' /  $\square$ N-5' (siehe 3.1.4).

Hier wurden die Aminosäuren 27 bis einschließlich 89 deletiert; dies entspricht dem gesamten unstrukturierten Teil des Prion Proteins.

### 3.1.4.10. PrP mit deletiertem N-Terminus und deletierter Helix 1: $\square$ N $\square$ H1

Ausgehend vom Plasmid  $\square$ N wurde das N-terminale Fragment mit den Primern *HindIII*-5' und  $\square$ H1-3' und das C-terminale Fragment mit den Primern *KasI*-3' und  $\square$ H1-5' amplifiziert. Die Fragmente wurden verknüpft und über die Schnittstellen *HindIII* und *KasI* in das Plasmid  $\square$ N ligiert.

In  $\square$ N $\square$ H1 ist sowohl der unstrukturierte N-Terminus als auch die erste  $\square$ -Helix und das zweite  $\square$ -Faltblatt deletiert.

Dieses Konstrukt wird auch als PrP 106 bezeichnet, die kürzeste bisher gefundene infektiöse Mutante (Supattapone *et al.* 1999).

### 3.1.4.11. C-terminal verkürzte PrP-Konstrukte: P101Stop, A115Stop, W144Stop und Q159Stop

#### P101Stop

Hergestellt wurde das Konstrukt unter Verwendung der Primerpaare *HindIII*-5' / P101Stop-3' und *XhoI*-3' / P101Stop-5' (siehe 3.1.4).

In diesem Konstrukt ist der gesamte C-terminale strukturierte Teil des PrP einschließlich des Stop Transfer Elements STE (Aminosäure 106-112) deletiert.

#### A115Stop

Hergestellt wurde das Konstrukt unter Verwendung der Primerpaare *HindIII*-5' / A115Stop-3' und *KasI*-3' / A115Stop-5' (siehe 3.1.4).

Dieses Konstrukt kodiert PrP von den Aminosäuren 1-114; somit ist nur die unstrukturierte Domäne des PrPs erhalten.

#### W144Stop

Hergestellt wurde das Konstrukt unter Verwendung der Primerpaare *HindIII*-5' / W144Stop-3' und *KasI*-3' / W144Stop-5' (siehe 3.1.4).

Dieses Plasmid kodiert PrP bis zur Aminosäure 143. Hierbei handelt es sich um das Maus-Äquivalent von einer beschriebenen humanpathogenen Mutante, welche mit GSS in Verbindung gebracht wird: W145Stop (Kitamoto *et al.* 1993).

#### **Q159Stop**

Hergestellt wurde das Konstrukt unter Verwendung der Primerpaare *HindIII*-5' / Q159Stop-3' und *XhoI*-3' / Q159Stop-5' (siehe 3.1.4).

Dieses Plasmid kodiert PrP bis zur Aminosäure 158. Auch hierbei handelt es sich um das Maus-Äquivalent von einer humanpathogenen Mutante des PrPs: Q160Stop (Finckh *et al.* 2000).

#### **3.1.4.12. PrP mit zytosolischer Lokalisierung: Zyto-A115Stop, Zyto-W144Stop, Zyto-Q159Stop, Zyto-S230Stop**

Um das Maus-PrP in das Zytosol zu dirigieren, wurde die Signalsequenz (Aminosäure 2-22) deletiert.

Das N-terminale Fragment wurde mit den Primern *HindIII*-5' und  $\square$ 2-22-3' und das C-terminale Fragment mit den Primern *XhoI*-3' und  $\square$ 2-22-5', ausgehend von dem jeweiligen Plasmid (A115Stop, W144Stop, etc.) amplifiziert. Die Fragmente wurden verknüpft und über die Schnittstellen *HindIII* und *XhoI* in das jeweilige Plasmid ligiert.

#### **3.1.4.13. A115Stop mit der Signalsequenz des Wachstumshormons der Ratte: WH-A115Stop**

Ausgehend vom Plasmid A115Stop wurde ein Fragment mit den Primern WH-SS-5a' (welcher den C-terminalen Teil der Signalsequenz des Wachstumshormons der Ratte enthält) und *XhoI*-3' amplifiziert. Das entstandene Fragment diente als Matrize und das Insertfragment wurde mit dem Primer WH-SS-5b' (welcher den N-terminalen Teil der Signalsequenz des Wachstumshormons der Ratte kodiert) und *XhoI*-3' amplifiziert. Das entstandene Insert wurde über die Schnittstellen *HindIII* und *XhoI* in das Plasmid A115Stop ligiert.

Dieses Plasmid enthält anstatt der Signalsequenz des PrP die Signalsequenz des Wachstumshormons der Ratte und kodiert PrP bis zur Aminosäure 114.

### 3.1.4.14. PrP mit verkürztem N-Terminus und ohne GPI-Anker: □N/S230Stop und □27-156/S230Stop

#### □N/S230Stop

Ausgehend vom Plasmid S230Stop (entspricht □GPI) wurde das N-terminale Fragment mit den Primern *HindIII*-5' und □□-3' und das C-terminale Fragment mit den Primern *KasI*-3' und □N-5' amplifiziert. Die Fragmente wurden verknüpft und über die Schnittstellen *HindIII* und *KasI* in das Plasmid S230Stop ligiert.

Bei diesem Konstrukt ist zusätzlich zu der GPI-Anker-Signalsequenz der gesamte unstrukturierte Teil des PrP deletiert.

#### □27-156/S230Stop

Ausgehend vom Plasmid S230Stop (entspricht □GPI) wurde das N-terminale Fragment mit den Primern *HindIII*-5' und □27□156-3' und das C-terminale Fragment mit den Primern *KasI*-3' und □27-156-5' amplifiziert. Die Fragmente wurden verknüpft und über die Schnittstellen *HindIII* und *KasI* in das Plasmid S230Stop ligiert.

Bei diesem Konstrukt ist zusätzlich zu der GPI-Anker-Signalsequenz und dem gesamten unstrukturierten Teil des PrP noch die Transmembrandomäne und die erste Helix deletiert.

## 3.2. Bakterienkultur

### 3.2.1. Herstellung kompetenter Bakterien

Um Zellen von *E.Coli* (*Escherichia Coli*) zur Aufnahme von DNA zu befähigen, wird eine Kultur bis zur logarithmischen Phase angezogen und mit divalenten Kationen behandelt, um die Zellwand zu destabilisieren (Sambrook *et al.* 1989).

Zunächst wurde eine Vorkultur (2 ml *Luria Broth* (LB) -Medium) mit einer Bakterienkolonie des *E.Coli* - Stammes DH5□ beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Der Ansatz wurde anschließend in 250 ml LB-Medium gegeben und 2-3 h

lang bei 37°C kultiviert bis der OD<sub>590</sub>-Wert zwischen 0,4 und 0,6 lag. Die Kultur wurde 5 min lang bei 4°C und 3750 rpm zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 100 ml eiskalten TFB1-Puffer resuspendiert, die Suspension 5 min lang auf Eis inkubiert und anschließend 5 min lang bei 4°C und 3750 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml kaltem TFB2-Puffer resuspendiert und 15-60 min lang auf Eis inkubiert. Abschließend wurde die Bakteriensuspension aliquotiert (100µl/Reaktionsgefäß), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### **3.2.2. Transformation kompetenter Bakterien**

Die Transformation (Sambrook *et al.* 1989) dient der Aufnahme und Amplifikation von Plasmiden durch *E.Coli*.

Tiefgefrorene Aliquots kompetenter Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. 10 µl Ligationsansatz bzw. Plasmid-DNA (100 bis 1000 ng) wurde mit 100µl Bakteriensuspension vermischt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Suspension 90 Sekunden bei 42°C inkubiert (Hitzeschock) und anschließend 5 min lang auf Eis gestellt.

Nach Zugabe von 800 µl antibiotikafreiem LB-Medium wurden die Kulturen 1 h lang bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien in unterschiedlichen Konzentrationen auf ampicillinhaltigen Agarplatten ausplattiert und 16-20 h lang bei 37°C inkubiert.

### **3.3. DNA-Präparation**

Plasmid-DNA wurde mit Hilfe von Qiagen-Mini-Kit bzw. Qiagen-Maxi-Kit nach Angaben des Herstellers Qiagen hergestellt.

### **3.4. Zellkultur**

#### **3.4.1. Kultivierung von Zellen**

Murine und humane Neuroblastomzellen wurden als adhärenter Einzelzellrasen kultiviert.

Murine Neuroblastomzellen (N2a) wurden in MEM (*Minimal Essential Medium*) unter Zusatz von 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum und 1% Antibiotika-Lösung (Endkonzentration: 1U/ml Penicillin G, 1µg/ml Streptomycin und 2 mM Glutamin) in Zellkulturschalen bzw. -flaschen bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

Humane Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) wurden in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) unter Zusatz von 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum und 1% Antibiotika-Lösung (Endkonzentration: 1U/ml Penicillin G, 1µg/ml Streptomycin und 2 mM Glutamin) in Zellkulturschalen bzw. -flaschen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

Die Kulturen wurden alle fünf Tage passagiert (siehe 3.4.2.), wobei die Zellen 1:8 und 1:16 gesplittet wurden.

#### **3.4.2. Passagierung**

Nach Abziehen des Kulturmediums wurden die Zellen einer 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche zweimal mit 5 ml PBS -/- (*Phosphate Buffered Saline*) gespült und anschließend mit 0,5 ml Trypsin (0,5 g/l Trypsin) einige Minuten lang inkubiert. Die Zellen wurden leicht von ihrer Unterlage abgeklopft, in 8 ml vorgewärmtem Vollmedium sorgfältig resuspendiert und im gewünschten Verhältnis aufgeteilt. Nach Zusatz von Vollmedium (ad 5 ml Gesamtvolumen) wurden die Zellen bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 3.4.3. Ausplattieren

Ein Aliquot der mit Trypsin gelösten Zellen (siehe 3.4.2.) wurde in einer Neubauer-Kammer gezählt.

Murine Neuroblastomzellen wurden in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen auf 3,5 cm-Schalen bzw. in einer Dichte von  $2,6 \times 10^6$  Zellen auf 6 cm-Schalen ausplattiert. Humane Neuroblastomzellen hingegen wurden in einer Dichte von  $5 \times 10^5$  Zellen auf 3,5 cm-Schalen ausplattiert.

Zellen, die zur Immunfluoreszenz verwendet wurden, wurden dünner ausplattiert, um einzelne Zellen besser sehen zu können. In diesem Fall wurden  $0,7 \times 10^6$  Zellen (N2a) bzw.  $0,4 \times 10^6$  Zellen (SH-SY5Y) auf 3,5 cm-Schalen, welche ein Deckgläschen mit einem Durchmesser von 18 mm enthielten, ausplattiert.

### 3.4.4. Transfektion

24 Stunden nach dem Ausplattieren der Zellen wurden diese zweimal mit MEM gewaschen und mit  $1 \mu\text{g}$  Plasmid-DNA mit dem Transfektions-Kit Lipofectamine plus nach Angaben des Herstellers Invitrogen transfiziert. Nach 3 Stunden Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\% \text{CO}_2$  wurde 1ml Vollmedium zugesetzt.

### 3.4.5. Ernte

24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen geerntet. Hierzu wurden die Zellen zweimal mit PBS-/- gewaschen und mit PBS-/- mit Hilfe eines Zellschabers abgeschabt. Die Zellen wurden für 20 Sekunden bei 13000 rpm abzentrifugiert, das Zellpellet auf Eis gestellt und entsprechend weiterverarbeitet.

### **3.5. Proteinpräparation und –analyse**

#### **3.5.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Proteine wurden durch eindimensionale, diskontinuierliche SDS-PAGE aufgetrennt (Laemmli 1970). Je nach der Größe des interessierenden Proteins wurde eine Polyacrylamid-Konzentration von 12% oder 15% für das Trenngel und 4% für das Sammelgel verwendet. Die Elektrophorese wurde mit 150-250 V in einer Hoefer-SE600-Kammer durchgeführt.

#### **3.5.2. Proteintransfer auf Nitrocellulose (*Western Blot*)**

Proteine wurden zum Zwecke der Immundetektion (siehe 3.5.3.) mit Transferpuffer auf Nitrozellulose-Membranen der Porengröße 0,45  $\mu$ m transferiert (Towbin *et al.* 1979). Der Transfer erfolgte für 2 h bei einer festen Stromstärke von 1 A bei 4°C.

#### **3.5.3. Immundetektion von Proteinen**

Die Immundetektion wurde mit dem *Enhanced Chemiluminescence* (ECL)-System nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Membranen wurden eine Stunde in PBST (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1% Tween-20) mit 5% Milchpulver bei Raumtemperatur blockiert und über Nacht bei 4°C mit den angegebenen Endkonzentrationen der primären Antikörper bzw. Antiseren inkubiert. Die Membranen wurden dreimal 10 min mit PBST gewaschen und 40 min mit dem sekundären Antikörper Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelte Schaf-Anti-Maus oder Esel-Anti-Kaninchen, 1:5000 Verdünnung in PBST inkubiert. Die Membranen wurden dreimal 10 min mit PBST gewaschen und 1 min mit ECL inkubiert. Die Visualisierung der Signale erfolgte durch Exposition eines Röntgenfilms.

### 3.5.4. Nachweis der Löslichkeit

Das Zellpellet (siehe 3.4.5.) wurde in Detergenzpuffer resuspendiert (Zelllysate), 5 Minuten lang auf Eis inkubiert und 20 Minuten lang bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Sowohl der Überstand als auch das Pellet wurden in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und 10 Minuten lang bei 100°C inkubiert. Die genomische DNA wurde durch mehrmaliges Aufziehen der Probe in eine 1 ml-Einwegspritze mit einer 26G-Kanüle geschert. Die Proben wurden auf einem SDS-Gel analysiert.

### 3.5.5. Nachweis der Protease-Resistenz

Zum Nachweis der Protease-Resistenz wurde Zelllysate mit Proteinase K (PK) 1:100 versetzt und eine Stunde auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von PMSF (Endkonzentration: 1 mM) gestoppt. Die Proben wurden mit Laemmli-Probenpuffer versetzt und auf einem SDS-Gel analysiert.

### 3.5.6. Nachweis der Glykosylierung

#### Blockierung von Glykosylierungsenzymen

Um den Glykosylierungszustand der Proben zu bestimmen, wurden bestimmte Enzyme zugesetzt, welche die Glykosylierung hemmen.

So wurde das Enzym  $\alpha$ -Mannosidase 1 unter Verwendung des Inhibitors Desoxymannojirimycin (DMJ) gehemmt. Hierfür wurde DMJ in einer Konzentration von 10  $\mu$ g/ml zu den transfizierten Zellen während des Hungerns und der radioaktiven Markierung gegeben.

Um ER-Glykosidasen zu hemmen, wurde Castanospermin (CSP) in einer Konzentration von 10  $\mu$ g/ml zu den transfizierten Zellen während des Hungerns und der radioaktiven Markierung gegeben.

**Endo H Verdau**

Um Proteine auf Asparagin-gekoppelte Glykosylierung zu testen, wurde ein enzymatischer Verdau mit Endoglykosidase H nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Dazu wurde ein Aliquot des Überstandes (siehe 3.5.4.) mit Denaturierungspuffer versetzt, 10 min gekocht und dann auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von Reaktionspuffer und Enzym wurde die Probe eine Stunde bei 37°C inkubiert, mit Laemmli-Probenpuffer versetzt und auf einem SDS-Gel analysiert.

**3.5.7. Nachweis von Oberflächenproteinen**

Um zu bestimmen, ob das Protein an der Plasmamembran lokalisiert ist, wurde ein Trypsin-Verdau durchgeführt. Hierfür wurde auf eine mit PBS-/- gewaschene transfizierte Zellschale 500  $\mu$ l Trypsin gegeben. Sobald sich die Zellen lösten, wurden die Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt, die Schale mit 500  $\mu$ l Trypsin-Inhibitor nachgewaschen und mit den Zellen vereinigt. Die Zellen wurden für 20 Sekunden bei 13000 rpm abzentrifugiert und das Zellpellet mit Trypsin-Inhibitor gewaschen. Das Zellpellet wurde in Lysepuffer resuspendiert und wie in Kapitel 3.5.4. beschrieben weiterverarbeitet.

**3.5.8. Untersuchung der Membranverankerung**

Zur Bestimmung der Art der Membranverankerung wurde ein Phosphatidylinositol-Phospholipase C (PIPLC) -Verdau durchgeführt. PIPLC schneidet selektiv den GPI-Anker ab. Hierfür wurden die Zellen zweimal mit PBS-/- gewaschen und mit 0,5 units/ml PIPLC in PBS-/- versetzt. Die Zellschalen wurden 2 Stunden lang bei 4°C geschwenkt. Der Überstand wurde abgenommen und die Proteine mittels einer TCA-Fällung gefällt (siehe 3.5.10.). Die Zellen wurden zweimal mit PBS-/- gewaschen, geerntet (siehe 3.4.5.) und wie in Kapitel 3.5.4. beschrieben analysiert.

Für den PIPLC-Verdau im Extrakt wurden die Zellen geerntet (siehe 3.4.5.) und in 0,1% Triton X-100 in PBS-/- lysiert. PIPLC wurde zu dem Zellextrakt gegeben, 1 Stunde lang auf Eis inkubiert und anschließend 20 Minuten lang bei 13000 rpm und

4°C zentrifugiert. Der Überstand als auch das Pellet wurden in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und 10 Minuten lang bei 100°C inkubiert. Die genomische DNA wurde durch mehrmaliges Aufziehen der Probe in eine 1 ml-Einwegspritze mit einer 26G-Kanüle geschert. Die Proben wurden auf einem SDS-Gel analysiert.

### **3.5.9. Nachweis der Sekretion**

Um festzustellen, ob das Protein in den Zellkulturüberstand sekretiert wird, wurden die Zellen zweimal mit MEM gewaschen und anschließend mit 1 ml MEM für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde abgenommen und die vorhandenen Proteine mit TCA (*trichloroacetic acid*) (siehe 3.5.10.) gefällt.

### **3.5.10. TCA-Fällung**

Die Proben wurden mit 1/10 Volumen 50%TCA-Lösung versetzt und 10 Minuten lang auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 10 Minuten bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde zweimal mit Aceton gewaschen, an der Luft getrocknet und in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen.

### **3.5.11. Nachweis der Wiederaufnahme von sekretierten Proteinen**

Transfizierte Zellen wurden zweimal mit MEM gewaschen und 3 Stunden lang bei 37°C in 1 ml MEM inkubiert. Der Zellmediumüberstand, in welches die Proteine sekretiert sind, wurde abgenommen und auf untransfizierte Zellen gegeben. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C wurden die Zellen geerntet (siehe 3.4.5.), lysiert und in eine lösliche und unlösliche Fraktion aufgetrennt (siehe 3.5.4.).

### 3.5.12. Indirekte Immunfluoreszenz

Transfizierte Zellen wurden mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz auf die Expression bestimmter transfizierter Konstrukte hin untersucht.

Beim Ausplattieren (siehe 3.4.3.) der Zellen enthielten die Schalen Glasplättchen ( $\varnothing$  18 mm), die vorher mit absolutem Ethanol gespült und abgeflammt worden waren. Am folgenden Tag wurden die Zellen transfiziert (siehe 3.4.4.). Einen Tag nach der Transfektion wurden die Glasplättchen entnommen, 2x mit PBS +/- gewaschen und 5 min lang in Methanol ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) fixiert. Die Plättchen wurden auf Whatman-Papier an der Luft getrocknet und danach für die Immunreaktion verwendet. Zum Rehydrieren wurden die Gläschen 3 min lang mit PBS +/- ( $4^{\circ}\text{C}$ ) benetzt. Je 80  $\mu\text{l}$  einer geeigneten Erstantikörper-Verdünnung (1:200 in PBS +/-, 1% BSA (*bovine serum albumin*)) wurden luftblasenfrei auf die Glasplättchen pipettiert. Diese wurden 60 min lang bei  $37^{\circ}\text{C}$  in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend 3 x 3 min in PBS +/- ( $4^{\circ}\text{C}$ ) gewaschen. Nun wurden je 80  $\mu\text{l}$  eines geeigneten Fluoreszenz-markierten Zweitantikörpers (1:200 in PBS +/-, 1% BSA) luftblasenfrei auf die Plättchen getropft. Nach 30-minütiger Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  wurden die Präparate 3 x 3 min in PBS +/- ( $4^{\circ}\text{C}$ ) gewaschen und auf einem Objektträger eingebettet. Nach mindestens 16-stündiger Aushärtung unter Lichtschutz bei Raumtemperatur wurden die Proben unter dem Mikroskop ausgewertet. Die Proben wurden bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.5.13. Nachweis der intrazellulären Lokalisierung

Die intrazelluläre Lokalisierung von Proteinen wurde mit einer modifizierten Renografin-Dichtegradientenzentrifugation untersucht (Schandel und Jenness 1994; Wang und Chang 1999; Heller *et al.* 2003). Je drei 6 cm-Schalen mit transfizierten Zellen wurden geerntet (siehe 3.4.5.) und die Zellpellets vereint. Das Pellet wurde in 600  $\mu\text{l}$  TE-Puffer mit Compete Protease-Inhibitor-Tablette (1/2 Compete Protease-Inhibitor-Tablette in 15 ml TE-Puffer) aufgenommen, auf Trockeneis eingefroren und anschließend bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Nach Zusatz von 1  $\mu\text{l}$  Benzonase und 10-minütiger Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  wurde 1 Minute bei 500 rpm zentrifugiert, um Zellkerne und unlysierte Zellen abzutrennen. 500  $\mu\text{l}$  des

Lysates wurden mit 500  $\mu$ l Renografin 76 (66% Meglumin-Diatrizoat, 10% Na-Diatrizoat, in TE, pH=7,6) vermischt und in einem Zentrifugenröhrchen platziert. Die Probe wurde sodann mit jeweils 1 ml 34%, 30%, 26% und 22% Renografin (Verdünnungen von Renografin 76 mit TE) überschichtet und 20 h mit 150.000 g, 4°C zentrifugiert. Von den Gradienten wurden 13 Fraktionen á 350  $\mu$ l von oben entnommen. Je 300  $\mu$ l der Fraktionen wurden mit 700  $\mu$ l TE verdünnt und 1h mit 100.000 g, 4°C zentrifugiert. Die Niederschläge wurden in 100  $\mu$ l Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und auf einem SDS-Gel analysiert.

### 3.5.14. Expression und Charakterisierung von rekombinantem PrP

Die Sequenzen von wtPrP und M204S-PrP wurden ampilfiziert und mittels PCR über die Schnittstellen *EheI* und *HindIII* in den Vector pPROX-HTa kloniert. Dadurch entstanden zusätzliche 6 N-terminale Histidine. Transformierte *Escherichia Coli* DH5 $\alpha$  wurden bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0.6 wachsen gelassen und die Proteinexpression wurde für 3 Stunden durch die Zugabe von 0.5 mM Isopropyl-1-thio-b-D-galactopyranosid induziert. PrP wurde mit Hilfe einer Ni<sup>+</sup>-Säule unter denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff, 50 mM Tris, pH 8) gereinigt. Die Proteine wurden mit Elutionspuffer 1 eluiert und die Fraktionen, die PrP enthielten, wurden vereinigt. Um die Bildung von Disulfidbrücken anzuregen, wurden die Proteine auf eine Konzentration von 0,1 mg/ml verdünnt und über Nacht mit Kupfersulfat als Katalysator (Hornemann *et al.* 1997) luftoxidiert. Zur Aufkonzentrierung wurden die Proteine auf pH 8 eingestellt, über eine Ni<sup>+</sup>-Säule gebunden und mit Elutionspuffer 2 eluiert. Für den PK-Verdau wurden die Proteine für die angegebene Zeit mit 1  $\mu$ g/ml Proteinase K bei Raumtemperatur inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid. Die Proben wurden mit Laemmli-Probenpuffer versetzt, aufgekocht, auf einem SDS-Gel analysiert und mit Coomassie angefärbt.

### 3.5.15. Radioaktive Markierung

Einen Tag nach Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 30 min in Markierungsmedium (MEM ohne Methionin, 1x PenStrepGlu) inkubiert, um vorhandenes Methionin (Met) aufzubauchen. Das Medium wurde abgenommen und durch 500  $\mu$ l frisches Markierungsmedium mit [<sup>35</sup>S]-Met (ProMix, 150  $\mu$ Ci/ml) ersetzt. Nach 30 min Markierung wurden die Zellen zweimal mit MEM gewaschen. Die zur Bestimmung der während der *pulse*-Phase synthetisierten Proteine vorgesehene Schale wurde in Lysepuffer (PBS, 0,5% Triton X-100, 0,5% DOC, Complete Protease-Inhibitor) gerntet (*pulse*-Proben). Die anderen Schalen wurden für die angegebene Zeit mit Vollmedium inkubiert und dann wie oben lysiert (*chase*-Proben). Die Proben wurden auf eine Endkonzentration von 0,5% Sarkosyl gebracht. Es folgte eine Immunpräzipitation.

### 3.5.16. Immunpräzipitation (IP)

Die Zelllysate wurden bei 20.000 g, 4°C für 20 min zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Gefäß überführt. Es wurden 1  $\mu$ l Antikörper/Antiserum zugefügt und über Nacht bei 4°C in einem Überkopf-Dreher inkubiert.

Um die Protein/Antikörper-Komplexe zu isolieren, wurden 30  $\mu$ l einer zweimal in IP-Puffer gewaschenen ProteinA-Trisacryl-Matrix zugefügt und die Inkubation bei 4°C für weitere 90 min in einem Überkopf-Dreher fortgesetzt. Die Komplexe wurden dann bei 20.000 g für 20 sec abzentrifugiert, zweimal mit IP-Puffer gewaschen und in 50  $\mu$ l Laemmli-Probenpuffer 10 min gekocht. Je 30  $\mu$ l der Probe wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen.

### **3.5.17. Behandlung mit proteasomalen Inhibitor**

Um das Proteasom zu hemmen, wurden die Zellen mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 (Tsubuki *et al.* 1993) behandelt. Hierzu wurde MG132 in einer Konzentration von 50  $\mu\text{mol/ml}$  (in DMSO) während des Hungerns und der radioaktiven Markierung zu den Zellen gegeben.

### **3.5.18. Autoradiodiagramme**

Gele mit radioaktiv markierten Proteinen wurden 30 min fixiert (40% Methanol, 7% Essigsäure) und 30 min mit Amplify inkubiert. Auf einem Whatman-Papier wurden sie dann in einem Gelrockner für 1 h bei 72°C unter Vakuum getrocknet. Die markierten Proteine wurden durch Exposition eines Röntgenfilms oder mittels Phosphoimaging (siehe 3.5.19.) visualisiert.

### **3.5.19. Phosphoimaging**

Eine computergestützte Visualisierung und Quantifizierung radioaktiv markierter Proteine wurde mittels Phosphoimaging durchgeführt. Auf die getrockneten Gele wurde für 2 bis 48 h ein Phosphoimaging-Schirm aufgelegt. Die Signale wurden von einem Phosphoimager (Fuji-FLA2000) ausgelesen und mit dem Programm AIDA (raytest) am Computer ausgewertet.

### **3.5.20. Quantifizierung der Immunpräzipitationsexperimente**

Die Proteinmenge, welche unter Zusatz von MG132 festgestellt werden konnte, wurde als 100% festgelegt. Hiervon ausgehend wurde der prozentuale Anteil der proteasomalen Degradierung errechnet. ER-Konstrukte mit zwei Formen (mit und ohne Signalsequenz) wurden separat analysiert.

### 3.5.21. In *Vitro* Translation und PK-Verdau

Die *In Vitro* Translation wurde mit dem TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega) gemäß den Anweisungen des Herstellers Promega durchgeführt. Sowie angedeutet, wurden *Canine Pancreatic Microsomal Membranes* (Promega) hinzugefügt. Nach einer 70-minütigen Translation bei 30°C wurden die Proben aufgeteilt; eine Hälfte wurde unbehandelt gelassen, während die andere Hälfte mit 0,5 mg/ml Proteinase K 1 Stunde lang auf Eis inkubiert wurde. Um diese Reaktion zu stoppen, wurden 2 mmol Phenylmethylsulfonylfluorid hinzugegeben. Die Proben wurden mit dem Antikörper A7 immunpräzipitiert (siehe 3.5.16.) und auf einem SDS-Gel analysiert.

### 3.5.22. RNA-Nachweis (*Northern Blot*)

Je Probe wurden 10 µg Gesamt-RNA in einem Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylon-Membran (Hybond N+) übertragen und mit UV-Licht fixiert. Die Membran wurde für mindestens 2 h bei 45°C in Hybridisierungspuffer (5x SSC, 10x Denhardt, 50% Formamid, 1% SDS, 1% BSA, 600 µg/ml Lachsspermien-DNA) prähybridisiert und über Nacht bei 45°C in Hybridisierungspuffer mit der Sonde hybridisiert. Die Sonde wurde nach den Angaben des Herstellers mit 50 ng DNA und 50 µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP mit dem Oligolabelling-Kit (Amersham) hergestellt. Die Membran wurde dann 3 mal 15 min bei 45°C in Waschpuffer I (2x SSC, 1% SDS, 50% Formamid) und 3 mal 10 min bei 60°C in Waschpuffer II (0,2x SSC, 1% SDS) gewaschen. Die Membran wurde auf ein Whatman-Papier gelegt, in Frischhaltefolie gewickelt und die Signale wurden mittels Autoradiografie visualisiert.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Bedeutung der C-terminalen Domäne des Prion Proteins für den Import in das Endoplasmatische Retikulum

Im ersten Teil dieser Arbeit wird untersucht, welche Kriterien für den effizienten Import des Prion Proteins in das Endoplasmatische Retikulum (ER) entscheidend sind.

Das Prion Protein kann an der ER-Membran in drei unterschiedlichen Topologien vorliegen. Neben der häufigsten Form, in der das Protein ganz in das ER-Lumen transloziert ist (<sup>Sec</sup>PrP) gibt es zwei weitere transmembrane PrP-Formen, welche an der Transmembrandomäne in die ER-Membran integriert sind (<sup>Ctm</sup>PrP und <sup>Ntm</sup>PrP) (siehe Kapitel 1.2.6.). Die Anteile der verschiedenen Topologien werden durch Mutationen im PrP moduliert, die entweder in der Nähe der Transmembrandomäne (Hegde *et al.* 1998b) oder auch in der ER-Signalsequenz liegen (Hegde *et al.* 1998b; Kim *et al.* 2001). Es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von <sup>Ctm</sup>PrP zu einer Neurodegeneration führt (Hegde *et al.* 1998a).

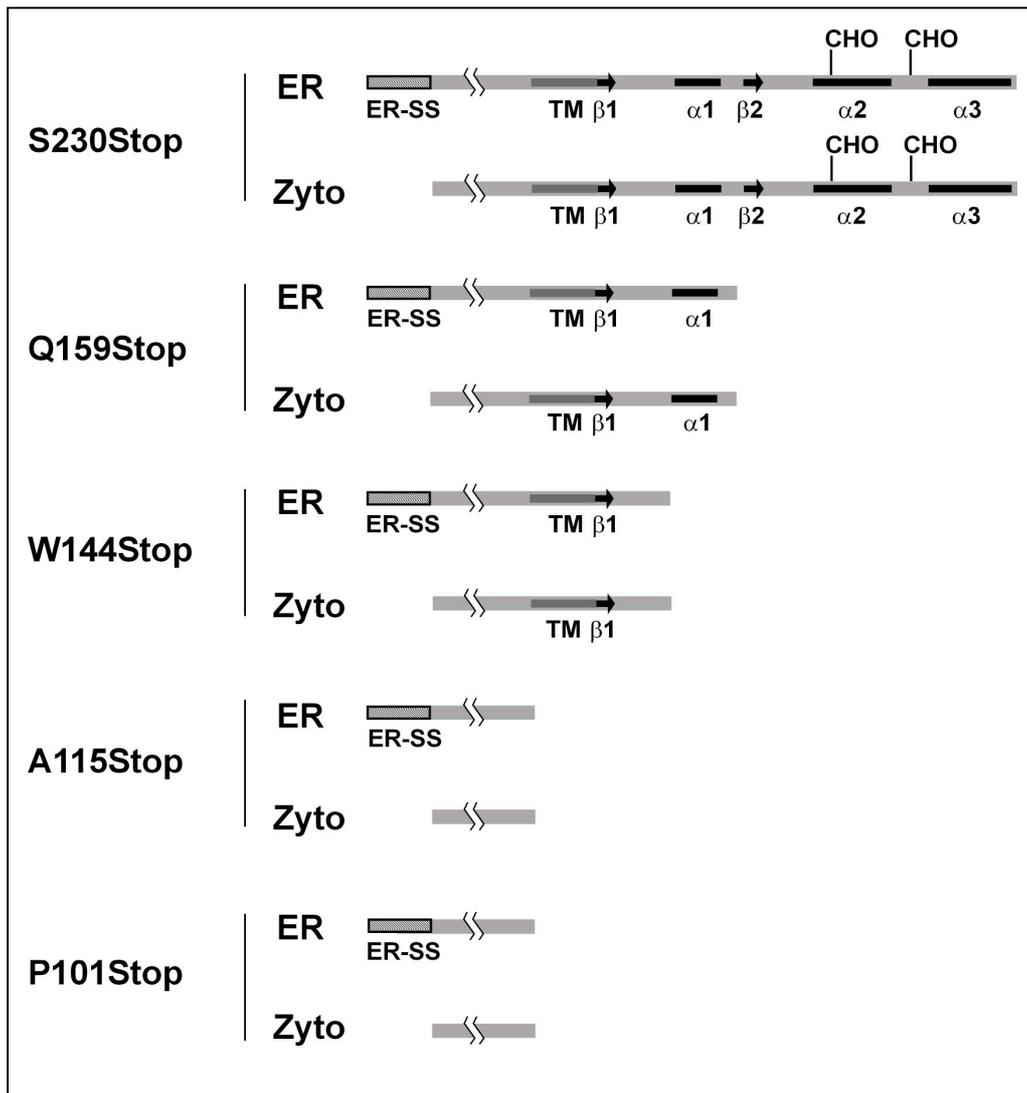
Im ersten Teil dieser Arbeit sollte analysiert werden, welche Determinanten des Prion Proteins notwendig sind, damit PrP überhaupt in das ER importiert wird.

Wird das Prion Protein nicht in das ER importiert, so zieht dies eine Expression von PrP im Zytosol nach sich. Erst kürzlich wurde von Ma *et al.* gezeigt, dass zytosolisches PrP sowohl in Zellkultur als auch in transgenen Mäusen toxisch ist (Ma *et al.* 2002).

#### 4.1.1. C-terminale Verkürzungen beeinflussen die N-terminale Prozessierung von PrP

Um wichtige Domänen für den Import des PrP in das ER ausfindig zu machen, wurden verschiedene Mutanten hergestellt. Ausgangspunkt der Analyse waren zwei humanpathogene Mutanten des PrP, W145Stop und Q160Stop (Kitamoto *et al.* 1993; Finckh *et al.* 2000); dazu wurden die der Mausequenz entsprechenden Äquivalente W144Stop und Q159Stop hergestellt. Da diesen beiden pathogenen Mutanten jeweils ein Teil des strukturierten C-Terminus fehlt (siehe Abb. 10), stellte sich die Frage, welchen Einfluß die strukturierte C-terminale Domäne auf den ER-Import hat. So wurden weitere Konstrukte in die Analyse miteinbezogen, welche den strukturierten C-Terminus entweder nicht oder vollständig umfassen. In den zwei Stop-Mutanten A115Stop und P101Stop ist der C-Terminus deletiert und sie umfassen nur den unstrukturierten N-Terminus (Abb. 10). Bei P101Stop ist im Gegensatz zu A115Stop auch das Stop-Transfer-Element deletiert, welches für die Ausrichtung des Proteins an der ER-Membran verantwortlich ist (Yost *et al.* 1990). Als weitere Kontrolle diente S230Stop, welche den gesamten strukturierten C-Terminus umfasst. S230Stop, in welchem die GPI-Anker-Signalsequenz deletiert ist, wurde anstatt wt PrP aus den folgenden Gründen gewählt: Alle in dieser Studie verwendeten Stop-Mutanten zeichnen sich durch das Fehlen der GPI-Anker-Signalsequenz und der Glykosylierungsstellen aus. So ist auch in S230Stop der GPI-Anker deletiert und es liegt hauptsächlich als unglykosyliertes Protein vor. S230Stop wird jedoch erfolgreich in das ER importiert und sekretiert (Rogers *et al.* 1993; Kocisko *et al.* 1994; Winklhofer *et al.* 2003b). Durch Verwendung von S230Stop als Kontrolle anstelle von komplex glykosylierten und GPI-verankerten (wt) PrP können mögliche Effekte von posttranslationalen Modifikationen ausgeschlossen werden.

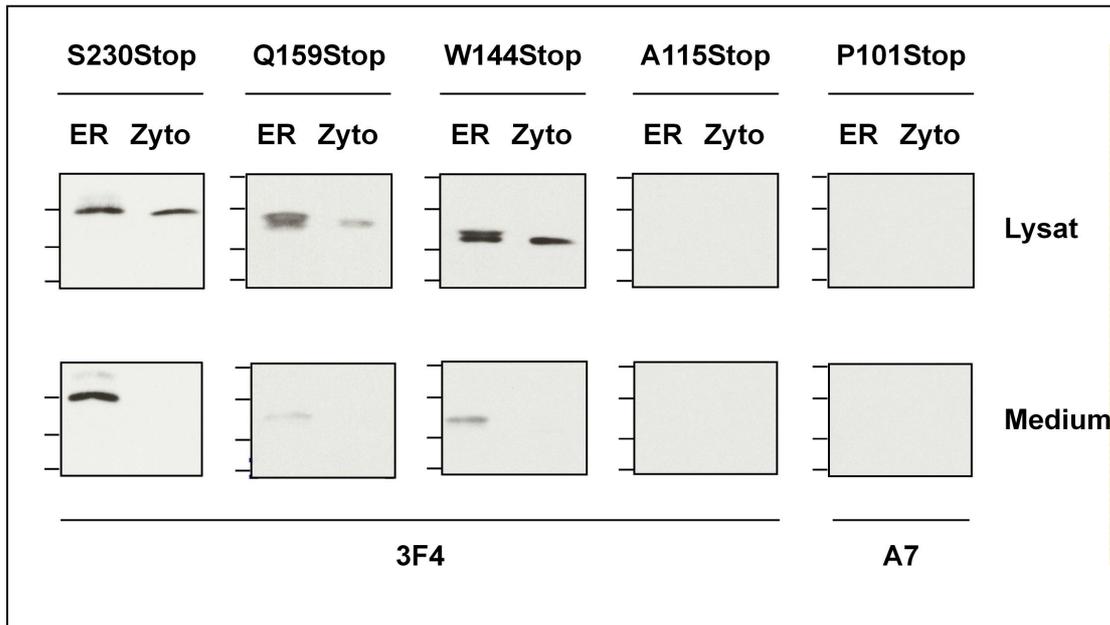
Um unmittelbar vergleichen zu können, ob das Protein prozessiert wurde, d.h. die ER-Signalsequenz abgeschnitten wurde, wurde jedes Konstrukt sowohl mit als auch ohne die ER-Signalsequenz hergestellt (Abb. 10, ER und zyto).



**Abbildung 10.** Schematische Darstellung der C-terminal verkürzten Mutanten.

ER: Konstrukt, das die ER-Signalsequenz beinhaltet; Zyto: Konstrukt, in dem die ER-Signalsequenz deletiert ist; ER-SS: ER-Signalsequenz; TM: Transmembrandomäne;  $\beta$ 1 und  $\beta$ 2: Faltblätter 1 und 2;  $\alpha$ 1-3: Helices 1-3; CHO: Glykosylierungsstelle.

Um einen ersten Hinweis auf die Prozessierung und Sekretion der unterschiedlichen Mutanten zu erhalten, wurden die Konstrukte in N2a-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden geerntet und lysiert. Anschließend wurden die Proben auf einem Western Blot analysiert.



**Abbildung 11.** C-terminale Verkürzungen beeinflussen das N-terminale Prozessieren und die Stabilität von PrP.

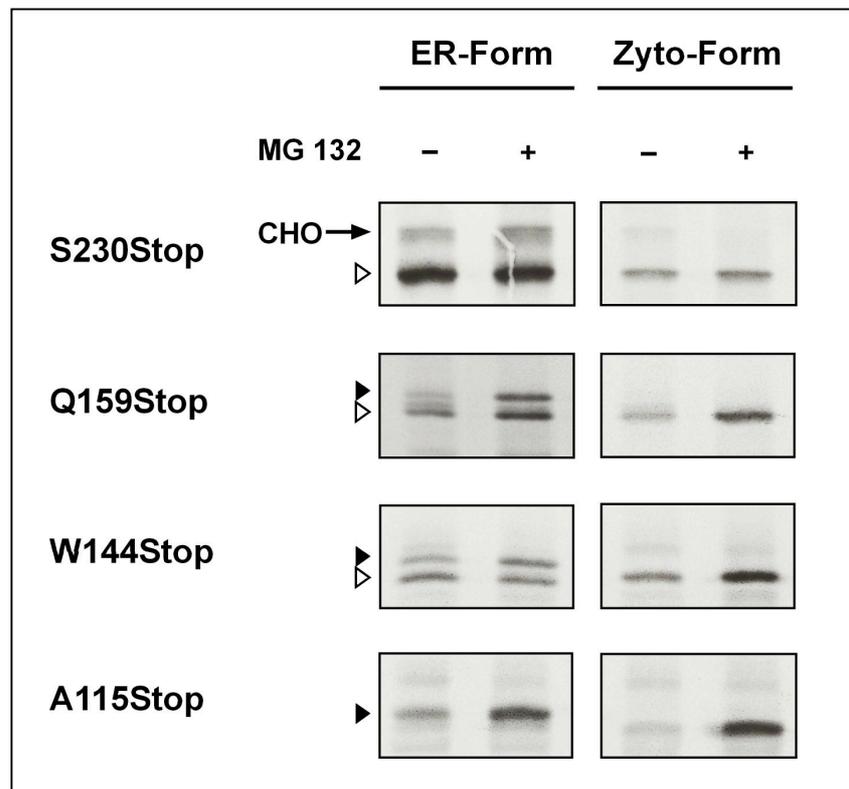
Die dargestellten Mutanten wurden in N2a Zellen exprimiert. Die Zellen wurden 3 h in frischem Medium kultiviert. Im Zellkulturmedium (Medium) und im Zelllysate (Lysat) vorhandenes PrP wurde auf einem Western Blot analysiert und mittels der unter den Bildern angegebenen Antikörper (3F4 bzw. A7) detektiert. Die Größenmarker 22, 16, 6 (und 4) kDa sind links von den Bildern als Striche dargestellt.

Ein Vergleich des Laufverhaltens der ER- mit der Zytoform auf dem SDS-PAGE lässt die Schlussfolgerung zu, dass S230Stop als unglykosylierte Form vorliegt und dass die N-terminale Signalsequenz von S230Stop geschnitten ist (Abb 11, S230Stop). Da S230Stop keinen GPI-Anker hat, wird die ER-Form dieses Konstruktes effizient in das Zellkulturmedium sekretiert (S230Stop, ER, Medium). Die Zyto-Form kann dagegen nicht in das ER importiert werden, den sekretorischen Weg also nicht einschlagen und damit auch nicht sekretiert werden (S230Stop, zyto, Medium). Bei den beiden pathogenen Mutanten Q159Stop und W144Stop können zwei Banden detektiert werden, wobei die untere Bande auf der Höhe der zytosolischen Form läuft. Dies deutet darauf hin, dass diese Konstrukte in zwei unterschiedlichen Formen vorliegen, wobei nur ein Teil davon N-terminal prozessiert wird. Bemerkenswerterweise wird auch ein Teil dieser Mutanten in das Zellkulturmedium sekretiert (Q159Stop bzw. W144Stop, ER, Medium). Die beiden in dieser Analyse untersuchten kurzen Mutanten A115Stop und P101Stop, welche nur den

unstrukturierten Teil des Proteins umfassen, können nicht auf dem Western Blot detektiert werden.

#### 4.1.2. Der C-Terminus beeinflusst die Prozessierung und somit die Effizienz des proteasomalen Abbaus

Um die beiden beobachteten Phänomene, nämlich das Auftreten der pathogenen Mutanten in zwei Formen und die fehlende Detektion der kurzen Mutanten näher zu untersuchen, wurde eine metabolische Markierung mit anschließender Immunpräzipitation durchgeführt.



**Abbildung 12.** PrP-Formen mit ungeschnittener N-terminaler Signalsequenz unterliegen einem schnellen Abbau durch das Proteasom.

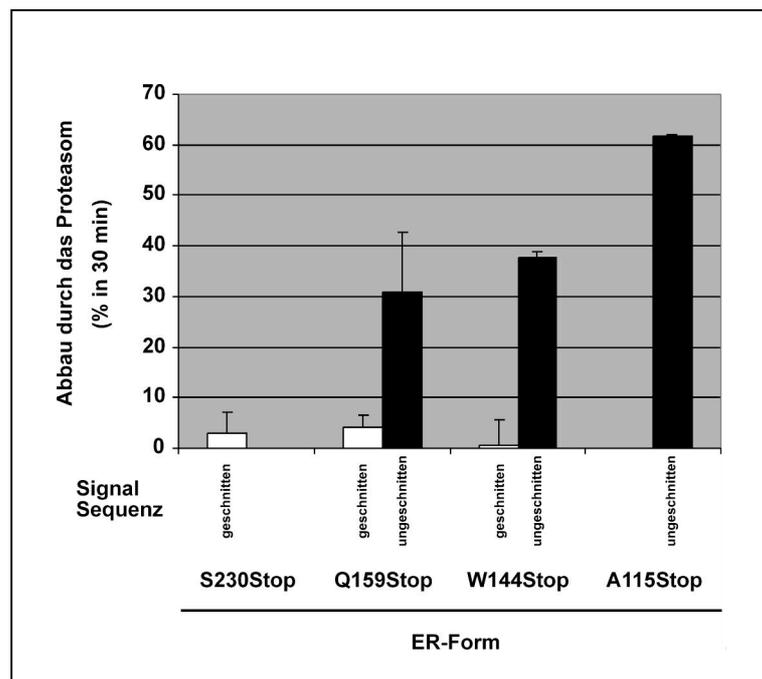
N2a Zellen wurden transient mit verschiedenen PrP Stop-Mutanten, welche die Signalsequenz beinhalten (ER-Form) oder nicht (Zyto-Form), transfiziert. Die Zellen wurden mit (MG 132 +) oder ohne (Mg 132 -) den proteasomalen Inhibitor MG 132 kultiviert und mit [<sup>35</sup>S]Methionin 30 min lang radioaktiv markiert. PrP wurde unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 3F4 immunpräzipitiert. Weißer Pfeil: N-terminal prozessierte Form; Schwarzer Pfeil: N-terminal unprozessierte Form; CHO: glykosylierte Form von S230Stop.

Für eine erste Analyse, ob die PrP Konstrukte erfolgreich in das ER importiert wurden, wurde die Größe der Zyto-Form (ohne Signalsequenz) mit der Größe der ER-Form (mit Signalsequenz) verglichen (Abb. 12). S230Stop läuft auf derselben Höhe wie die dazugehörige zytosolische Mutante. Daraus kann geschlossen werden, dass die ER-Signalsequenz dieser Mutante geschnitten wurde, was auf einen erfolgreichen Import in das ER deutet (weißer Pfeil). Im Gegensatz hierzu verhält sich A115Stop: Die Proteinbande der ER-Form ist etwas größer als die der Zyto-Form. Daher scheint diese kurze Mutante ohne Struktur nicht prozessiert zu werden (schwarzer Pfeil). Die beiden pathogenen Mutanten, denen ein Großteil der Faltungsdomäne fehlt, liegen in zwei Formen vor: Eine Bande läuft auf Höhe der korrespondierenden Form ohne Signalsequenz (weißer Pfeil), und die andere liegt darüber. Hier ist ein interessantes Phänomen zu beobachten; die pathogenen Mutanten liegen in zwei Formen vor, wobei ein Teil erfolgreich prozessiert wird, wohingegen der andere Teil nicht in das ER importiert werden kann und im Zytosol anzutreffen ist.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die hier untersuchten PrP Mutanten in drei unterschiedlichen Formen vorliegen. So liegt PrP in einer vollständig prozessierten Form (S230Stop), in einer nur teilweise prozessierten Form (Q159Stop und W144Stop) oder in einer überhaupt nicht prozessierten Form (A115Stop) vor.

#### **4.1.2.1. Unprozessierte Formen der PrP Mutanten werden schnell durch das Proteasom abgebaut**

Nachdem in diesem ersten Schritt der unterschiedliche Prozessierungsstatus der verschiedenen PrP-Mutanten festgestellt wurde, wurde in einem weiteren Schritt ein Augenmerk auf den Einfluss des proteasomalen Inhibitors MG132 gelegt. Hierzu wurde die Intensität der Bande, welche mit MG132 detektiert wurde (Abb. 12) als 100%-Wert festgesetzt und davon ausgehend der prozentuale Anteil des Abbaus durch das Proteasom ermittelt.



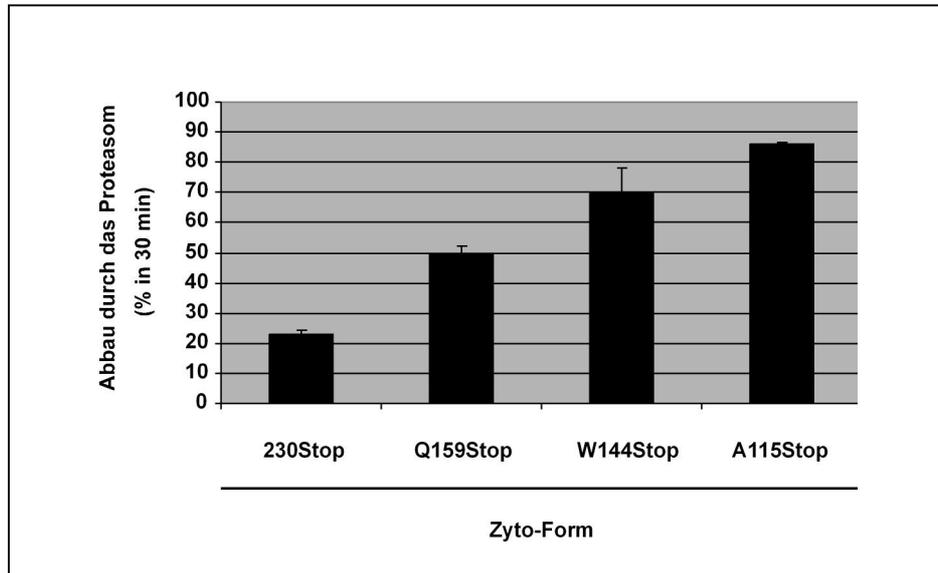
**Abbildung 13.** PrP-Formen mit ungeschnittener ER-Signalsequenz werden schnell durch das Proteasom abgebaut.

Die Intensität der dargestellten Banden des jeweiligen ER-Konstrukts wurde quantitativ ausgewertet. Hierzu wurde die unter Zusatz von MG 132 ermittelte Intensität (vgl. Abb. 12) als 100% festgesetzt und daraus der prozentuale Anteil des Abbaus durch das Proteasom ermittelt. Waren zwei Formen (Signalsequenz geschnitten und ungeschnitten) vorhanden, so wurde jede Bande einzeln ausgewertet.

Wie bereits beschrieben liegt S230Stop in nur einer Form vor, nämlich der prozessierten, in welcher die Signalsequenz geschnitten ist (Abb. 13, S230Stop, Signalsequenz geschnitten). Der Abbau dieser Mutante durch das Proteasom ist sehr gering. Die zwei pathogenen Stop Mutanten liegen in zwei Formen vor (Q159Stop bzw. W144Stop, Signalsequenz geschnitten, ungeschnitten), wobei die ungeschnittene Signalsequenz-Form wesentlich besser durch das Proteasom abgebaut wird (schwarzer Balken). A115Stop wird nicht prozessiert (A115Stop, Signalsequenz ungeschnitten). Hier ist ein starker Abbau durch das Proteasom festzustellen, was auch die fehlende Detektion auf dem Western Blot (vgl. Abb. 11) erklärt.

Die unprozessierten Formen der verschiedenen Konstrukte werden wesentlich schneller durch das Proteasom abgebaut als die prozessierten Formen.

#### 4.1.2.2. Der Abbau durch das Proteasom wird von der Länge der Konstrukte beeinflusst



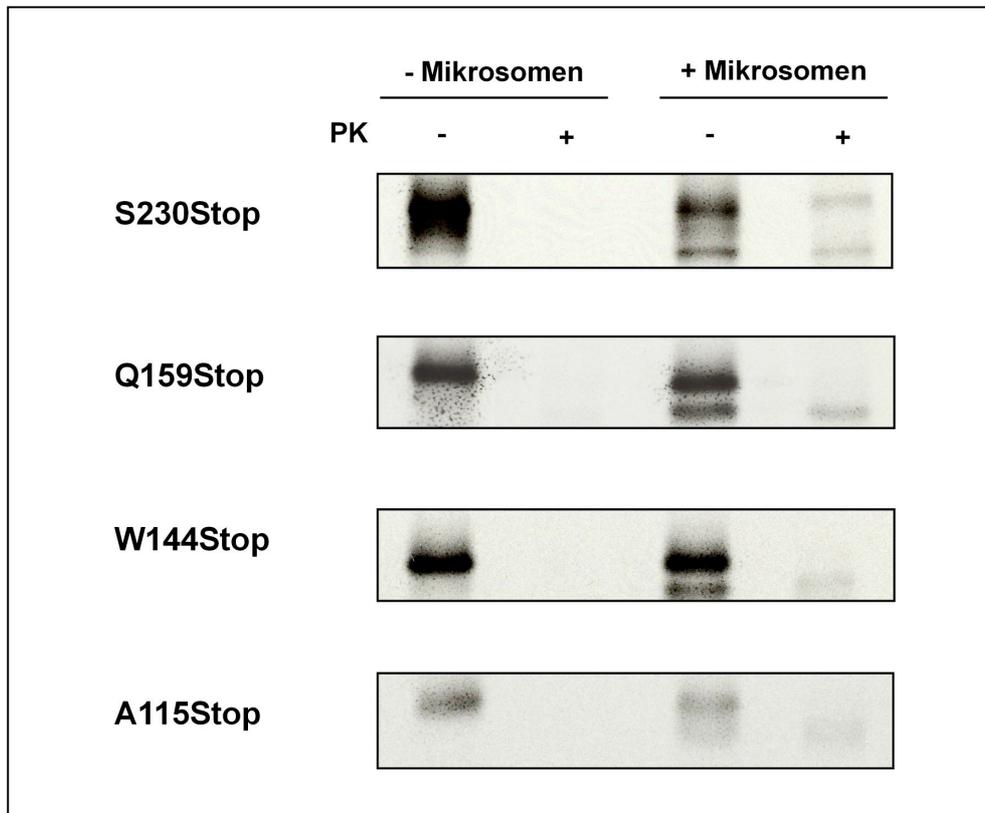
**Abbildung 14.** Die Länge der Mutanten ist für die Intensität des proteasomalen Abbaus wichtig. Die Intensität der in Abb. 12 dargestellten Banden der Zyto-Form wurde quantitativ ausgewertet. Hierzu wurde die unter Zusatz von MG 132 ermittelte Intensität als 100% festgesetzt und daraus der prozentuale Anteil des Abbaus durch das Proteasom ermittelt.

Die Zyto-Formen der PrP Mutanten haben ein Fehlen der Signalsequenz gemeinsam. Diese im Zytosol lokalisierten Mutanten unterliegen einer starken proteasomalen Degradierung. Aus Abb. 14 wird deutlich, dass die Länge der Konstrukte für die Effizienz des Abbaus durch das Proteasom ausschlaggebend ist. So werden die kürzeren Mutanten (z.B. A115Stop) wesentlich schneller durch das Proteasom abgebaut als die langen Konstrukte (z.B. S230Stop).

#### 4.1.3. *In Vitro* Import der PrP Mutanten

Im vorangegangenen Abschnitt wurde auf Grund der unterschiedlichen Größen der Proteinbanden festgestellt, dass die Konstrukte in geschnittenen und / oder ungeschnittenen Signalsequenz-Formen vorliegen. Um nun näher zu untersuchen, ob die Mutanten mit geschnittener Signalsequenz auch wirklich in das ER importiert

werden, wurde eine *in vitro* Translation durchgeführt. Zu dem *in vitro* Translationsansatz wurden Vesikel von ER-Membranen (Mikrosomen) gegeben. Mit Hilfe von Mikrosomen kann der Import von Proteinen in das ER simuliert werden. Nach Translation wurde ein PK-Verdau durchgeführt. Hierdurch ist eine Unterscheidung möglich, ob das Protein in die Mikrosomen importiert wurde oder nicht. Somit kann die Lokalisierung der Proteine untersucht werden.



**Abbildung 15.** N-terminal prozessiertes PrP wird in das ER importiert. Die links angegebenen Konstrukte wurden *in vitro* mit Hilfe des TNT Quick Systems translatiert. Um den cotranslationalen Import zu untersuchen, wurden mikrosomale Membranen (+Mikrosomen) hinzugegeben. Der Import der Proteine wurde mit Hilfe eines Proteinase K Verdau für 1 h auf Eis untersucht. Als Kontrolle wurden die Proteine ohne Zugabe von Mikrosomen (-Mikrosomen) translatiert. Die radioaktiv markierten Proben wurden auf einem SDS-PAGE aufgetrennt.

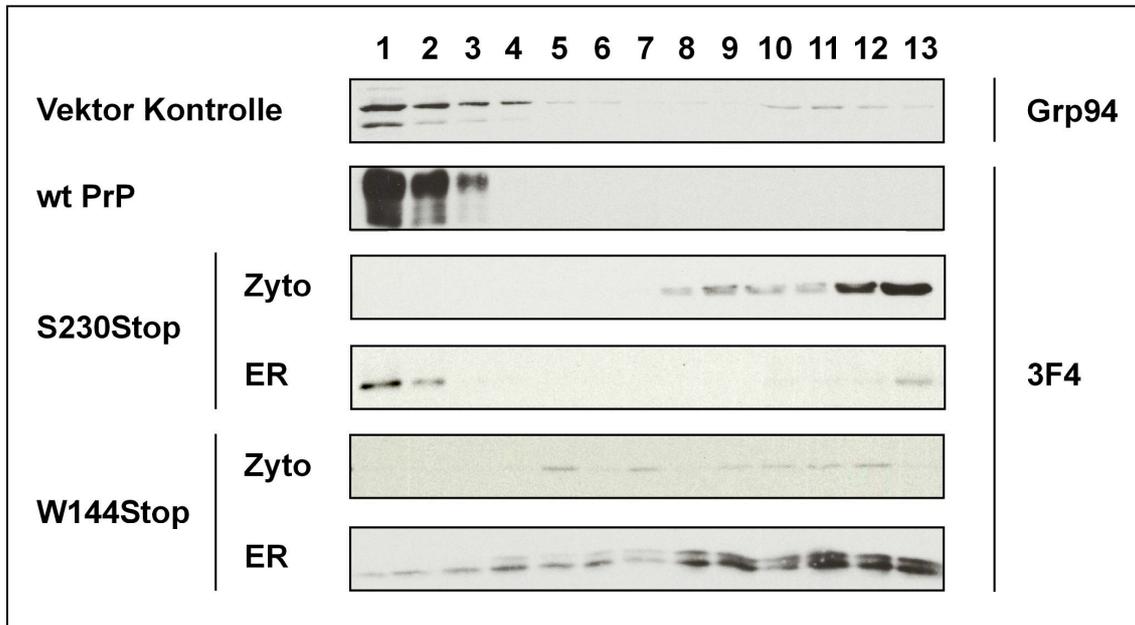
Wie in Abb. 15 zu sehen ist, ist bei S230Stop, Q159Stop und W144Stop nach Zugabe von Mikrosomen eine zweite etwas kleinere Bande erkennbar. Diese Bande bleibt auch nach einem Proteinase K Verdau erhalten, was darauf schließen lässt, dass dies die Form mit geschnittener Signalsequenz darstellt, welche in die Mikrosomen importiert wurde und somit nicht mehr von dem Enzym Proteinase K verdaut werden

kann. Diese zweite Bande kann nach dem Zusatz von mikrosomalen Membranen bei A115Stop nicht detektiert werden. Des Weiteren sind die unprozessierten Formen von W144Stop und Q159Stop (obere Bande) nicht gegen einen proteolytischen Verdau geschützt, d.h. sie befinden sich nicht im Lumen der Mikrosomen. Damit bestätigt sich die Annahme, dass diese Konstrukte (W144Stop, Q159Stop) in zwei Formen vorliegen, wobei sich die Moleküle mit einer geschnittenen ER-Signalsequenz im Lumen befinden.

Somit werden offensichtlich nur die längeren, einen strukturellen Teil umfassenden Konstrukte (S230Stop, Q159Stop und W144Stop) in das ER importiert.

#### **4.1.4. Intrazelluläre Lokalisierung der PrP Konstrukte**

Aus dem vorangegangenen Versuch (vgl. Kapitel 4.1.3.) wurde erkennbar, dass W144Stop und Q159Stop eine geschnittene Signalsequenz haben und somit - zumindest zu einem Teil - in das Lumen der Mikrosomen importiert werden. Nun sollte anhand eines Renografin-Dichtegradienten die Situation *in vivo* näher untersucht werden. Hierfür wurden die Konstrukte in Zellkultur exprimiert und ein Renografin-Dichtegradient hergestellt (Schandel und Jenness 1994; Wang und Chang 1999; Heller *et al.* 2003). Durch eine Zentrifugation werden die Zellbestandteile in unterschiedliche Schichten aufgetrennt, was einen Rückschluss auf die Lokalisierung der Proteine ermöglicht. Proteine, welche sich in der ER- bzw. Plasmamembran befinden, schwimmen entsprechend dem Sedimentationsverhaltens von ER- bzw. Plasmamembran im oberen Bereich des Gradienten, während zytosolische Proteine im unteren Gradient bleiben, und somit in den späteren Fraktionen zu finden sind.



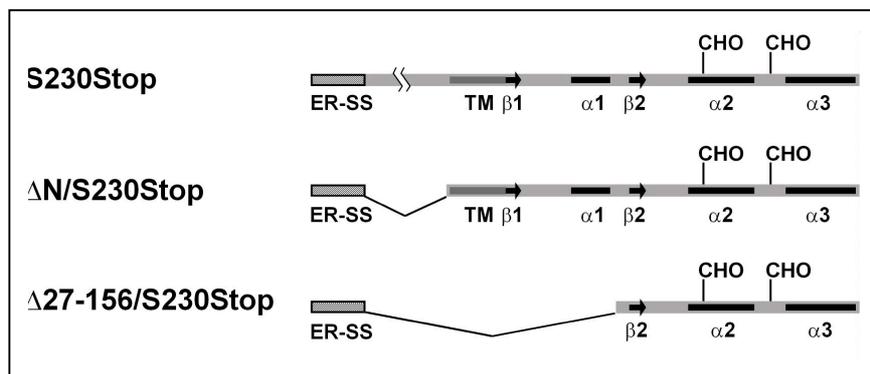
**Abbildung 16.** Nur die N-terminal prozessierte Form von PrP wird in das ER importiert. Die zelluläre Lokalisierung von den links der Abbildung angegebenen Mutanten wurde mittels einer Renografin-Dichtegradienten-Zentrifugation von Zellextrakten ermittelt. Die Fraktionen wurden von oben vom Gradienten abgenommen und auf einem Western Blot mit Hilfe der rechts angegebenen Antikörper detektiert.

Um die für das ER spezifischen Fraktionen zu bestimmen, wurden die Zellen mit dem Vektor pcDNA3.1-ZEO(+) (ohne PrP-Insert) transfiziert und nach dem Gradientenlauf auf einem Western Blot mit Hilfe des ER-spezifischen Antikörpers Grp94 detektiert. Diese Proteine sind in den oberen drei bis vier Fraktionen des Gradienten detektierbar (Abb. 16, Vektor Kontrolle, 1 bis 4, Grp94). Auch wt PrP, das, wie bekannt ist, erfolgreich in das ER importiert wird (Winklhofer *et al.* 2003b), ist in den für das ER spezifischen frühen Fraktionen zu detektieren. Die zytosolische Form von S230Stop hingegen findet sich in den späteren Fraktionen wieder (S230Stop, Zyto, 8 bis 13). S230Stop wird, wie aus den vorhergehenden Studien erwartet, in das ER importiert und ist in den ersten Fraktionen zu detektieren (S230Stop, ER). Bei W144Stop sind zwei Banden zu erkennen, wobei aber nur die untere Bande auch in den ersten Fraktionen vorliegt. Somit wird also nur die Form mit der geschnittenen Signalsequenz erfolgreich in das ER importiert. Die unprozessierte Form ist hingegen nur in den für das Zytosol spezifischen späten Fraktionen detektierbar.

Leider war die Durchführung einer Renografin-Dichtegradienten-Zentrifugation mit A115Stop nicht möglich, da diese Mutante zu schnell abgebaut wird und somit nicht auf einem Western Blot detektierbar ist (vgl. Abb. 11).

#### 4.1.5. Die C-terminale globuläre Domäne ist für den ER-Import ausreichend

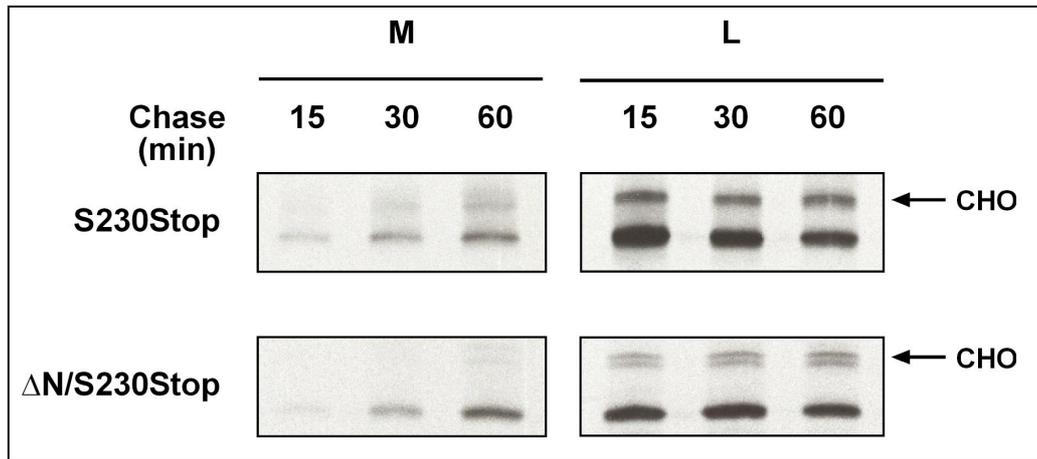
Es stellte sich nun die Frage, ob der mangelhafte Import von C-terminalen Deletionsmutanten auf die geringe Größe oder auf das Fehlen von Informationen zurückzuführen ist, welche in der C-terminalen globulären Domäne liegen. Um dies eingehender zu untersuchen, wurden weitere Mutanten in die Analysen miteinbezogen.



**Abbildung 17.** Schematische Darstellung von PrP-Konstrukten.  
ER-SS: ER-Signalsequenz, TM: Transmembrandomäne,  $\alpha$ 1-3:  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ 1 und 2:  $\beta$ -Faltblätter, CHO: Glykosylierungsstelle.

In der Mutante  $\Delta$ N/S230Stop ist der unstrukturierte N-terminale Teil des PrP deletiert, während  $\Delta$ 27-156/230Stop eine größere N-terminale Deletion umfasst, welche auch die Transmembrandomäne und die Helix 1 einschließt.

Um den Einfluss dieser Regionen des PrP auf den ER-Import zu analysieren, wurden N2a-Zellen transient transfiziert, radioaktiv markiert und PrP wurde mittels Immunpräzipitation analysiert.

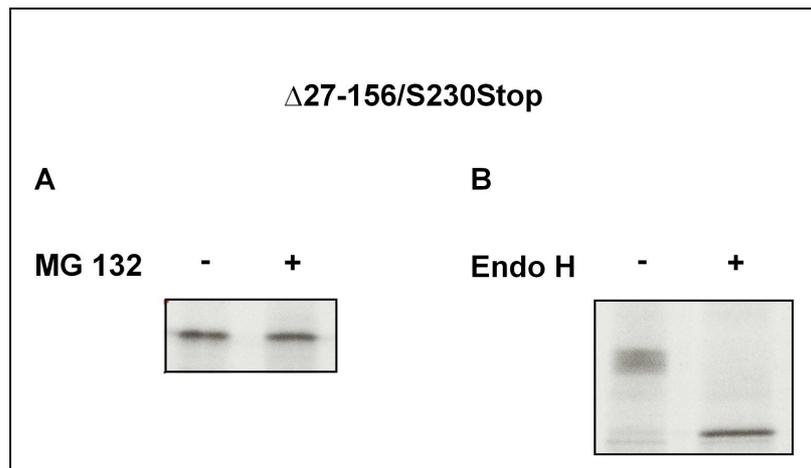


**Abbildung 18.** Der unstrukturierte N-terminale Teil des PrPs ist für einen effizienten ER-Import nicht notwendig.

Transient transfizierte N2a-Zellen wurden mit [<sup>35</sup>S]-Methionin für 30 Min. radioaktiv markiert und anschließend für die angegebene Zeit in frischem Medium inkubiert. PrP im Zellkulturmedium (M) und im Zelllysat (L) wurde mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 3F4 immunpräzipitiert und auf einem SDS-PAGE Gel analysiert. CHO: glykosyliertes PrP.

Vergleicht man die Intensität der Banden der zwei Konstrukte, so kann man feststellen, dass ΔN/S230Stop genauso effizient in das Zellkulturmedium sekretiert wird wie S230Stop (Abb. 18, M). Daher scheint der gesamte unstrukturierte Anteil des Prion Proteins keinen Einfluss auf den ER-Import und den nachfolgenden Transport im sekretorischen Pathway zu haben.

Um nun herauszufinden, ob die Länge des Proteins einen wichtigen Faktor für den ER-Import darstellt, wurde eine noch kürzere Mutante Δ27-156/S230Stop in die Untersuchung mit einbezogen.



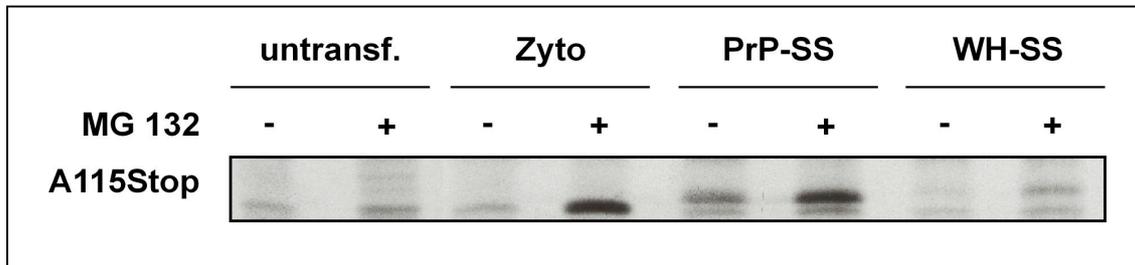
**Abbildung 19.**  $\Delta 27-156/S230Stop$  wird effizient in das ER importiert. Transient transfizierte N2a-Zellen wurden mit [ $^{35}S$ ]-Methionin für 30 Min. radioaktiv markiert und mit dem polyklonalen Antikörper A7 immunpräzipitiert. (A) Die Proben wurden mit MG132 (50  $\mu$ mol/ml) inkubiert. (B) Die Proben wurden mit Endoglykosidase H (EndoH+) 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend auf einem SDS-PAGE Gel analysiert.

Nach radioaktiver Markierung, Behandlung mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 und Immunpräzipitation von PrP wird deutlich, dass MG132 keinen Einfluss auf die Stabilität von  $\Delta 27-156/S230Stop$  hat (Abb. 19, A). Somit wird dieses kurze PrP Konstrukt, welches einen Großteil des strukturierten C-Terminus umfasst, nicht auf dem proteasomalen Weg abgebaut. Der EndoH-Verdau der Probe zeigt, dass  $\Delta 27-156/S230Stop$  glykosyliert wird, also effizient in das ER importiert wurde (Abb. 19, B). Hierbei sei anzumerken, dass die Glykosylierung durch die Deletion von Helix 1 in  $\Delta 27-156/S230Stop$  erklären werden kann (vgl. Kapitel 4.2.).

Die kürzeste in dieser Studie analysierte PrP Mutante  $\Delta 27-156/S230Stop$  wird in das ER importiert. Somit wurde gezeigt, dass nicht die Länge des Proteins für den ER-Import entscheidend ist. Vielmehr ist das Vorhandensein von Informationen, die offensichtlich in dem strukturierten Teil von PrP vorliegen, für den ER-Import ausschlaggebend.

Kürzlich wurde gezeigt, dass die Signalsequenz einen entscheidenden Einfluss auf den Import in das ER eines Proteins hat (Rutkowski *et al.* 2003). Um zu untersuchen, ob auch die Signalsequenz von A115Stop für einen mangelnden Import in das ER verantwortlich sein könnte, wurde die Signalsequenz von A115Stop mit der Signalsequenz von dem Wachstumshormon der Ratte ersetzt. Für diese konnte gezeigt werden, dass sie den ER-Import fördert (Rutkowski *et al.* 2003).

Dazu wurden Zellen mit diesem Konstrukt, das die Signalsequenz des Wachstumshormons der Ratte enthält, transient transfiziert, radioaktiv markiert und PrP mit Hilfe des 3F4 Antikörpers immunpräzipitiert.



**Abbildung 20.** Die Signalsequenz des Wachstumshormons der Ratte kann keinen ER-Import von A115Stop hervorrufen.

Die Zellen wurden nicht (untransf.) oder mit dem Zyto-Konstrukt von A115Sto (Zyto), A115Stop mit der PrP-Signalsequenz (PrP-SS) oder A115Stop mit der Signalsequenz des Wachstumshormons der Ratte (WH-SS) transient transfiziert. Die Zellen wurden mit (MG132+) oder ohne (MG132-) Zusatz des proteasomalen Inhibitor kultiviert, mit [<sup>35</sup>S]Methionin für 30 Minuten radioaktiv markiert und anschließend mit dem 3F4 Antikörper immunpräzipitiert.

A115Stop mit der Signalsequenz des Wachstumshormons (Abb. 20, WH-SS) läuft über der zytosolischen Mutante (Zyto). Bei der untersten Bande handelt es sich um eine unspezifische Bande (vgl. untransf.). WH-A115Stop besitzt also wie auch A115Stop eine ungeschnittene Signalsequenz (Abb. 20, PrP-SS und WH-SS) und unterliegt einem sehr schnellen Abbau durch das Proteasom. Somit wurde gezeigt, dass der Import in das ER nicht durch Verwendung der Signalsequenz des Wachstumshormons der Ratte wiederhergestellt werden kann.

#### 4.1.6. Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass PrP ohne die GPI-Anker-Signalsequenz (S230Stop) erfolgreich in das ER importiert wird. Wenn jedoch ein Teil der C-terminalen Faltungsdomäne fehlt, so wird nur noch ein geringerer Anteil prozessiert (Q159Stop und W144Stop). Sobald das Prion Protein nur noch die unstrukturierte N-terminale Domäne umfasst (A115Stop und P101Stop), kann das Protein nicht mehr importiert werden und es verbleibt gänzlich im Zytosol. Im Gegensatz hierzu werden N-terminal deletierte Mutanten des PrP (ΔN/S230Stop und Δ27-156/S230Stop) erfolgreich in das ER importiert.

Die C-terminale strukturierte Domäne des PrP ist somit notwendig und auch ausreichend für einen erfolgreichen Import in das ER.

Die im Zytosol befindlichen Formen werden sehr schnell und effizient durch das Proteasom abgebaut; ist das Protein jedoch importiert worden, so kommt dem Abbau durch das Proteasom nur noch eine untergeordnete Rolle zu.

Somit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass der C-terminale strukturierte Teil des Prion Proteins wichtige Informationen enthält, welche die Effizienz des Imports in das ER bestimmen und somit die Menge an zytosolischem PrP beeinflussen.

## **4.2. Untersuchung der Faltung des Prion Proteins *In Vivo***

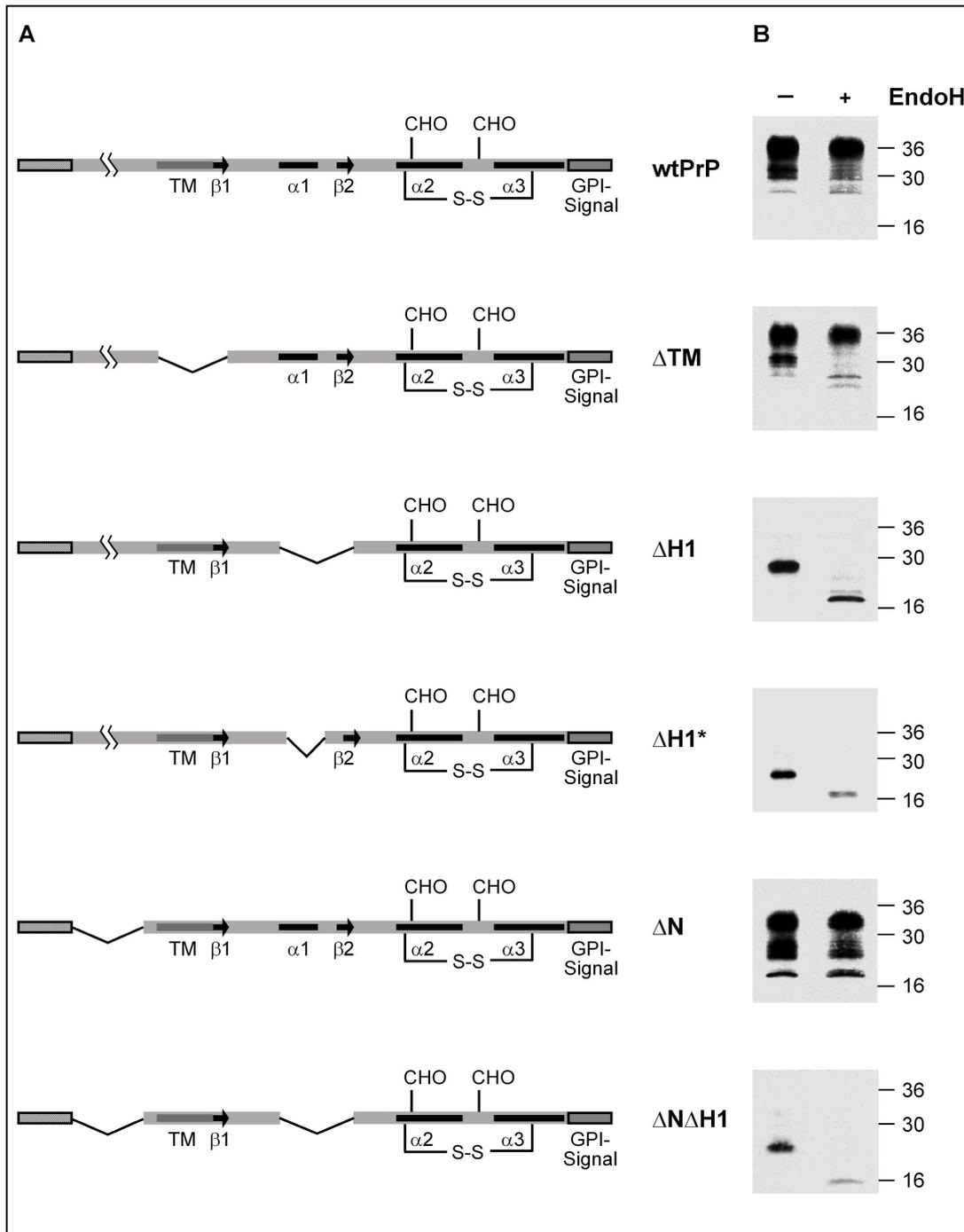
Im ersten Teil dieser Arbeit wurden wichtige Kriterien für den erfolgreichen Import des Prion Proteins in das Endoplasmatische Retikulum untersucht. Der zweite Teil befasst sich mit einem späteren Schritt im sekretorischen Weg des PrPs: Die Faltung des Proteins im ER-Golgi-Apparat. Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse sollen Aufschluss über die Rolle der PrP Domänen in der Reifung des Proteins geben. So wurde der Einfluß verschiedener PrP Domänen auf die Übertragung der Core Glykane, auf die Übertragung des GPI-Ankers und auf die Umwandlung in komplexe Glykane untersucht.

### **4.2.1. Helix 1 ist für die komplexe Glykosylierung des PrP verantwortlich**

Um die Faltung von PrP<sup>C</sup> im sekretorischen Weg in Säugetierzellen zu untersuchen, wurden verschiedene Mutanten hergestellt. Die zwei Glykosylierungsstellen, der GPI-Anker und die Disulfidbrücke, welche für eine korrekte Faltung notwendig sind (Riek *et al.* 1996; Rudd *et al.* 1999; Stimson *et al.* 1999) befinden sich in dem strukturierten Helix 2-Loop-Helix 3 -Bereich. Dieser Bereich wurde daher nicht mutiert.

Da das Prion Protein keine bekannte enzymatische Funktion hat, wurde als Indikator für eine erfolgreiche Faltung zunächst der Glykosylierungsstatus des Proteins analysiert.

Dazu wurden verschiedene PrP Mutanten in Maus-Neuroblastom-Zellen exprimiert und anschließend ein Endoglykosidase H (EndoH) -Verdau durchgeführt, um den Glykosylierungsstatus festzustellen. Der im Folgenden abgebildete Western Blot zeigt die Analyse verschiedener Mutanten des Prion Proteins.



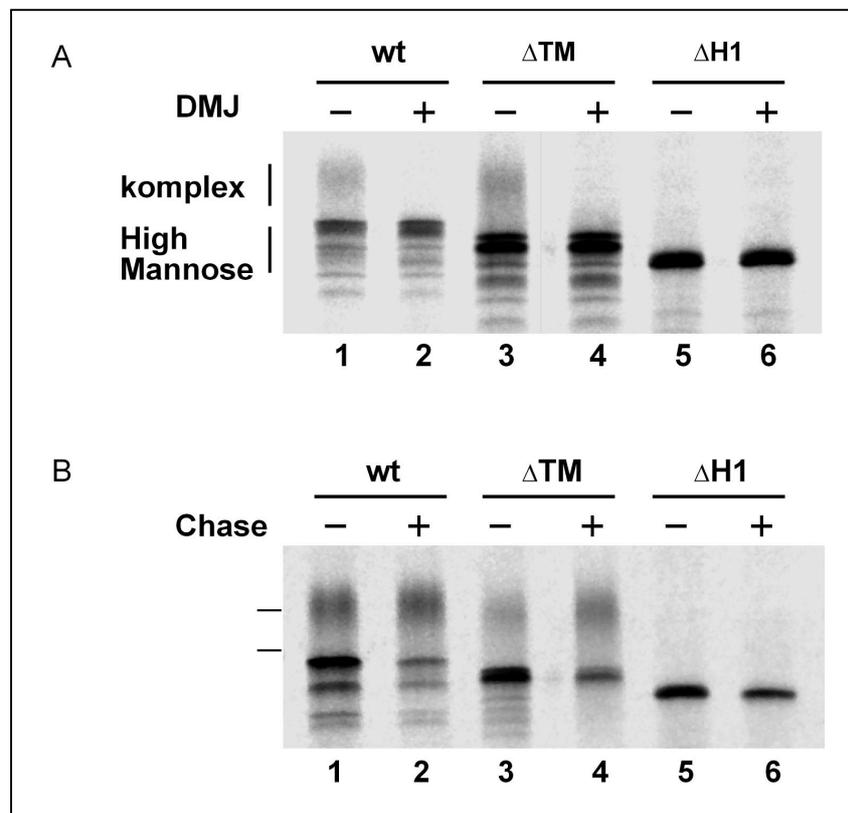
**Abbildung 21.** Helix 1 ist für die komplexe Glykosylierung des PrPs verantwortlich. (A) Schematische Darstellung der PrP-Konstrukte. TM: Transmembrandomäne;  $\beta$ 1,2:  $\beta$ -Faltblatt1,2;  $\alpha$ 1-3:  $\alpha$ -Helix 1-3; CHO: Glykosylierungsstelle; S-S: Disulfidbrücke (B) Die in (A) dargestellten Konstrukte wurden transient transfiziert. Das Zelllysate wurde mit Endo H verdaut (EndoH +) oder unbehandelt gelassen (EndoH -) und die Proben mittels eines Western Blotes analysiert.

Es gibt unterschiedliche Glykosylierungsstadien eines Proteins: Eine unglykosylierte Form, eine High Mannose Glykosylierungsform und die komplexe Glykosylierung (vgl. Kapitel 1.3.2.). Das Enzym EndoH aus *Streptomyces plicatus* spaltet spezifisch zwischen zwei N-Acetyl-Glucosamin-Resten, an denen mindestens fünf Mannoseeinheiten hängen (Robbins *et al.* 1984; Maley *et al.* 1989) Somit können durch EndoH nur die Zucker von Proteinen abgespalten werden, welche in der High Mannose Form vorliegen. Komplex glykosylierte Proteine jedoch können nicht durch EndoH, sondern nur durch PNGase F abgespalten werden (siehe Kapitel 1.3.2.). Ist das Protein EndoH sensitiv, so hat dies eine erhöhte elektrophoretische Mobilität auf einem SDS-Gel zur Folge. wtPrP wird komplex glykosyliert und ist daher nicht EndoH-sensitiv (Abb. 21). Auch das Konstrukt  $\Delta N$ , in welchem der gesamte unstrukturierte Teil des Proteins deletiert wurde, ist nicht EndoH sensitiv. Anders hingegen verhält sich das Konstrukt, in welchem die Helix 1 und das erste  $\beta$ -Faltblatt deletiert wurde ( $\Delta H1$ ). Hier ist eine deutlich erhöhte elektrophoretische Mobilität nach dem EndoH-Verdau zu sehen (Abb. 21, B). Daraus lässt sich schließen, dass in  $\Delta H1$  eine High Mannose Struktur vorliegt, welche durch das Enzym EndoH abgespalten werden kann. Der gleiche Phänotyp liegt vor, wenn zusätzlich zu  $\Delta H1$  der gesamte unstrukturierte N-terminale Teil deletiert wurde ( $\Delta N\Delta H1$ ). Um sicher zu gehen, dass der in  $\Delta H1$  beobachtete Effekt auf das Fehlen der ersten Helix zurückzuführen ist und nicht auf das erste  $\beta$ -Faltblatt, wurde die Mutante  $\Delta H1^*$  untersucht. Bei  $\Delta H1^*$  wurde ausschließlich die erste Helix deletiert.  $\Delta H1^*$  zeichnet sich - wie auch  $\Delta H1$  - durch eine erhöhte elektrophoretische Mobilität nach Behandlung mit EndoH aus. So wird deutlich, dass der beobachtete Effekt auf der Deletion von Helix 1 beruht, wohingegen das erste  $\beta$ -Faltblatt offensichtlich keinen Einfluss hat. Bei der Mutante  $\Delta TM$ , in welcher die potentielle Transmembrandomäne deletiert ist, ist der größte Anteil komplex glykosyliert. Bemerkenswerterweise reagiert jedoch auch ein Teil davon sensitiv mit EndoH. Die Mutante  $\Delta TM$  scheint in zwei Formen vorzukommen, wobei jedoch das Protein größtenteils richtig gefaltet wird.

Diese ersten Untersuchungen zeigen, dass die Deletion des gesamten N-Terminus oder der putativen Transmembrandomäne die komplexe Glykosylierung von PrP nicht beeinflussen. Nach Deletion der ersten  $\beta$ -Helix entsteht jedoch eine High Mannose Form von PrP, welche nicht in eine komplexe Struktur umgewandelt wird.

#### 4.2.2. Die Umwandlung von High Mannose Glykanen in komplexe Strukturen wird von Helix 1 beeinflusst

Um die fehlende Ausbildung von komplex glykosylierten Strukturen in  $\square\square 1$  näher zu untersuchen, wurden transient transfizierte Zellen radioaktiv markiert und anschließend wurde das Prion Protein mittels einer Immunpräzipitation analysiert. Wie in Abb. 22 dargestellt wurden die Zellen mit dem  $\square$ -Mannosidase I- Inhibitor 1-Desoxymannojirimycin (DMJ) versetzt. Hierdurch wird die Abspaltung von Mannoseeinheiten und die darauffolgende Prozessierung der Zucker unterbunden, was zur Folge hat, dass das Protein nicht in komplexe Strukturen umgewandelt werden kann (Fuhrmann *et al.* 1984)(vgl. Kapitel 1.3.2.).



**Abbildung 22.** Helix 1 ist für die Umwandlung von High Mannose Strukturen in komplexe Glykosylierungsformen notwendig.

Die transient transfizierten Zellen wurden mit  $[^{35}\text{S}]$ -Methionin für 30 Minuten radioaktiv markiert. PrP wurde mit dem monoklonalen Antikörper 3F4 immunpräzipitiert. (A) Die Proben 1, 3, 5 wurden unbehandelt gelassen (DMJ -), bei den Proben 2, 4, 6 wurde DMJ hinzugegeben (DMJ +). (B) Die Proben 1, 3 und 5 wurden nach der radioaktiven Markierung geerntet (Chase -). Die Proben 2, 4 und 6 wurden nach der radioaktiven Markierung gewaschen und für 30 Minuten in frischem Medium weiterkultiviert (Chase +).

Sowohl bei wt PrP (Probe 1) als auch bei  $\Delta$ TM (Probe 3) liegen zwei Glykosylierungsstadien vor (Abb. 22, A). Die obere diffuse Bande repräsentiert komplex glykosyliertes PrP, wohingegen die untere Bande die High Mannose Form darstellt. Nach Behandlung der Proben mit DMJ (Probe 2 und 4) wird die komplexe Glykosylierung blockiert und somit verschwindet die obere diffuse Bande. Im Falle des Konstruktes  $\Delta$ H1 hat DMJ jedoch keinen Einfluss (Probe 5 und 6), da hier nicht der komplexe Glykosylierungsstatus erreicht wird. Dies bekräftigt die bereits in Kapitel 4.2.1. beschriebene Annahme, dass  $\Delta$ H1 als High Mannose Struktur vorliegt.

Um die Umwandlung von High Mannose Strukturen in höher glykosylierte Formen zu verfolgen, wurden nach der radioaktiven Markierung die Zellen mit frischem Medium weiterkultiviert (Chase +). Bei wt PrP als auch bei  $\Delta$ TM lässt sich eine klare Abnahme der unteren Bande und eine Zunahme der oberen Bande während des Chases feststellen (Abb. 22, B, Probe 1-4). Bereits innerhalb dieser 30 Minuten Chase wird ein Teil der noch nicht vollständig glykosylierten Form in die komplex glykosylierte Form umgewandelt. Bei  $\Delta$ H1 hingegen ist auch nach Inkubation in frischem Medium keine Umwandlung in komplexe Glykane nachweisbar (Abb. 22, B, Probe 6).

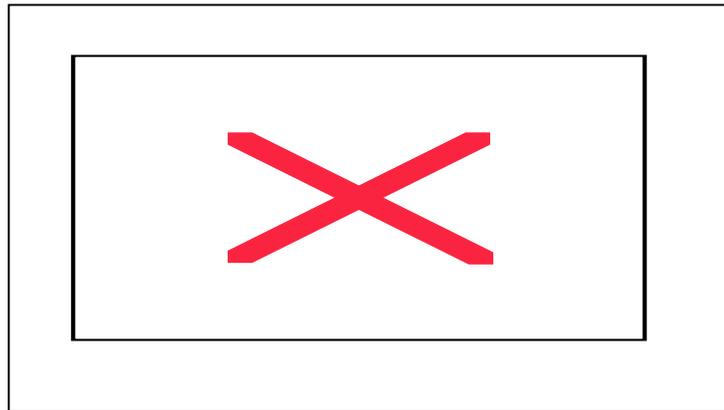
Diese Experimente verdeutlichen nochmals, dass die Ausbildung von Helix 1 für die Umwandlung von High Mannose Strukturen in komplexe Glykane notwendig ist.

#### **4.2.3. Die Deletion von Helix 1 verhindert die Übertragung eines GPI-Ankers**

Um den sekretorischen Weg von  $\Delta$ H1 und anderen Mutanten weiter zu verfolgen, wurde untersucht, ob sich die Konstrukte an der Plasmamembran befinden und ob sie dort mit Hilfe eines GPI-Ankers verankert sind.

#### 4.2.3.1. Die Mutante $\Delta$ H1 befindet sich nicht an der Oberfläche

In einem ersten Schritt wurde ein Trypsinverdau ausgeführt. Hierzu wurden lebende transfizierte Zellen auf einer Zellkulturschale mit Trypsin bei Raumtemperatur inkubiert, bis sich die Zellen lösten. Trypsin entfernt alle Proteine, die sich an der Zelloberfläche befinden.



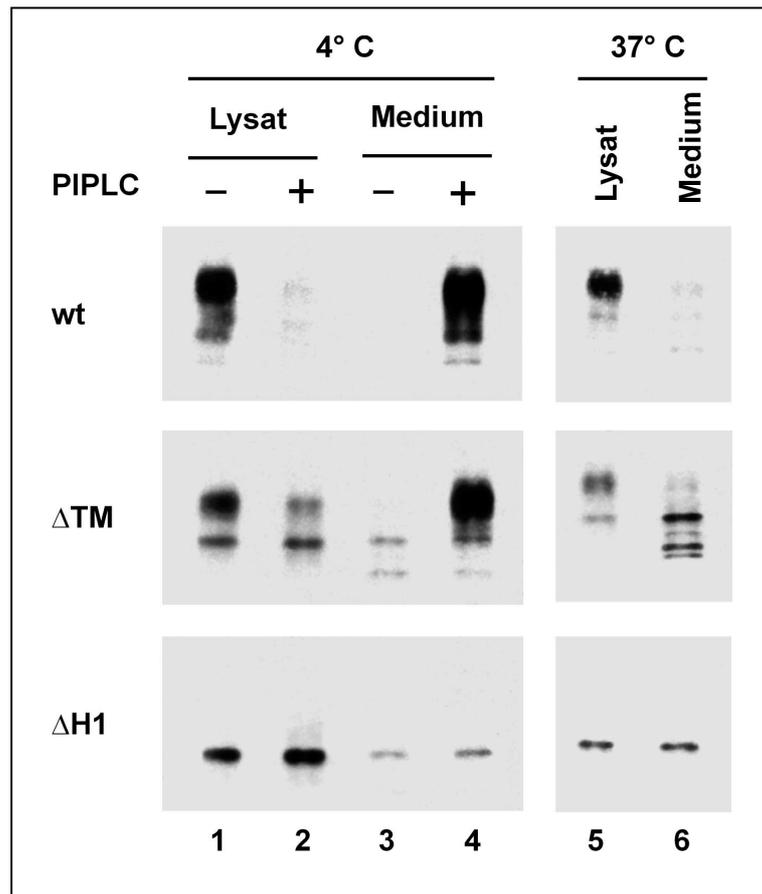
**Abbildung 23.**  $\Delta$ H1 befindet sich nicht an der Plasmamembran.

Die Zellen wurden transient mit den Konstrukten wt,  $\Delta$ TM oder  $\Delta$ H1 transfiziert. Um Oberflächenproteine abzuschneiden, wurden die Zellen mit Trypsin inkubiert (Trypsin +) oder zur Kontrolle unbehandelt gelassen (Trypsin -). Das nach Zellyse verbleibende PrP wurde mittels Western Blot analysiert.

Bei wt PrP als auch bei  $\Delta$ TM lässt sich deutlich erkennen, dass der größte Anteil des Proteins durch den extrazellulären Trypsinverdau entfernt wurde, und somit nicht mehr auf dem Blot detektierbar ist (Abb. 23, Probe 2 und 4). Diese Konstrukte sind an der Plasmamembran lokalisiert. Anders verhält es sich für  $\Delta$ H1. In diesem Fall kann keine Abnahme der Stärke der Proteinbande nach Trypsinbehandlung festgestellt werden (Probe 5 und 6) und somit ist  $\Delta$ H1 nicht an der Plasmamembran zu finden. Helix 1 ist offensichtlich für die Verankerung an der Oberfläche mittels GPI-Anker notwendig.

#### 4.2.3.2. Die Deletion von Helix 1 verhindert das Anheften des GPI-Ankers

Um die fehlende Anheftung an die Plasmamembran näher zu analysieren, wurde ein Phosphatidylinositol-Phospholipase C (PIPLC)-Verdau durchgeführt. PIPLC schneidet spezifisch den GPI-Anker bei GPI-verankerten Proteinen ab.



**Abbildung 24.** Die Deletion von Helix 1 verhindert das Anheften eines GPI-Ankers und  $\Delta$ H1-PrP wird stattdessen in das Zellkulturmedium sekretiert.

Lebende transient transfizierte Zellen wurden bei 4°C mit PIPLC (Probe 2 und 4) oder PBS-/- (Probe 1 und 3) inkubiert. Um eine mögliche Sekretion der Proteine in das Zellkulturmedium zu analysieren, wurden parallel dazu Zellen für 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Zelllysat (Lysat) und das Zellkulturmedium (Medium) mittels Western Blot auf PrP untersucht.

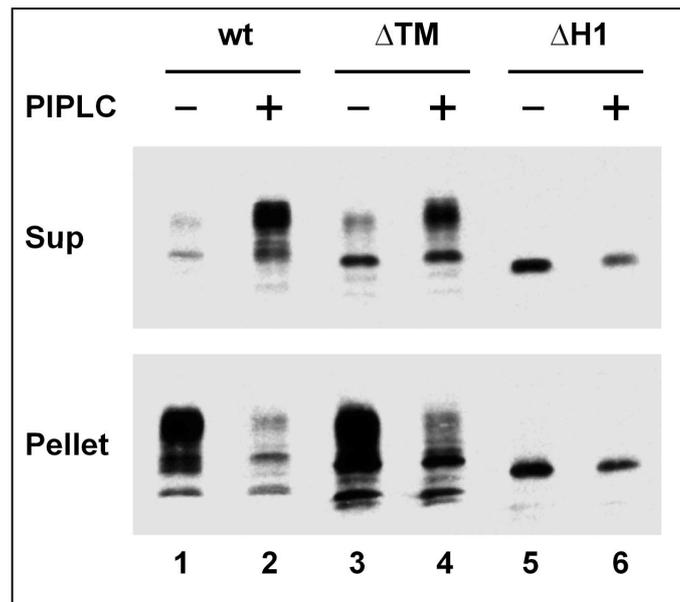
Wt PrP ist mit einem GPI-Anker an der Plasmamembran verankert. Ohne PIPLC-Behandlung (Abb. 24, wt, Probe 1) ist PrP im Lysat zu finden. Durch einen PIPLC-Verdau (wt, Probe 1) wird der GPI-Anker abgeschnitten und PrP ist nicht mehr im Lysat (wt, Probe 2), sondern im Zellkulturmedium (wt, Probe 4) zu detektieren.

Anders verhält sich  $\square$ H1. Die relativen Proteinmengen werden bei  $\square$ H1 durch eine Inkubation mit PIPLC nicht beeinflusst ( $\square$ H1, Probe 1 bis 4). Da nach PIPLC-Verdau kein Zuwachs an  $\square$ H1-PrP im Medium bei 4 °C zu erkennen ist, lässt sich daraus schlussfolgern, dass  $\square$ H1 keinen GPI-Anker besitzt. Um festzustellen, ob das Protein während der Inkubationszeit in das Zellkulturmedium sekretiert wird, wurden die Zellen 3 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Während wt PrP an der Membran verankert ist und somit nicht bei 37°C in das Medium sekretiert wird (wt, Probe 6), wird  $\square$ H1-PrP effizient in das Medium sekretiert ( $\square$ H1, Probe 6).

$\square$ TM liegt wie schon in Kapitel 4.2.1. beschrieben in zwei Formen vor. Der größere Anteil von  $\square$ TM wird mit einem GPI-Anker an die Membran angeheftet; nach dem PIPLC-Verdau wird der GPI-Anker abgeschnitten und das Protein befindet sich in der Mediumfraktion ( $\square$ TM, Probe 4). Ein Teil von  $\square$ TM liegt jedoch in der High Mannose Form vor (vgl. Abb. 21). Diese Form wird interessanterweise - wie auch  $\square$ H1 - bei 37°C in das Zellkulturmedium sekretiert.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass  $\square$ H1 nicht mit einem GPI-Anker an die Plasmamembran angeheftet ist, sondern stattdessen effizient in das Zellkulturmedium sekretiert wird.

Um die These zu unterstützen, dass  $\square$ H1 keinen GPI-Anker erhält, wurde ein PIPLC-Verdau *in vitro* durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen transfiziert, geerntet und anschließend in 0.1% Triton-X-100 (in PBS-/-) lysiert. Durch Zentrifugation wurde die Probe in eine lösliche und eine unlösliche Fraktion aufgeteilt. Unter diesen Bedingungen sind GPI-verankerte Proteine normalerweise in der unlöslichen Fraktion zu finden. Ist das Protein nicht an der Zelloberfläche mit einem GPI-Anker verankert oder wird der GPI-Anker durch PIPLC-Behandlung abgespalten, so ist es in der löslichen Fraktion zu detektieren.



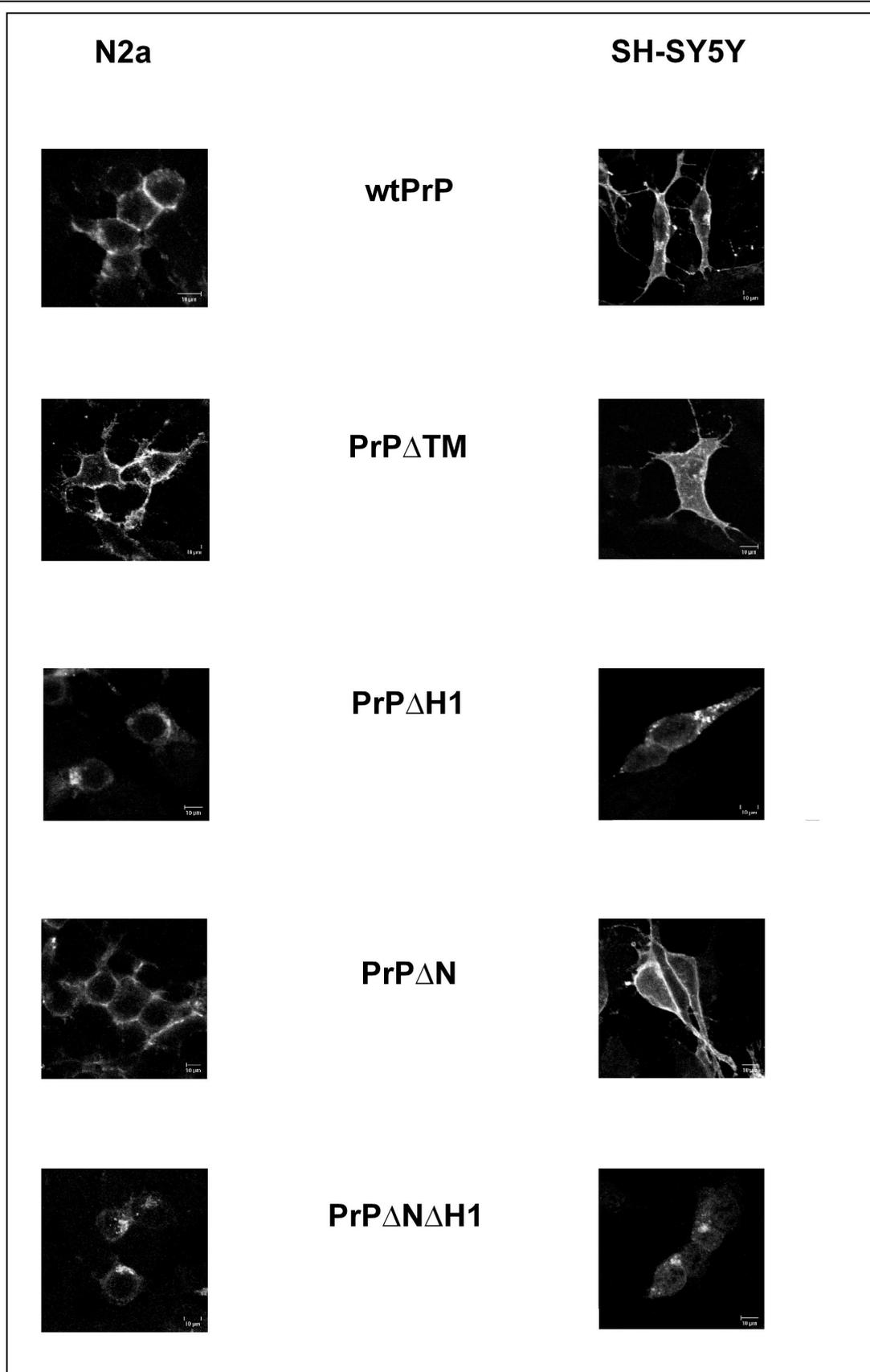
**Abbildung 25.** Helix 1 ist für die Ausbildung und Anheftung eines GPI-Ankers notwendig. Der Zellextrakt von transient transfizierten Zellen (wt,  $\Delta$ H1,  $\Delta$ TM) wurde auf Eis mit PIPLC verdaut (Probe 2, 4, 6). Anschließend wurden die Extrakte zentrifugiert und in eine lösliche (Sup) und unlösliche (Pellet) Fraktion aufgetrennt. Die Proteine wurden mittels eines Western Blotes analysiert.

Wie auch andere GPI-verankerte Proteine ist wtPrP unlöslich (Abb. 25, wt, Probe 1, Pellet). Wenn jedoch der Zellextrakt vor der Zentrifugation mit PIPLC inkubiert wird, so wird der GPI-Anker abgespalten und das Protein wird löslich (wt, Probe 2, Sup). Analog dazu verhält sich  $\Delta$ TM. Auch hier konnte nachgewiesen werden, dass der größte Anteil GPI-verankert ist und somit im Pellet vorliegt ( $\Delta$ TM, Probe 3, Pellet); nach spezifischem Abschneiden des GPI-Ankers wird auch hier das Protein löslicher ( $\Delta$ TM, Probe 4, Sup). Wiederum ist anzumerken, dass bei  $\Delta$ TM die EndoH-sensitive Glykosylierungsform bereits ohne PIPLC-Behandlung löslich ist ( $\Delta$ TM, Probe 3, Sup), und somit keinen GPI-Anker erhält. Nach Deletion der Helix 1 des Prion Proteins ist nach Behandlung mit PIPLC keine erhöhte Löslichkeit festzustellen ( $\Delta$ H1, Probe 5 und 6, Sup), was das Fehlen des GPI-Ankers nochmals bestätigt.

Somit konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass Helix 1 für die Ausbildung eines GPI-Ankers und dadurch für das Anheften an die Plasmamembran unerlässlich ist. Sobald Helix 1 deletiert wird, kann das Protein nicht mehr GPI verankert werden; stattdessen wird es in das Zellkulturmedium sekretiert.

#### **4.2.4. Lokalisierung von verschiedenen PrP Konstrukten in intakten Zellen**

Nachdem die verschiedenen PrP-Mutanten eingehend biochemisch analysiert wurden, wurde eine indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt. Dadurch sollte die Lokalisierung der Konstrukte in lebenden Zellen untersucht werden.



**Abbildung 26.** Immunfluoreszenz von den verschiedenen PrP Mutanten. Um die Mutanten zu lokalisieren, wurden N2a- und SH-SY5Y-Zellen auf Glasplättchen kultiviert und die Konstrukte transient transfiziert. Anschließend wurden die Proben mittels einer indirekten Immunfluoreszenz in einem konfokalen Mikroskop analysiert.

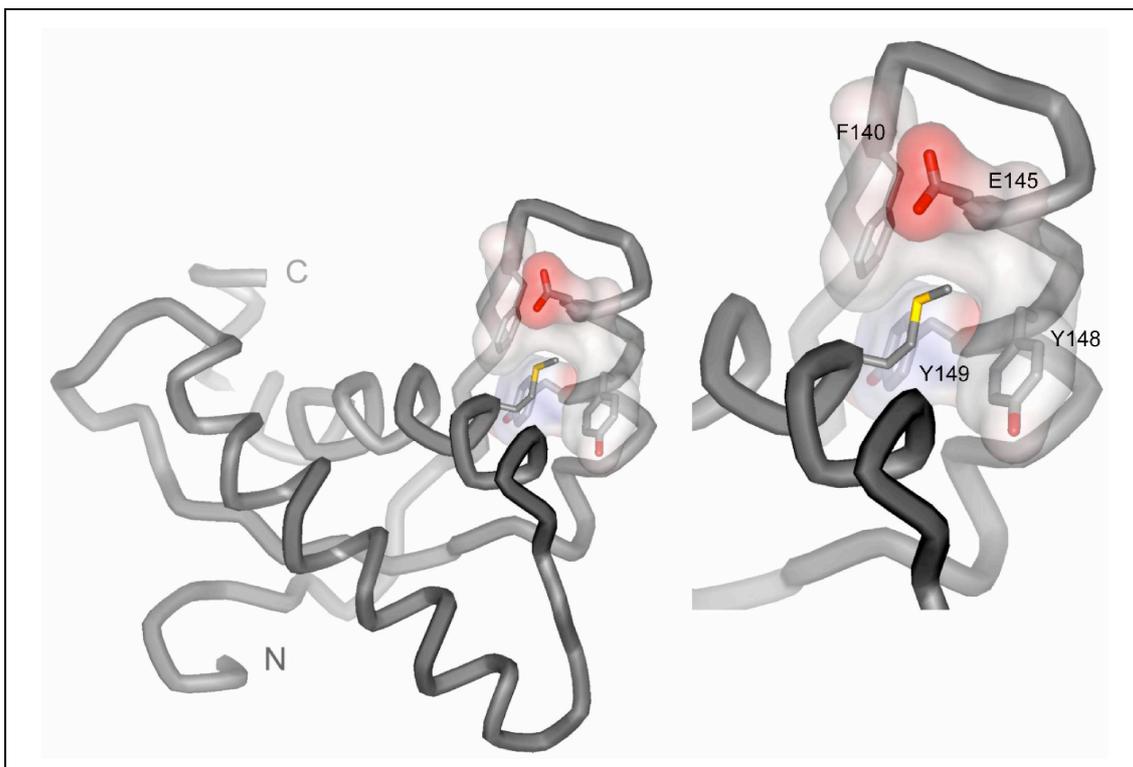
Bei wt PrP und  $\Delta$ TM kann eine klare Lokalisierung entlang der Zelloberfläche erkannt werden (Abb. 26, N2a, wtPrP und PrP $\Delta$ TM). Selbst nach Deletion der gesamten unstrukturierten N-terminalen Domäne des Prion Proteins ist die gleiche Oberflächen-Lokalisierung wie bei wt PrP festzustellen (vgl. wt PrP und PrP $\Delta$ N). PrP $\Delta$ H1 und PrP $\Delta$ N $\Delta$ H1 jedoch ist - wie bereits auf Grund der vorangegangenen biochemischen Studien erwartet - nicht an der Zelloberfläche zu finden. Bei diesen beiden Konstrukten ist eine distinkte intrazelluläre Färbung festzustellen (N2a, PrP $\Delta$ H1 und PrP $\Delta$ N $\Delta$ H1), welche auf ein Post-ER-Golgi-Kompartiment hinweist. Obwohl eine Deletion von Helix 1 eine starke Sekretion in das Zellkulturmedium hervorruft, kann eine intensive intrazelluläre Färbung beobachtet werden. Wahrscheinlich beruht diese intrazelluläre Färbung nicht auf einer dortigen andauernden Lokalisierung; vielmehr wird hier das Protein erfasst, das sich auf dem Weg zur Zelloberfläche befindet und anschließend sekretiert wird. Da das Golgi-Kompartiment ein im Vergleich zur ganzen Zelle kleines Areal umfasst, konzentriert sich die Färbung nach Deletion von Helix 1 nur auf dieses, was eine intensive Färbung zur Folge hat.

Um sicherzustellen, dass die beschriebenen Effekte nicht zelltyp-spezifisch sind, wurden auch humane Zellen in die Analyse miteinbezogen. Die humanen Neuroblastomzellen SH-SY5Y zeichnen sich dadurch aus, dass sie im Gegensatz zu den murinen Neuroblastomzellen N2a kein endogenes PrP exprimieren. Wie aus Abb. 26 ersichtlich sind auch in den humanen Zellen wtPrP, PrP $\Delta$ TM und PrP $\Delta$ N an der Zelloberfläche lokalisiert. Auch in diesen Zellen ist nach Deletion von entweder Helix 1 alleine (SH-SY5Y, PrP $\Delta$ H) oder zusammen mit dem unstrukturierten N-terminalen Teil (SH-SY5Y, PrP $\Delta$ N $\Delta$ H1) eine intrazelluläre Golgi-Färbung festzustellen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Helix 1 eine entscheidende Rolle in den posttranslationalen Modifikationen spielt und für die Anheftung des GPI-Ankers unabdingbar ist. Falls Helix 1 zerstört ist, bleibt die Glykosylierung auf der Stufe der High Mannose Glykosylierungsform stehen und eine weitere Umwandlung in komplexe Glykane ist nicht möglich. Nach Deletion von Helix 1 kann kein GPI-Anker angeheftet werden. Dies hat zur Folge, dass das Prion Protein in seiner High Mannose Form in das Zellkulturmedium sekretiert wird.

#### 4.2.5. Für die Faltung und Reifung von PrP<sup>C</sup> ist eine hydrophobe Aminosäure in Helix 3 nötig

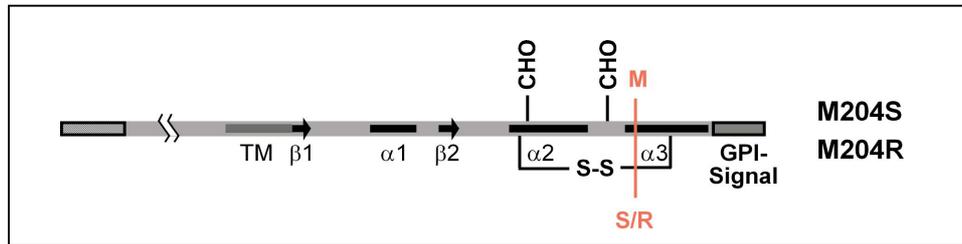
In einem weiteren Schritt wurde überlegt, wie die Ausbildung der anscheinend so wichtigen ersten Helix des Prion Proteins beeinflusst werden kann ohne diese Domäne zu deletieren. Die NMR-Struktur-Analyse von Maus PrP<sup>C</sup> ergab, dass eine hydrophobe Seitenkette an Position 204 eine wichtige Stabilisierung von Helix 1 darstellt.



**Abbildung 27.** Methionin<sup>204</sup> ist für die Stabilisierung von Helix 1 von Bedeutung. Links ist eine schematische Darstellung des gesamten Prion Proteins zu sehen. In der rechten Abbildung ist eine Vergrößerung der nichtpolaren Interaktionen von Methionin<sup>204</sup> (gelb, Stick Repräsentation) mit den benachbarten Aminosäuren Phe<sup>140</sup>, Glu<sup>145</sup>, Tyr<sup>148</sup> und Tyr<sup>149</sup> (roter Schatten) dargestellt.

Die hydrophobe Seitenkette an Position 204 innerhalb der Helix 3 interagiert mit Phenylalanin 140, Glutaminsäure 145, Tyrosin 148 und Tyrosin 149. Dieses Zusammenspiel könnte für die Stabilisierung von Helix 1 notwendig sein. Diese Position ist bei allen Säugetieren konserviert: Methionin im Mensch und bei der Maus, Isoleucin beim Hamster (Wopfner *et al.* 1999).

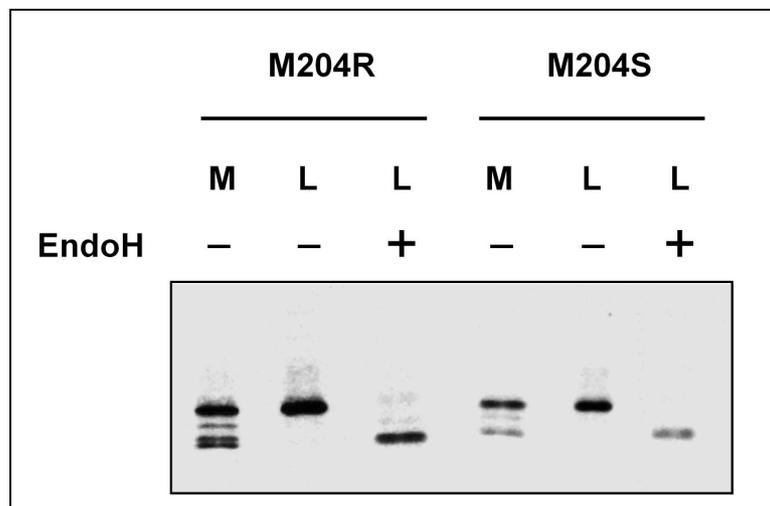
Um die Ausbildung von Helix 1 zu verhindern, wurden zwei neue Punktmutationen mit in die Analyse aufgenommen: M204S und M204R.



**Abbildung 28.** Schematische Darstellung der Punktmutationen M204S und M204R. TM: Transmembrandomäne;  $\beta$ 1,2:  $\beta$ -Faltblatt1,2;  $\alpha$ 1-3:  $\alpha$ -Helix 1-3; CHO: Glykosylierungsstelle; S-S: Disulfidbrücke.

Für diese Punktmutationen wurde Methionin im Falle von M204S gegen das ungeladene polare Serin und im Falle von M204R gegen das basische Arginin ausgetauscht.

Um den Einfluss dieser beiden Punktmutationen zu analysieren, wurde der Glykosylierungsstatus dieser Mutanten untersucht. Desweiteren wurde die Sekretion dieser Mutanten analysiert.



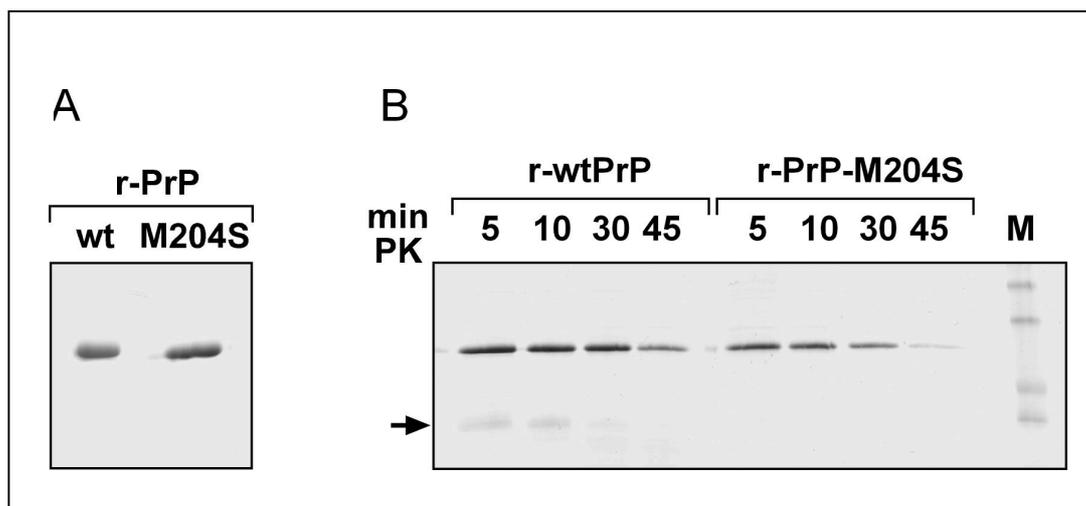
**Abbildung 29.** Die hydrophobe Seitenkette in Position 204 ist für die komplexe Glykosylierung und für die Membranverankerung nötig.

Die Punktmutationen M204S und M204R wurden in Zellkultur exprimiert. Um eine mögliche Sekretion in das Zellkulturmedium (M) zu analysieren, wurden die Zellen 3 Stunden in frischem Medium inkubiert und die Proteine gefällt. Zur Untersuchung des Glykosylierungsstatus wurde ein EndoH-Verdau durchgeführt (EndoH + / -). Die Proteine wurden auf einem Western Blot analysiert.

Beide Punktmutationen werden - wie auch  $\Delta$ H1 - in das Zellkulturmedium sekretiert (Abb. 29, M), was auf das Fehlen eines Membranankers hindeutet. Nach einem EndoH-Verdau ist eine erhöhte elektrophoretische Mobilität festzustellen; dies ist auf das Abschneiden von High Mannose Glykanen zurückzuführen (L, Endo H +). Die fehlenden Modifikationen sind wahrscheinlich auf eine durch die Punktmutation hervorgerufene veränderte Konformation des Proteins zurückzuführen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Punktmutationen M204S und M204R höchstwahrscheinlich durch Destabilisierung der Helix 1 die Membranverankerung als auch die Glykosylierung von PrP<sup>C</sup> beeinflussen.

Die Annahme, dass wtPrP und PrP-M204S in unterschiedlichen Konformationen vorliegen, konnte durch eine biochemische Analyse von rekombinanten Proteinen bestätigt werden. Hierzu wurden wtPrP und PrP-M204S in *E.Coli* exprimiert, gereinigt und oxidiert (siehe Kapitel 3.5.14.)



**Abbildung 30.** Rekombinant exprimiertes wtPrP weist eine andere Konformation als PrP-M204S auf.

WtPrP und PrP-M204S wurden in *E.Coli* exprimiert, gereinigt und oxidiert. (A) PrP wurde auf einem SDS-Gel analysiert und das Gel mit Coomassie gefärbt. (B) Rekombinant exprimiertes PrP wurde mit Protease K (1  $\mu$ g/ml) für die angegebene Zeit (min PK) verdaut. Die Proben wurden auf einem SDS-Gel analysiert und das Gel mit Coomassie gefärbt. Das proteolytische Fragment in r-wtPrP ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Markerbanden (M) repräsentieren die Größen 50, 36, 22 und 16 kDa.

Rekombinant gereinigtes wtPrP und PrP-M204S werden gleich stark exprimiert (Abb. 30, A). Nach Verdünnung der Proben in wässrigen Puffer wurde ein PK-Verdau durchgeführt. Nur bei r-wtPrP kann ein ca. 15 kDa großes Fragment detektiert werden

(r-wtPrP, min PK 5-30); dieses Fragment ist wahrscheinlich der strukturierte C-terminale Bereich des Proteins. Da kein Fragment bei r-PrP-M204S entstand, deutet dies auf eine unterschiedliche Konformation von wtPrP und PrP-M204S hin.

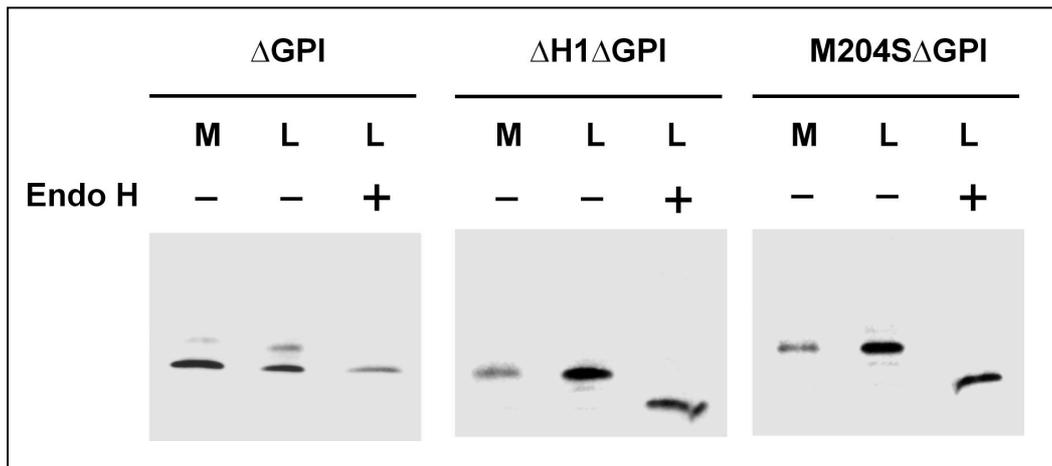
Daher kann man zusammenfassend festhalten, dass eine hydrophobe Seitenkette in Helix 3 für die Glykosylierung von PrP<sup>C</sup> wichtig ist. Ein sanfter proteolytischer Verdau von rekombinant exprimierten Protein deutet zudem auf eine unterschiedliche Konformation hin. Wenn man die vorangegangenen Analysen betrachtet, liegt dieses Verhalten wahrscheinlich an der Destabilisierung der Helix 1, welche einen wichtigen Beitrag für die Prozessierung der Zucker und die Faltung von PrP<sup>C</sup> hat.

#### **4.2.6. Die Glykosylierung von PrP wird von der C-terminalen Signalsequenz, der Faltung von PrP und der Membranverankerung bestimmt**

##### **4.2.6.1. Eine Deletion oder Destabilisierung von Helix 1 bewirkt eine Core Glykosylierung von PrP $\square$ GPI**

Wie unter Kapitel 4.2.3. beschrieben erfolgt nach Deletion von Helix 1 keine Membranverankerung. Daher wurden weitere Mutanten in die Untersuchung miteinbezogen, die keine GPI-Anker-Signalsequenz besitzen. Es ist aus vorausgegangenen Studien bekannt, dass die Deletion von dem GPI-Anker die Ausbildung einer unglykosylierten, unlöslichen Form von PrP zur Folge hat (siehe Kapitel 4.1.1.) (Rogers *et al.* 1993; Kocisko *et al.* 1994; Blochberger *et al.* 1997; Walmsley *et al.* 2001). In *in vitro*-Versuchen konnte gezeigt werden, dass diese missgefaltete Form von  $\square$ GPI-PrP bevorzugt in eine PK-resistente PrP Isoform umgewandelt wird.

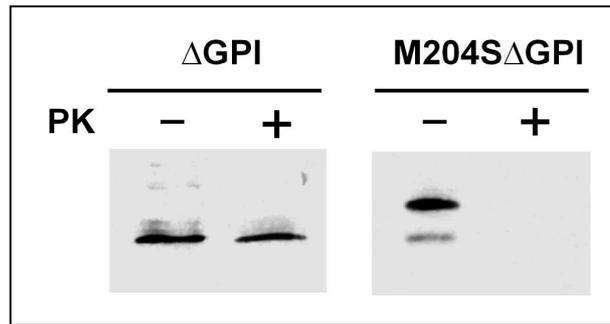
In der folgenden Studie wurden verschiedene PrP-Konstrukte, die alle das Fehlen der GPI-Anker-Signalsequenz gemeinsam haben ( $\square$ GPI), miteinander verglichen.



**Abbildung 31.** Eine Deletion oder Destabilisierung von Helix 1 in PrP- $\square$ GPI ruft eine Core Glykosylierung hervor.

N2a-Zellen wurden transient mit folgenden Konstrukten transfiziert; in  $\square$ GPI wurde die GPI-Anker-Signalsequenz deletiert, in  $\square$ H1 $\square$ GPI bzw. M204S $\square$ GPI wurde zusätzlich die Helix 1 deletiert bzw. destabilisiert. Um sekretierte Proteine zu analysieren, wurden die Zellen 3 Stunden in frischem Medium inkubiert und anschließend präzipitiert (M). Für die Untersuchung des Glykosylierungszustandes wurde ein EndoH-Verdau durchgeführt (L, EndoH+). Die Proteine wurden mittels Western Blot analysiert.

Es ist klar erkennbar, dass  $\square$ GPI effizient in das Zellkulturmedium sekretiert wird (Abb. 31,  $\square$ GPI, M), wie das bei fehlender Membranverankerung zu erwarten ist. PrP- $\square$ GPI liegt außerdem vornehmlich als unglykosylierte Form vor ( $\square$ GPI, L, EndoH -/+). Bei Deletion von Helix 1 in  $\square$ GPI ist überraschenderweise nach EndoH-Behandlung eine erhöhte elektrophoretische Mobilität erkennbar. In diesem Fall liegt das Protein also nicht unglykosyliert vor, sondern es wurde bis zur High Mannose Form glykosyliert. Bezugnehmend auf die vorher beschriebenen Punktmutationen (vgl. Kapitel 4.2.5.) wurde auch M204S in  $\square$ GPI mutiert (M204S $\square$ GPI). Auch hier ist eine Core Glykosylierung festzustellen (M204S $\square$ GPI, L, EndoH - / +). Daher scheint Helix 1 eine entscheidende Rolle in der Glykosylierung von  $\square$ GPI auszuüben. Um zu analysieren, ob  $\square$ GPI und M204S $\square$ GPI in unterschiedlichen Konformationen vorliegen, wurde ein proteolytischer Verdau durchgeführt.



**Abbildung 32.** Helix 1 ist für die Bildung von PK-resistenten Aggregaten verantwortlich.  $\Delta$ GPI und M204 $\Delta$ GPI exprimierende Zellen wurden lysiert und einem Proteinase K-Verdau (1:100, auf Eis, 1Stunde) unterzogen. Verbleibendes PrP wurde mit einem Western Blot analysiert.

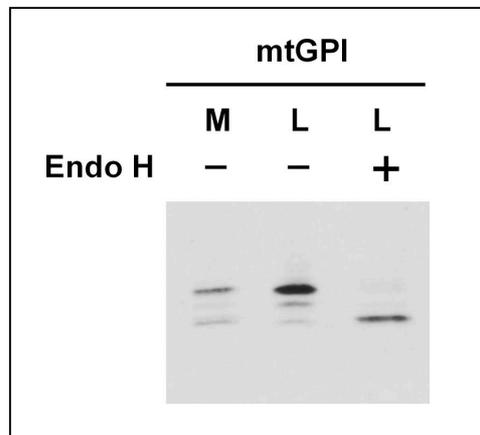
PrP- $\Delta$ GPI ist resistent gegenüber Proteinase K (Abb. 32,  $\Delta$ GPI, PK +), wohingegen nach Destabilisierung der Helix 1 in  $\Delta$ GPI das Protein sensitiv gegen Proteinase K ist (M204S $\Delta$ GPI, PK +).

Diese Ergebnisse zeigen, dass im Gegensatz zu PrP $\Delta$ GPI, PrP- $\Delta$ H1 $\Delta$ GPI und PrP-M204S $\Delta$ GPI glykosyliert sind. Die Deletion oder Destabilisierung von Helix 1 kann also eine Core Glykosylierung in  $\Delta$ GPI *in vivo* bewirken.

#### 4.2.6.2. Die C-terminale Signalsequenz und die Membranverankerung sind für die Glykosylierung ausschlaggebend

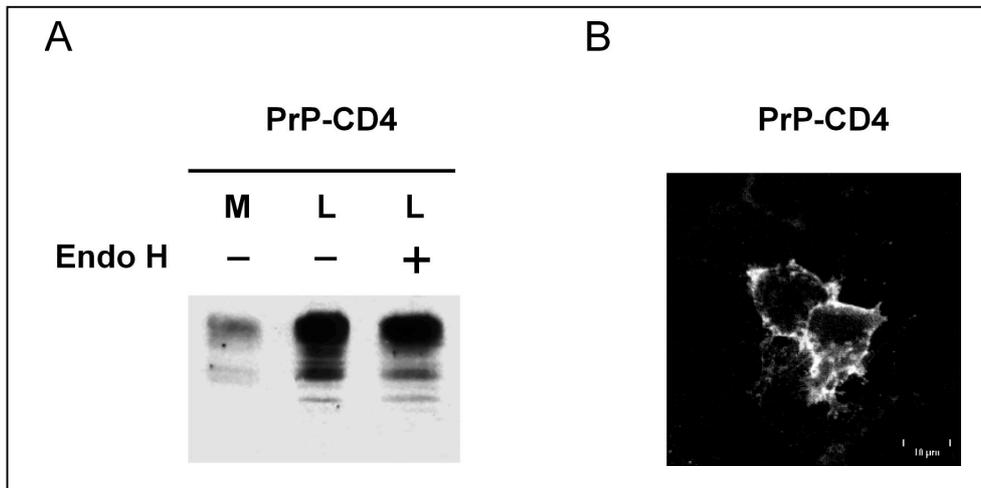
Es ist bekannt, dass der Abstand von den Glykosylierungsstellen zum C-terminalen Ende eines Proteins die Effizienz der Glykosylierung beeinflusst (Whitley *et al.* 1996). Dieser Abstand muss groß genug sein, damit das aktive Zentrum der Oligosaccharyltransferase vor Kettentermination erreicht werden kann. Im Prion Protein befinden sich die beiden Glykosylierungsstellen Asn<sup>180</sup> und Asn<sup>196</sup> sehr nahe an dessen C-terminalen Ende. Um einen möglichen Einfluss dieser Entfernung zum C-Terminus zu untersuchen, wurde eine weitere Mutante - mtGPI - in die Studien einbezogen. Bei mtGPI ist die GPI-Anker Schnitt-/Anheftungsstelle ( $\square$ -site) der GPI-Anker-Signalsequenz mutiert. Durch den Austausch von den Serinen an den

Positionen 230-232 durch Threonine wurde die  $\square$ -site so verändert, dass diese nicht mehr funktionsfähig ist (Nuoffer *et al.* 1993). Bei mtGPI ist somit der Abstand der Glykosylierungsstellen zum C-Terminus genauso groß wie bei wt PrP, doch eine Anheftung des GPI-Ankers ist nicht möglich.



**Abbildung 33.** Ein nicht funktionaler GPI-Anker führt zu einer Core Glykosylierung. Die Mutante mtGPI, welche eine veränderte  $\square$ -site der GPI-Anker-Signalsequenz aufweist, wurde in N2a-Zellen transient transfiziert und wie bei Abb. 31 beschrieben analysiert.

mtGPI ist glykosyliert, wie aus dem EndoH-Verdau in Abb. 33 hervorgeht. Somit hat offensichtlich die Entfernung der Glykosylierungsstellen vom C-terminalen Ende einen Einfluss auf die Glykosylierung. Da aber mtGPI EndoH sensitiv ist (Abb. 33, EndoH +), und somit nicht komplex glykosyliert wird, stellt sich die Frage, ob nun eine Verankerung an der Plasmamembran für eine komplexe Glykosylierung notwendig ist. Um dies zu analysieren, wurde ein heterologer CD4-Anker anstelle der GPI-Anker-Signalsequenz an den C-Terminus des Prion Proteins fusioniert.



**Abbildung 34.** Ein heterologer CD4-Anker am PrP ruft komplexe Glykosylierung hervor und PrP-CD4 ist an der Zelloberfläche lokalisiert.

Das PrP-CD4 Konstrukt wurde transient in N2a Zellen transfiziert. (A) Das Zellkulturmedium und das Zellysate wurde wie in Abb. 31 beschrieben analysiert. (B) Die Lokalisierung des PrP-CD4-Konstrukts wurde mit Hilfe von indirekter Immunfluoreszenz mit einem konfokalen Mikroskop untersucht.

Wie aus vorausgegangenen Studien (Taraboulos *et al.* 1995; Kaneko *et al.* 1997) erwartet, ist PrP-CD4 komplex glykosyliert (Abb. 34, A) und an der Plasmamembran lokalisiert (Abb. 34, B). Damit verhält sich PrP mit einem heterologen Membrananker (CD4) genauso wie wtPrP, das mit einem GPI-Anker an die Membran verankert ist.

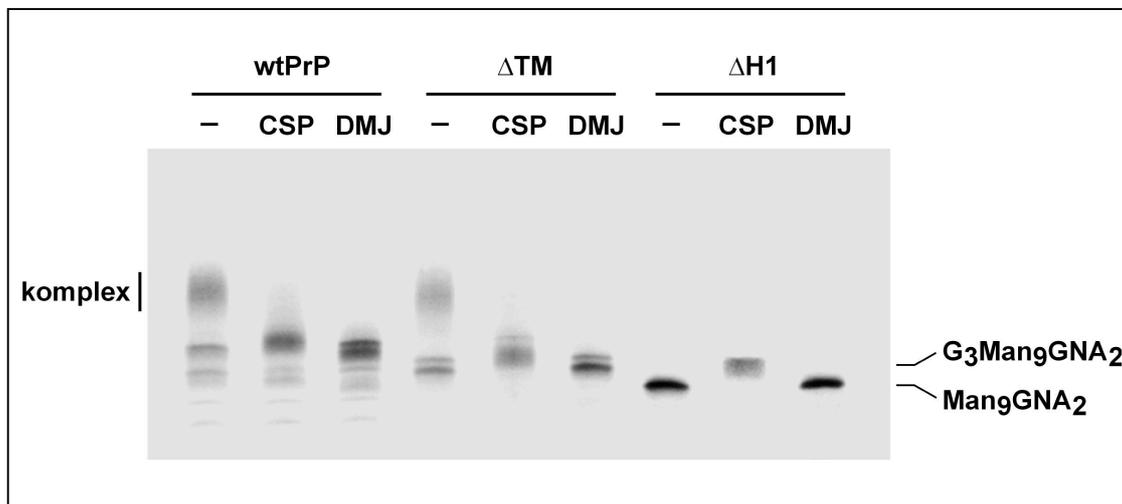
Abschließend ist festzuhalten, dass die Glykosylierung von wtPrP von der C-terminalen Signalsequenz, der Faltung von PrP und der Membranverankerung bestimmt wird.

Core Glykosylierung kann durch einen nicht funktionalen GPI-Anker (mtGPI) oder auch durch eine Missfaltung (H1GPI, M204SGPI) hervorgerufen werden. Also ist nicht nur das C-terminale Ende für die Glykosylierung verantwortlich, sondern auch die Faltung des Proteins. Für eine komplexe Glykosylierung ist jedoch eine Membranverankerung, sei es durch einen GPI-Anker oder durch einen anderen funktionalen Anker (CD4), unerlässlich.

#### 4.2.7. Die drei endständigen Glukoseeinheiten werden initial getrimmt

In einem weiteren Schritt wurde das initiale Trimming von den endständigen Glukoseeinheiten näher betrachtet. Das Abschneiden der letzten drei Glukoseeinheiten von dem Core Glykan wird als ein Anzeichen für eine erfolgreiche Faltung der entstehenden Polypeptidkette gewertet (Parodi 2000; Helenius und Aebi 2001). Um diese Modifikation zu untersuchen, wurden die ER-Glykosidasen mit der Substanz Castanospermin (CSP) gehemmt (Pan *et al.* 1983). Hierdurch wird die Abspaltung der drei endständigen Glukoseeinheiten vom Core Glykan unterbunden. Durch Behandlung der Zellen mit 1-Desoxymannojirimycin (DMJ) entstehen High Mannose Formen, welche nicht weiter modifiziert werden können (siehe Kapitel 1.3.2.).

Die verschiedenen PrP Konstrukte wurden radioaktiv markiert und anschließend mittels Immunpräzipitation analysiert.



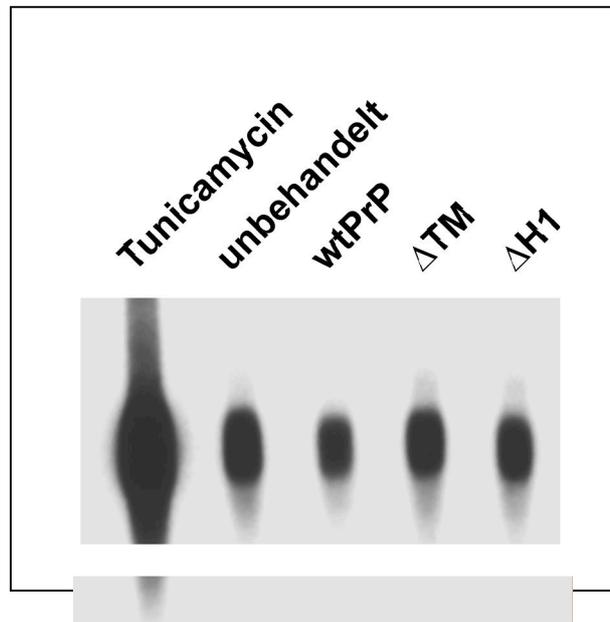
**Abbildung 35.** Die letzten drei Glukoseeinheiten werden bei unreifem PrP erfolgreich geschnitten. N2a Zellen wurden transient mit den Konstrukten wtPrP,  $\Delta$ TM-PrP und  $\Delta$ H1-PrP transfiziert. Die Zellen wurden während des Hungerns und der radioaktiven [ $^{35}$ S]-Markierung mit Castanospermin (CSP) bzw. 1-Desoxymannojirimycin (DMJ) inkubiert. Anschließend wurde das Protein immunpräzipitiert und mit unbehandelten Proben (-) verglichen. Die unterschiedlichen Glykosylierungsformen sind an den Seiten angedeutet; komplex: komplex glykosylierte Glykane; G<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GNA<sub>2</sub>: Core Glykan mit 2 N-Acetylglucosamin- (GNA), 9 Mannose- (Man) und 3 terminalen Glukoseeinheiten (G); Man<sub>9</sub>GNA<sub>2</sub>: Core Glykan ohne die 3 terminalen Glukoseeinheiten.

Nach Inkubation mit CSP bzw. DMJ werden die ER-Glykosidasen bzw. die  $\alpha$ -Mannosidase 1 gehemmt, wodurch die Modifikation der Zucker im ER gestoppt wird und somit die Ausbildung von komplex glykosylierten Strukturen verhindert wird (Abb. 35, wtPrP,  $\Delta$ TM). Wie bereits in Kapitel 4.2.1. beschrieben wird PrP- $\Delta$ H1 nicht komplex glykosyliert, hier entsteht nur eine High Mannose Form. Vergleicht man nun die Größe der mit CSP und DMJ entstehenden Banden (wtPrP,  $\Delta$ TM,  $\Delta$ H1) so kann man feststellen, dass die nach CSP-Behandlung entstehende Bande jeweils etwas größer ist. Dies ist auf die drei zusätzlichen Glukoseeinheiten an jeder der beiden Glykosylierungsstellen zurückzuführen. Wie nach Behandlung mit DMJ zu erkennen ist, wurden bei allen Konstrukten die endständigen Glukoseeinheiten abgespalten. Es lässt sich festhalten, dass auch bei  $\Delta$ H1 das initiale Trimmen der drei Glukoseeinheiten am Core Glykan stattfindet.

#### **4.2.8. Missgefaltetes PrP aktiviert die Unfolded Protein Response nicht**

Um zu untersuchen, wie sich die Expression der verschiedenen PrP Mutanten auf die Zelle auswirkt, wurde der Einfluss auf die *Unfolded Protein Response* (UPR) analysiert.

Akkumulieren unreife oder missgefaltete Proteine im ER, so besitzt die Zelle einen Mechanismus, um diese zu eliminieren: Die *Unfolded Protein Response* (UPR)(vgl. Kapitel 1.3.3.). Ein Merkmal für die Aktivierung der UPR ist die erhöhte Transkription verschiedener Gene wie z.B. von dem ER-Chaperone BiP (Ma und Hendershot 2001; Patil und Walter 2001).



**Abbildung 36.** Die Unfolded Protein Response wird nicht aktiviert. Um die Hochregulierung von BiP zu untersuchen, wurde RNA aus transfizierten Zellen (wtPrP,  $\Delta$ TM,  $\Delta$ H1) extrahiert und mittels eines Northern Blotes analysiert. Membran-gebundene RNA wurde mit einer  $^{32}$ P-markierten DNA-Sonde, die spezifisch für Maus-BiP war, hybridisiert. Als Positivkontrolle dienten Zellen, die vor der RNA-Extraktion 6 Stunden mit Tunicamycin (10  $\mu$ g/ml) inkubiert wurden.

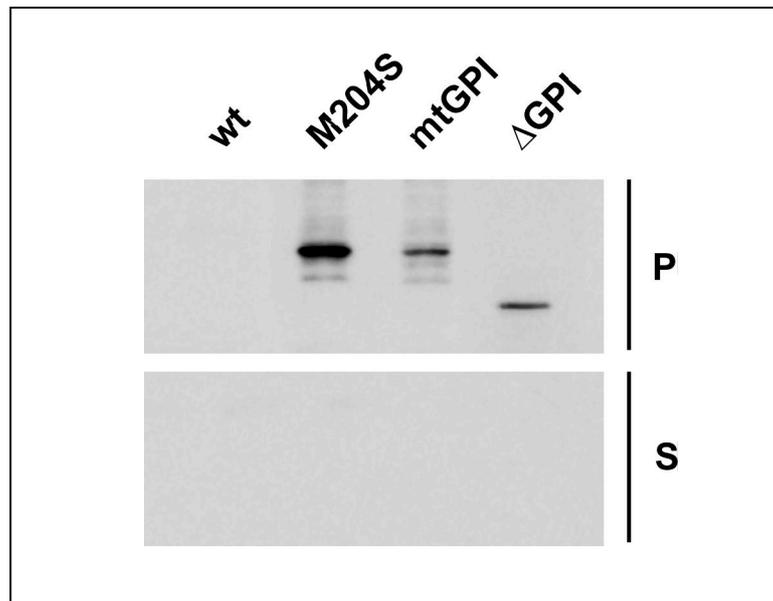
Der BiP-mRNA-Gehalt wurde mittels Northern Blot untersucht. Aus Abb. 36 ist ersichtlich, dass bei keiner der untersuchten Mutanten (wtPrP,  $\Delta$ TM,  $\Delta$ H1) die Transkription von BiP erhöht wird. Nur bei der Positivkontrolle kann eine Hochregulierung von BiP-mRNA festgestellt werden (Abb. 36, Tunicamycin).

Somit kann man zusammenfassen, dass  $\Delta$ H1 im ER nicht als missgefaltetes oder unreifes Protein erkannt wird und daher die *Unfolded Protein Response* nicht aktiviert wird.

#### 4.2.9. Sekretiertes PrP kann von Zellen wiederaufgenommen werden

Um das Schicksal von sekretierten PrP Molekülen weiter zu untersuchen, wurde analysiert, ob Zellen in der Lage sind sekretiertes PrP wiederaufzunehmen. Hierfür

wurden transfizierte Zellen mit frischem Medium inkubiert. Dieses Medium, welches sekretierte PrP Moleküle enthält, wurde auf untransfizierte Zellen gegeben. Nach 24 Stunden Inkubation wurde untersucht, ob die Zellen in der Lage sind, das sekretierte Protein wiederaufzunehmen. Durch den monoklonalen 3F4-Antikörper ist es möglich, endogenes PrP von exogenem PrP zu unterscheiden.



**Abbildung 37.** Sekretiertes PrP kann von den Zellen wiederaufgenommen werden. Transient transfizierte Zellen (wt, M204S, mtGPI,  $\Delta$ GPI) wurden 3 Stunden in frischem Medium kultiviert. Dieses Zellkulturmedium, welches sekretierte Proteine enthält, wurde auf untransfizierte Zellen gegeben. Nach einer 24-stündigen Kultivierung wurden die Zellen geerntet und durch eine Zentrifugation in eine lösliche (S) und eine unlösliche (P) Fraktion aufgetrennt. Die Proben wurden auf einem Western Blot mit dem 3F4-Antikörper analysiert.

Sekretiertes PrP-M204S, PrP-mtGPI und PrP- $\Delta$ GPI kann von den heterologen Zellen aufgenommen werden (Abb. 37, M204S, mtGPI,  $\Delta$ GPI). Interessanterweise kann dieses Protein ausschließlich in der unlöslichen Fraktion gefunden werden (M204S, mtGPI,  $\Delta$ GPI, P). wtPrP ist durch den GPI-Anker an die Plasmamembran verankert, daher erfolgt keine Sekretion in das Zellkulturmedium und somit ist auch keine Wiederaufnahme durch heterologen Zellen möglich (wt).

#### 4.2.10. Zusammenfassung

Die hier beschriebenen Ergebnisse zeigen zum ersten Mal, dass Helix 1 des Prion Proteins eine entscheidende Bedeutung für die Faltung und Prozessierung von PrP hat. Während sowohl die gesamte unstrukturierte Domäne des PrP als auch die potenzielle Transmembrandomäne keinen Einfluss auf die komplexe Glykosylierung und die Anheftung eines GPI-Ankers haben, stellt die Ausbildung der Helix 1 einen entscheidenden Schritt bei der Maturierung dar. Eine Abwesenheit oder Deletion dieser Helix 1 (M204S oder  $\Delta$ H1) führt zur Ausbildung von High Mannose Strukturen, welche nicht in komplexe Glykane umgewandelt werden können. Desweiteren kann nach Deletion von Helix 1 kein GPI-Anker angeheftet werden, was eine Sekretion der High Mannose Formen zur Folge hat. Das missgefaltete PrP ( $\Delta$ H1, M204S) wird von den Qualitätskontrollmechanismen im ER (Calnexin-Zyklus und UPR) nicht erkannt. Interessanterweise kann dieses sekretierte Protein von heterologen Zellen wieder aufgenommen werden. Die Versuche deuten zudem darauf hin, dass eine Umwandlung in komplexe Glykane nur bei einer Membranverankerung erfolgt. Ist die GPI-Anker-Signalsequenz deletiert ( $\Delta$ GPI), so trägt Helix 1 offensichtlich zur Ausbildung von unglykosylierten und teilweise PK-resistenten Aggregaten bei. Es konnte beobachtet werden, dass nach Deletion der Helix 1 das unverankerte Protein ( $\Delta$ GPI) wieder Core glykosyliert wird. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die GPI-Anker-Signalsequenz unabhängig von ihrer Aufgabe der GPI-Anker-Anheftung, die Core Glykosylierung beeinflusst.

Diese Studie deutet auf eine zweiseitige Rolle von Helix 1 bei der Reifung und Aggregation von PrP hin und stellt die wichtige Rolle der Membranverankerung bei der Umwandlung in komplexe Glykane dar.

## 5. Diskussion

Transmissible spongiforme Enzephalopathien (TSE) sind tödlich verlaufende neurodegenerative Erkrankungen. Sie manifestieren sich durch die Ablagerung des missgefalteten Prion Proteins (PrP<sup>SC</sup>) im Gehirn und durch eine progressive Degeneration von Nervenzellen. Obwohl der Mechanismus dieser Neurodegeneration bislang nicht bekannt ist, spielt die Missfaltung des zellulären Prion Proteins (PrP<sup>C</sup>) eine zentrale Rolle bei der Pathogenese. Eine Determinierung derjenigen Faktoren, welche die Umwandlung in das missgefaltete PrP verursachen, ist daher entscheidend für das Verständnis der Pathogenese. Kürzlich konnten zwei weitere missgefaltete Formen des PrPs, <sup>C<sup>tm</sup></sup>PrP und zytosolisches PrP, gefunden werden, die in Abwesenheit von PrP<sup>SC</sup> zur Neurodegeneration führen.

In der vorliegenden Studie wurde der physiologische Faltungsweg von PrP<sup>C</sup> sowie der Einfluß verschiedener Domänen des PrPs auf dessen Missfaltung untersucht. Desweiteren wurde analysiert, welche Faktoren zur Entstehung von zytosolischem PrP beitragen.

### 5.1. Import in das Endoplasmatische Retikulum

Frühere Arbeiten zeigen, dass die Biogenese des PrPs von Mutationen in der Signalsequenz und in der Transmembrandomäne beeinflusst wird, indem die Topologie an der ER-Membran verändert wird (Hegde *et al.* 1998a; Kim *et al.* 2001). Im ersten Teil dieser Arbeit konnte durch die Untersuchung des ER-Imports von PrP Mutanten ein weiterer entscheidender Faktor für die Biogenese identifiziert werden. Die Ergebnisse zeigen, dass wichtige Informationen für den ER-Import im strukturierten C-terminalen Teil des Prion Proteins vorzufinden sind. Fehlen diese Informationen, so kommt es zu einem mangelndem Import in das ER, was die Entstehung von zytosolischem PrP nach sich zieht. Die Effizienz des ER-Importes nimmt ab je kleiner der strukturelle Anteil ist (vgl. Kapitel 4.1.) (siehe Abb. 38). Die S230Stop Mutante wird effizient in das ER importiert. Die beiden pathogenen

Mutanten Q159Stop und W144Stop weisen zwei Formen auf, wobei nur eine Form prozessiert und in das ER importiert wird. A115Stop wird hingegen überhaupt nicht in das ER importiert. Interessanterweise wird die kürzeste analysierte Mutante, die den strukturierten C-Terminus umfasst ( $\Delta$ 27-156/S230Stop) effizient in das ER importiert (Abb. 19). Im Gegensatz zu dem isolierten N-Terminus wird der strukturierte C-Terminus also quantitativ importiert. Der Import in das ER ist somit offensichtlich nicht von der Länge der Polypeptidkette abhängig, sondern vielmehr scheint die Struktur von Bedeutung zu sein.

|   |  | Zytosol | ER | Degradierung durch das Proteasom | Sekretion |
|---|--|---------|----|----------------------------------|-----------|
| <b>S230Stop</b>                           |  |         |    |                                  |           |
| <b><math>\Delta</math>N/S230Stop</b>      |  | -       | +  | -                                | +         |
| <b><math>\Delta</math>27-156/S230Stop</b> |  |         |    |                                  |           |
| <b>Q159Stop</b>                           |  | +       | +  | +                                | +         |
| <b>W144Stop</b>                           |  |         |    |                                  |           |
| <b>A115Stop</b>                           |  | +       | -  | +                                | -         |
| <b>P101Stop</b>                           |  | +       | -  | +                                | -         |

**Abbildung 38.** Faktoren für den PrP Import *in vivo*.

Diese Abbildung zeigt eine Zusammenfassung der im ersten Teil dieser Arbeit untersuchten PrP Mutanten. Basierend auf der Effizienz des ER-Importes können drei Klassen unterschieden werden. Die erste Gruppe beinhaltet das strukturierte Helix 2 - Loop - Helix 3 - Motiv und wird erfolgreich in das ER importiert. Die zweite Gruppe, welche die pathogenen Mutanten Q159Stop und W144Stop umfasst, beinhaltet nur einen Teil des strukturierten C-Terminus. Diese Mutanten werden in zwei Formen exprimiert; eine Form hat eine ungeschnittene Signalsequenz, während die andere N-terminal prozessiert wird. In der dritten Gruppe fehlen jegliche Strukturelemente des C-Terminus; diese Mutanten werden nicht prozessiert und verbleiben im Zytosol.

### 5.1.1. Information im C-terminalen Teil des PrP ist für den Import in das ER notwendig

In den hier dargestellten Ergebnissen konnte der C-Terminus des PrPs als ein weiterer wichtiger Faktor für die Maturierung identifiziert werden. Diese Domäne ist dafür verantwortlich, ob das Protein überhaupt in das ER importiert wird oder nicht. Es konnte festgestellt werden, dass nur Formen mit geschnittener Signalsequenz erfolgreich in das ER importiert werden (siehe Kapitel 4.1.3.). Somit steht das Schneiden der Signalsequenz in direktem Zusammenhang mit dem ER-Import. Die charakterisierten Mutanten des PrPs unterscheiden sich sowohl in der Länge als auch im Vorhandensein des strukturierten C-Terminus, welcher die GPI-Anker-Signalsequenz, zwei Glykosylierungsstellen und das geordnete Helix 2 -Loop-Helix 3 -Motiv enthält. Die GPI-Anker-Signalsequenz hat offensichtlich keinen Einfluss auf den Import, da diese in allen untersuchten Mutanten fehlt. Konstrukte ohne GPI-Anker-Signalsequenz (S230Stop,  $\Delta$ 27-156/S230Stop,  $\Delta$ N/S230Stop) (vgl. Kapitel 4.1.5.) werden genauso in das ER importiert wie Konstrukte mit GPI-Anker-Signalsequenz (wt,  $\Delta$ N,  $\Delta$ H1, M204S) (vgl. Kapitel 4.2.1.).

Eine Analyse des Glykosylierungsstatus zeigt, dass auch dieser den ER-Import nicht beeinflusst. Die Mutante  $\Delta$ 27-156/S230Stop wird glykosyliert (vgl. Abb.19),  $\Delta$ N/S230Stop und S230Stop sind dagegen vorwiegend unglykosyliert (vgl. Abb. 18); jedoch werden alle diese Mutanten erfolgreich in das ER importiert. Offensichtlich hängt der Glykosylierungsstatus jedoch von Ereignissen während des Imports ab (siehe Kapitel 5.2.)

Um zu untersuchen, ob die Länge der Mutante *per se* für die fehlende Prozessierung verantwortlich ist oder nicht, wurde A115Stop mit der noch kürzeren Mutante  $\Delta$ 27-156/S230Stop verglichen. Während A115Stop nicht in das ER importiert wird (vgl. Kapitel 4.1.3.), konnte interessanterweise bei  $\Delta$ 27-156/S230Stop ein effizienter Import in das ER festgestellt werden (vgl. Kapitel 4.1.5.). Die Länge des Proteins ist somit für die Effizienz des ER-Importes nicht entscheidend. Vergleicht man A115Stop und  $\Delta$ 27-156/S230Stop so wird ersichtlich, dass bei  $\Delta$ 27-156/S230Stop im Gegensatz zu A115Stop die strukturierte C-terminale Domäne samt des Helix 2 - Loop-Helix 3-Motivs erhalten ist. Dies deutet darauf hin, dass in diesem strukturierten

C-terminalen Bereich wichtige Informationen für den ER-Import liegen. In diesem Zusammenhang ist wichtig zu erwähnen, dass die Faltung des C-Terminus von PrP eine der schnellsten gemessenen Faltungsreaktionen darstellt (Wildegger *et al.* 1999). Wenn man nun die Größe des *exit tunnels* des Ribosoms und die Translokationspore am ER in Betracht zieht (Hamman *et al.* 1997; Liao *et al.* 1997; Menetret *et al.* 2000; Morgan *et al.* 2002), so könnte es möglich sein, dass das Protein bereits vor Eintritt in das ER eine Sekundärstruktur annimmt. Inwiefern dies die Effizienz des ER-Importes beeinflusst, bleibt zu klären. In dem strukturierten C-Terminus könnte ein wichtiges Strukturmerkmal vorhanden sein, welches direkt für eine Interaktion mit der Translokationspore oder anderen Komponenten nötig ist. Hierbei ist zu erwähnen, dass der ER-Import im Falle des Prion Proteins komplexer ist als für gewöhnliche sekretorische Proteine. Während der Transport von Proteinen durch die ER-Membran *in vitro* normalerweise unter Verwendung von gereinigtem Sec61 Komplex, TRAM und SRP-Rezeptor nachvollzogen werden kann (Görlich und Rapoport 1993; Voigt *et al.* 1996a), wird im Falle des Prion Proteins für einen erfolgreichen ER-Import ein weiterer Faktor, der sogenannte TRAP (*translocon-associated protein*)-Komplex benötigt (Fons *et al.* 2003).

Gegenwärtig kann nicht gesagt werden, an welcher Stelle der ER-Import fehlschlägt. So kann es sein, dass die Polypeptidkette nie zur ER-Membran gelangt, oder aber bei der Translokation an der ER-Membran ein Fehler unterläuft. Auch ein retrograder Transport aus dem ER in das Zytosol wäre denkbar. Im Gegensatz dazu zeigen jedoch die *in vitro* -Daten, dass PrP mit ungeschnittener Signalsequenz sensitiv gegenüber einem proteolytischen Verdau ist (siehe Kapitel 4.1.3.), also nicht in ER-Vesikel importiert wird. Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den hier im Zytosol anzutreffenden Formen nicht um retrograd transportierte Formen handelt, die mittels des ERAD-Weges aus dem ER zurück in das Zytosol transportiert wurden.

Die bisher geschilderten Ergebnisse zeigen erstmalig, dass nicht die Länge der Polypeptidkette, sondern das Vorhandensein einer strukturierten Domäne für den Import von PrP entscheidend ist. Diese Erkenntnis legt die Vermutung nahe, dass das Vorhandensein von Strukturmerkmalen generell für einen Import in das ER notwendig ist.

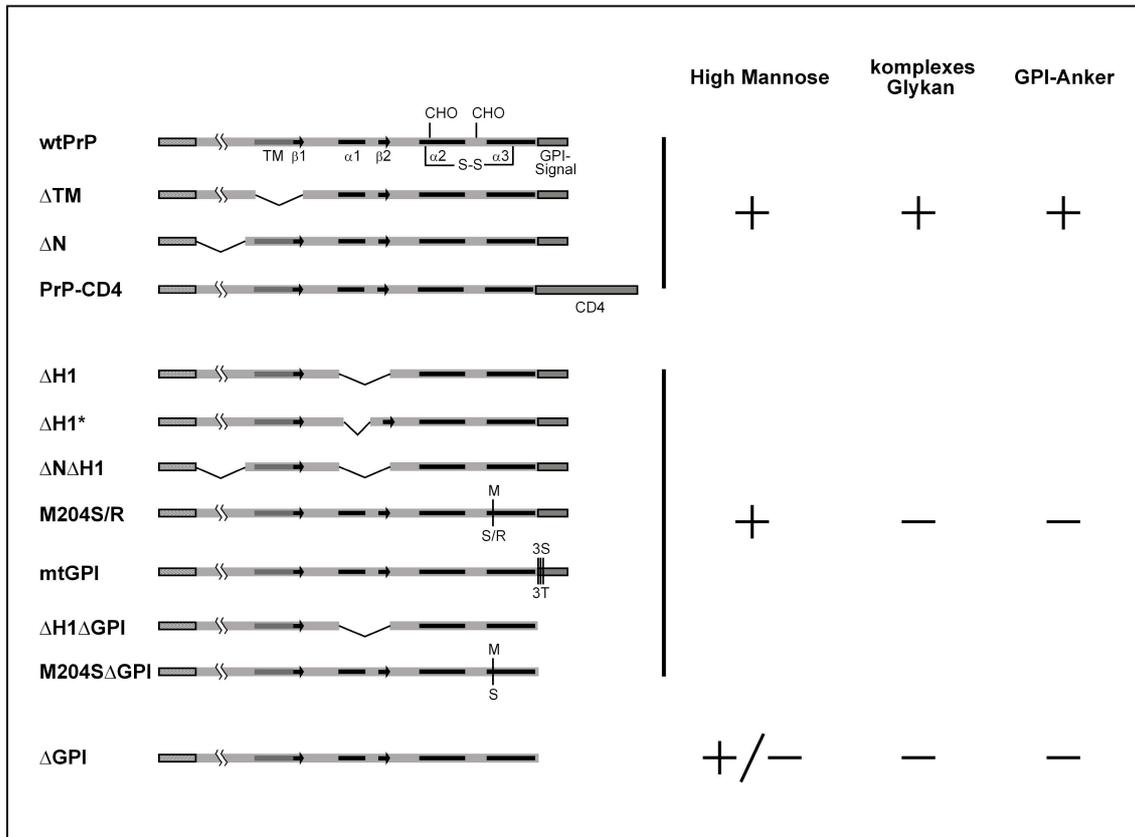
### 5.1.2. Degradierung von PrP durch das Proteasom

Ein weiterer wichtiger Punkt in dieser Studie ist die Degradierung von PrP durch das Proteasom. Es konnte gezeigt werden, dass zytosolisches PrP durch das Proteasom abgebaut wird und dass die Stabilität der PrP-Mutanten mit der Länge des C-Terminus korreliert. Zyto-S230Stop ist am stabilsten, während Zyto-A115Stop am wenigsten stabil ist (siehe Abb. 14). Dies erklärt auch, warum S230Stop auf einem Western Blot detektierbar ist, während A115Stop nur nach Inhibierung des Proteasoms durch MG132 und anschließender Immunpräzipitation detektiert werden kann (vgl. Kapitel 4.1.2.). Aus der Analyse der pathogenen Mutanten wurde ersichtlich, dass der mangelnde ER-Import und die proteasomale Degradierung in direktem Zusammenhang mit der ungeschnittenen ER-Signalsequenz stehen (vgl. Kapitel 4.1.2. und Kapitel 4.1.3.). Diese Mutanten liegen in zwei Formen vor, wobei nur die unprozessierte Form, welche nicht in das ER importiert wird, signifikant durch MG 132 stabilisiert werden kann.

Für die Effizienz des proteasomalen Abbaus scheint die Länge der Polypeptidkette von Bedeutung zu sein. Es bedarf weiterer Analysen, um zu klären, ob die Länge *per se* oder auch hier das Vorhandensein von Strukturmerkmalen die Effizienz des proteasomalen Abbaus beeinflusst.

## 5.2. Faltung im Endoplasmatischen Retikulum

Nachdem im ersten Teil der vorliegenden Arbeit der ER-Import untersucht wurde, wurde im zweiten Teil die Maturierung im ER/Golgi-Kompartiment analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass Helix 1 und die GPI-Anker-Signalsequenz wichtige Faktoren für die Glykosylierung und Faltung von PrP darstellen.



**Abbildung 39.** Faktoren für die Faltung von PrP *in vivo*.

Diese Abbildung zeigt eine Zusammenfassung aller im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit untersuchten PrP-Mutanten. Wie wt PrP werden Mutanten ohne die Transmembrandomäne (ΔTM) oder ohne den N-Terminus (ΔN) komplex glykosyliert und GPI verankert. Der GPI-Anker kann durch einen heterologen CD4-Anker ersetzt werden (PrP-CD4) ohne die posttranslationalen Modifikationen zu beeinträchtigen. Eine zweite Gruppe von PrP-Mutanten zeichnet sich durch eine fehlende oder destabilisierte Helix 1 aus. Diese Mutanten werden zwar Core glykosyliert, doch die High Mannose Strukturen können nicht in komplexe Glykane umgewandelt werden. Auch die Anheftung eines GPI-Ankers scheitert. Eine dritte Gruppe entsteht durch die Deletion der GPI-Anker-Signalsequenz. ΔGPI liegt vorwiegend unglykosyliert vor. Eine Deletion oder Destabilisierung der ersten Helix kann die Core Glykosylierung von ΔGPI hervorrufen (ΔH1ΔGPI und M204SΔGPI).

Wie aus Abbildung 39 ersichtlich wird, konnten drei unterschiedliche Glykosylierungsformen des PrPs beobachtet werden: komplex glykosyliert, High Mannose Glykan und unglykosyliert.

### 5.2.1. Die Core Glykosylierung von PrP<sup>C</sup> ist von der C-terminalen Signalsequenz abhängig

Die Übertragung der Core Glykane findet statt, wenn sich die Polypeptidkette noch am Translocon befindet (siehe Kapitel 1.3.2.). Ob Oligosaccharide an die Glykosylierungsstellen angehängt werden können, wird vom Abstand der Glykosylierungsstellen zum C-terminalen Ende beeinflusst (Whitley *et al.* 1996). Im Falle des Prion Protein liegen die beiden Glykosylierungsstellen an den Positionen Asn180 und Asn196 (Stimson *et al.* 1999) und somit sehr nahe am C-terminalen Ende des Proteins. Ist die GPI-Anker-Signalsequenz deletiert ( $\square$ GPI entspricht einer Deletion von aa 230-256), so liegt der C-Terminus anscheinend zu nahe an den Glykosylierungsstellen und das Protein ist vorwiegend unglykosyliert. Somit ist die GPI-Anker-Signalsequenz offensichtlich nicht nur für die Ausbildung eines GPI-Ankers, sondern auch für die erfolgreiche Core Glykosylierung notwendig. Diese Hypothese konnte durch die Expression von PrPmtGPI mit einer mutierten, nicht funktionalen Signalsequenz bestätigt werden (siehe Kapitel 4.2.6.). Höchstwahrscheinlich durch die zusätzlichen C-terminalen Aminosäuren bei mtGPI ist eine Core Glykosylierung möglich. Doch nur im Falle von wtPrP scheint die GPI-Anker-Signalsequenz eine Rolle bei der Glykosylierung zu spielen. Sobald Helix 1 zusätzlich zur GPI-Anker-Signalsequenz deletiert ( $\square$ H1 $\square$ GPI) oder destabilisiert (M204S $\square$ GPI) ist, kann eine Core Glykosylierung beobachtet werden (siehe Kapitel 4.2.6.). Hier sei anzumerken, dass die Faltung des C-Terminus von PrP eine der schnellsten bisher messbaren Faltungsreaktionen darstellt (Wildegger *et al.* 1999).  $\square$ GPI wird möglicherweise wegen der C-terminalen Verkürzung schneller als wtPrP oder mtPrP vom Translocon freigesetzt und faltet schnell. Damit bleibt den Enzymen, welche die Übertragung des Core Glykans katalysieren, nicht genügend Zeit, um angreifen zu können. Anders verhält es sich sobald Helix 1 deletiert ist. In diesem Falle wird die Faltung verzögert, und eine Übertragung des Core Glykans kann stattfinden. In einer früheren Studie (Walmsley *et al.* 2001) wurde die Möglichkeit diskutiert, dass das Anheften des GPI-Ankers und die Übertragung der Core Glykane kooperative Prozesse darstellen. Dies scheint jedoch nicht der Fall zu sein, da eine Core Glykosylierung ohne gleichzeitige Anheftung des GPI-Ankers beobachtet werden kann (mtGPI,  $\square$ H1 $\square$ GPI und M204S $\square$ GPI).

### **5.2.2. Die Faltung von PrP beeinflusst das Anheften eines GPI-Ankers**

In der vorliegenden Studie konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass neben der GPI-Anker-Signalsequenz auch die Konformation des Proteins einen entscheidenden Einfluss auf das Anheften des GPI-Ankers hat. So konnte bei  $\Delta$ H1 trotz vorhandener funktioneller GPI-Anker-Signalsequenz kein GPI-Anker angehängt werden (siehe Kapitel 4.2.3.). In diesem Fall verhindert die durch Zerstörung der Helix 1 ( $\Delta$ H1) hervorgerufene Fehlfaltung offensichtlich die Übertragung des GPI-Ankers. Interessanterweise konnte auch bei M204S ein Ausbleiben der Membranverankerung festgestellt werden. Die NMR-Struktur deutet darauf hin, dass dies höchstwahrscheinlich auf eine Destabilisierung der ersten Helix zurückzuführen ist (siehe Kapitel 4.2.5.). Somit ruft M204S anscheinend - wie  $\Delta$ H1 - eine Fehlfaltung hervor, wodurch das Fehlen des GPI-Ankers erklärt werden kann. Bemerkenswerterweise konnte durch die Analyse der rekombinant exprimierten Konstrukte wt und M204S ein Unterschied in der proteolytischen Sensitivität gezeigt werden (vgl. Abb. 30). Dies deutet auf eine unterschiedliche Konformation der beiden Konstrukte hin. Daher erscheint es plausibel, dass die Konformationsänderung der Auslöser für die fehlende Anheftung des GPI-Ankers ist. Jedoch könnte es auch sein, dass die Helix 1 direkt im Prozess der GPI-Anker-Anheftung eine Rolle spielt.

### **5.2.3. Eine Membranverankerung ist für die Umwandlung in komplexe Glykane notwendig**

Ein Fehlen des GPI-Ankers äußert sich nicht nur in der ausbleibenden Membranverankerung, sondern auch in der fehlenden Umwandlung von High Mannose Glykanen in komplexe Glykane. So konnte bei keinem der analysierten Konstrukte ohne GPI-Anker eine komplexe Glykosylierungsform gefunden werden. Jedoch ist die komplexe Glykosylierung nicht spezifisch für GPI-verankerte Proteine. Ersetzt man den GPI-Anker durch einen heterologen Anker, wie den Membrananker CD4, so ist auch in diesem Falle die Ausbildung von komplexen Saccharidstrukturen möglich (vgl. Abb. 34). Somit stellt die Membranverankerung einen wichtigen Faktor für die Glykosylierung dar, wobei der Anker eine spezielle Umgebung zu bieten

scheint. Membrankomponenten können direkt an der Faltung beteiligt sein, oder aber indirekt zum Beispiel durch Prävention von intermolekularen PrP Wechselwirkungen von hydrophoben Domänen die Glykosylierung beeinflussen. Interessanterweise wurde kürzlich in zwei *in vitro* Studien gezeigt, dass die Membranumgebung die Struktur von rekombinantem PrP beeinflusst (Morillas *et al.* 1999; Sanghera und Pinheiro 2002).

Aus den vorliegenden Daten wird die Komplexität der Proteinsynthese und der Modifikationen von Proteinen ersichtlich. Einzelne Domänen eines Proteins können drastischen Einfluß auf wichtige biologische Prozesse, wie posttranslationale Modifikationen und die Übertragung eines Membranankers, haben.

### 5.3. Implikationen für Prionerkrankungen

In dieser Arbeit konnten zwei Formen des PrPs beobachtet werden, die zur Entstehung von Prionerkrankungen beitragen könnten: zytosolisches PrP und mißgefaltetes PrP, welches sekretiert wird.

PrP Mutanten, die bei vererbaren Prionerkrankungen auftreten, können den ER-Import beeinflussen. So können Mutationen in der Transmembrandomäne, wie zum Beispiel A117V, eine erhöhte Synthese der transmembranen PrP-Form <sup>Ctm</sup>PrP bewirken. Den beiden in dieser Studie untersuchten pathogenen Mutanten, W144Stop und Q159Stop, fehlen jedoch wichtige Informationen für den Import in das ER, was die Bildung von zytosolischem PrP mit ungeschnittener Signalsequenz zur Folge hat. Es stellt sich die Frage, wie zytosolisches PrP zur Pathogenese von Prionerkrankungen beitragen kann. Aus früheren Studien wird ersichtlich, dass auch andere PrP Konstrukte eine ausbleibende Translokation aufweisen (Kim und Hegde 2002; Drisaldi *et al.* 2003) und nach Inhibierung des Proteasoms sogar ein Teil von wtPrP im Zytosol gefunden werden kann. Vor kurzem wurde gezeigt, dass zytosolisches PrP sowohl in Zellkultur als auch in Mäusen toxisch ist (Ma *et al.* 2002). Wie diese Toxizität entsteht, ist ungeklärt, doch wurde vorgeschlagen, dass zytosolisches PrP durch den Transport in den Zellkern ein toxisches Potential erlangt (Lorenz *et al.* 2002; Gu *et al.* 2003). Eine Studie in Hefe von unserer Arbeitsgruppe weist auf einen anderen Weg hin (Heller *et al.* 2003). Hier konnte gezeigt werden,

dass zytosolisches PrP eine ungeschnittene Signalsequenz hat und mit der ER-Membran assoziiert. Dies führte zu einem verminderten Wachstum. Eine Expression von <sup>C<sup>tm</sup></sup>PrP wurde nicht festgestellt, vielmehr scheint der zytotoxische Effekt in der verlängerten Assoziation mit der ER-Membran begründet zu sein. Interessanterweise beinhaltet auch <sup>C<sup>tm</sup></sup>PrP die Signalsequenz. Es bleibt also zu untersuchen, ob retrograd transportiertes <sup>C<sup>tm</sup></sup>PrP zur Entstehung von zytosolischem PrP beiträgt. Welcher Mechanismus jedoch hinter der Toxizität von zytosolischem PrP steckt und welche Rolle dabei das Proteasom spielt, bleibt zu klären.

Ein weiterer wichtiger Befund in dieser Arbeit ist die Sekretion und Übertragung von missgefaltetem PrP. Laufen die posttranslationalen Modifikationen nur unvollständig ab (unglykosyliert, High Mannose Form), so spricht dies für eine Fehlfaltung. Die Zelle besitzt verschiedene Mechanismen wie zum Beispiel die ER-assoziierte Degradierung (ERAD) (siehe Kapitel 1.3.3.), um fehlgefaltete Proteine aus dem ER zu entfernen. Für die in der vorliegenden Studie analysierten Mutanten konnte keine Eliminierung über den ERAD-Weg festgestellt werden. Vielmehr wurden die missgefalteten Proteine (□H1, M204S und □GPI) in das Zellkulturmedium sekretiert. Somit scheinen diese PrP Mutanten die Qualitätskontrollmechanismen unterlaufen zu haben bzw. von ihnen nicht als missgefaltete Proteine erkannt worden zu sein. Diese Überlegung konnte anhand von zwei Experimenten belegt werden: So wurden bei □TM, □H1, M204S und mtGPI die endständigen Glukoseeinheiten getrimmt. Dies lässt darauf schließen, dass der Calnexin-Zyklus erfolgreich durchlaufen wurde (siehe Kapitel 4.2.7.). Desweiteren konnte keine Hochregulierung des Chaperons BiP festgestellt werden, was eine Eliminierung durch die *Unfolded Protein Response* ausschließt (siehe Kapitel 4.2.8.). Stattdessen wurden die missgefalteten PrP Mutanten in das Zellkulturmedium sekretiert. Interessanterweise konnten sie von heterologen Zellen wiederaufgenommen werden (vgl. Kapitel 4.2.9.). So stellt sich die Frage, ob diese PrP Formen ein toxisches Potential besitzen und welche Auswirkungen sie auf Nachbarzellen haben.

In vielen verschiedenen Studien wurde die physiologische Rolle von PrP<sup>C</sup> analysiert (siehe Kapitel 1.2.8.). Hierbei konnten zum Beispiel eine Rolle beim Kupferhaushalt oder bei der Signalübertragung, und auch Protein-Protein Wechselwirkungen festgestellt werden (Martins *et al.* 1997; Rieger *et al.* 1997; Kretzschmar *et al.* 2000;

Mouillet-Richard *et al.* 2000; Gauczynski *et al.* 2001; Schmitt-Ulms *et al.* 2001). Daher ist es wichtig zu untersuchen, ob PrP in der High Mannose Form seiner physiologischen Aufgabe erfolgreich nachkommen kann. Ist dies nicht der Fall, könnte darin eine der Ursachen für die Entstehung von Prionerkrankungen liegen.

Desweiteren hat der Glykosylierungsstatus von PrP<sup>C</sup> einen entscheidenden Einfluss auf die Umwandlungseffizienz in PrP<sup>SC</sup>. So konnte nicht nur für unglykosylierte Formen des PrPs eine erhöhte Umwandlung in PrP<sup>SC</sup> beobachtet werden (Taraboulos *et al.* 1990; Kocisko *et al.* 1994; Lehmann und Harris 1997; Korth *et al.* 2000; Priola und Lawson 2001), sondern auch die High Mannose Form stellt ein bevorzugtes Substrat bei der Entstehung von PrP<sup>SC</sup> dar (Winklhofer *et al.* 2003a). Die in der vorliegenden Studie analysierten High Mannose Strukturen sind im Gegensatz zu der oben erwähnten Studie (Winklhofer *et al.* 2003a) nicht an der Membran verankert sind. Ob auch die nicht verankerten High Mannose Formen eine Umwandlung in PrP<sup>SC</sup> begünstigen, bleibt zu klären.

Ein anderer Ansatz zur Erklärung der möglichen Toxizität von den beobachteten High Mannose Strukturen liegt in der fehlenden Membranverankerung. Dadurch kann keine Interaktion und keine mögliche Stabilisierung durch Membrankomponenten stattfinden. Somit könnten diese Formen leichter in Aggregate umgewandelt werden.

## 6. Zusammenfassung

Transmissible spongiforme Enzephalopathien (TSE) sind tödlich verlaufende neurodegenerative Erkrankungen, die sowohl beim Tier als auch beim Menschen auftreten. Die Missfaltung des zellulären Prion Proteins (PrP<sup>C</sup>) ist von zentraler Bedeutung für die Pathogenese.

In der vorliegenden Arbeit wurde der physiologische Faltungsweg von PrP<sup>C</sup> und der Einfluß unterschiedlicher Domänen des PrPs auf die Entstehung von missgefaltetem PrP untersucht. Hierfür wurden verschiedene Deletionsmutanten und pathogene Mutanten in immortalisierten Maus-Neuroblastom-Zellen analysiert. Die Arbeit konzentriert sich auf zwei Ansätze: Import in das ER und Faltung im ER.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die globuläre Domäne des C-Terminus einen entscheidenden Faktor für den ER-Import darstellt. Dieser strukturierte C-Terminus ist für eine erfolgreiche Translokation in das ER unerlässlich und ausreichend. PrP Mutanten mit einer Deletion im C-Terminus werden schlecht importiert und tragen so zur Entstehung von zytosolischem PrP bei.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit konzentriert sich auf die Faltung im ER. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Helix 1 als auch die C-terminale GPI-Anker-Signalsequenz wichtige Faktoren für die Glykosylierung und die Faltung des PrPs darstellen. So können bereits erste Fehlfaltungsschritte im ER zu langlebigen PrP-Konformeren führen, welche von anderen Zellen aufgenommen werden können.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse leisten einen wichtigen Beitrag zur Klärung von Missfaltung des Prion Proteins im sekretorischen Weg.

## 7. Literatur

Agashe, V. R. und F. U. Hartl (2000). "Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding." Semin Cell Biol **11**(1): 15-25.

Alberts, B., D. Bray, *et al.* (1999). Lehrbuch der molekularen Zellbiologie. Weinheim, Wiley-Vch.

Alper, T., W. A. Cramp, *et al.* (1967). "Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid?" Nature **214**: 764-766.

Alper, T., D. A. Haig, *et al.* (1966). "The exceptionally small size of the scrapie agent." Biochem Biophys Res Commun **22**: 278-284.

Aronoff-Spencer, E., C. S. Burns, *et al.* (2000). "Identification of the Cu<sup>2+</sup> binding sites in the N-terminal domain of the prion protein by EPR and CD spectroscopy." Biochemistry **39**(45): 13760-71.

Barlow, R. M. und D. J. Middleton (1990). "Diatery transmission of bovine spongiform encephalopathy to mice." Vet Rec **126**: 111-112.

Barlow, R. M. und J. C. Rennie (1970). "Transmission experiments with a scrapie-like encephalopathy of mink." J Comp Pathol **80**(1): 75-9.

Belay, E. D. (1999). "Transmissible spongiform encephalopathies in humans." Annu Rev Microbiol **53**: 283-314.

Bendheim, P. E., H. R. Brown, *et al.* (1992). "Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein." Neurology **42**(1): 149-56.

Bernoulli, C., J. Siegfried, *et al.* (1977). "Danger of accidental person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by surgery." Lancet **1**: 478-479.

Blochberger, T. C., C. Cooper, *et al.* (1997). "Prion protein expression in Chinese hamster ovary cells using a glutamine synthetase selection and amplification system." Protein Eng **10**: 1465-1473.

Bolton, D. C., M. P. McKinley, *et al.* (1982). "Identification of a protein that purifies with the scrapie prion." Science **218**: 1309-1311.

Borchelt, D. R., A. Taraboulos, *et al.* (1992). "Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway." J. Biol. Chem. **267**: 16188-16199.

Bradley, R. und J. W. Wilesmith (1993). "Epidemiology and control of bovine spongiform encephalopathy (BSE)." Br Med Bull **49**: 932-959.

Broussole, E., *et al.* (1989). "Reversible Creutzfeldt-Jakob-like syndrome induced by lithium plus levodopa treatment." J Neurol Neurosurg Psychiatry **52**: 686-687.

- Brown, D. R., K. Qin, *et al.* (1997a). "The cellular prion protein binds copper in vivo." Nature **390**(6661): 684-7.
- Brown, D. R., W. J. Schulz-Schaeffer, *et al.* (1997b). "Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity." Exp Neurol **146**(1): 104-12.
- Brown, P., R. G. Will, *et al.* (2001). "Bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease: background, evolution, and current concerns." Emerg Infect Dis **7**(1): 6-16.
- Bruce, M. E., R. G. Will, *et al.* (1997). "Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent." Nature **389**(6650): 498-501.
- Bruch, M., C. McKnight, *et al.* (1989). "Helix formation and stability in a signal sequence." Biochemistry **28**: 8554-8561.
- Büeler, H., A. Aguzzi, *et al.* (1993). "Mice devoid of PrP are resistant to scrapie." Cell **73**: 1339-1347.
- Büeler, H., M. Fischer, *et al.* (1992). "Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein." Nature **356**: 577-582.
- Butler, D. A., M. R. D. Scott, *et al.* (1988). "Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins." J. Virol. **62**: 1558-1564.
- Cashman, N. R., R. Loertscher, *et al.* (1990). "Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation." Cell **61**(1): 185-92.
- Caughey, B., D. A. Kocisko, *et al.* (1995). "Aggregates of scrapie-associated prion protein induce the cell-free conversion of protease-sensitive prion protein to the protease-resistant state." Chem Biol **2**: 807-817.
- Caughey, B., R. E. Race, *et al.* (1989). "Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells." J. Virol. **63**: 175-181.
- Caughey, B. und G. J. Raymond (1991). "The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive." J. Biol. Chem. **266**: 18217-18223.
- Chandler, R. L. (1961). "Encephalopathy in mice produced with scrapie brain material." Lancet **i**: 1378-1379.
- Chau, V., J. W. Tobias, *et al.* (1989). "A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein." Science **243**(4898): 1576-83.
- Chazot, G., E. Broussolle, *et al.* (1996). "New variant of Creutzfeldt-Jakob disease in a 26-year-old French man." Lancet **347**: 1181.

- Collinge, J. (2001). "Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis." Annu Rev Neurosci **24**: 519-550.
- Collinge, J., K. C. Sidle, *et al.* (1996). "Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD [see comments]." Nature **383**(6602): 685-90.
- Collinge, J., M. A. Whittington, *et al.* (1994). "Prion protein is necessary for normal synaptic function." Nature **370**(6487): 295-7.
- Collins, S., C. A. McLean, *et al.* (2001). "Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia, and kuru: a review of these less common human transmissible spongiform encephalopathies." J Clin Neurosci **8**(5): 387-97.
- Connolly, T. und R. Gilmore (1989). "The signal recognition particle receptor mediates the GTP-dependent displacement of SRP from the signal sequence of the nascent polypeptide." Cell **57**: 599-610.
- Creutzfeldt, H. G. (1920). "Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems." Z Gesamte Neurol Psychiatrie **57**: 1-18.
- Cutlip, R. C., J. M. Miller, *et al.* (1994). "Intracerebral transmission of scrapie to cattle." J Infect Dis **169**: 814-820.
- Davanipour, Z., *et al.* (1984). "Possible modes of transmission of Creutzfeldt-Jakob disease." N Engl J Med **311**: 1582-1583.
- Dickinson, A. G., G. B. Young, *et al.* (1965). "An analysis of natural scrapie in Suffolk sheep." Heredity **20**: 485-503.
- Dlouhy, S. R., K. Hsiao, *et al.* (1992). "Linkage of the Indiana kindred of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease to the prion protein gene." Nat Genet **1**(1): 64-7.
- Donne, D. G., J. H. Viles, *et al.* (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**(25): 13452-57.
- Dorner, A. J., L. C. Wasley, *et al.* (1990). "The stress response in Chinese hamster ovary cells. Regulation of ERp72 and protein disulfide isomerase expression and secretion." J Biol Chem **265**(35): 22029-34.
- Drisaldi, B., R. S. Stewart, *et al.* (2003). "Mutant PrP Is Delayed in Its Exit from the Neither Wild-type nor Mutant PrP Undergoes Proteasomal Degradation." J Biol Chem **278**(24): 21732-43.
- Duffy, P., J. Wolf, *et al.* (1974). "Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease." N Engl J Med **290**: 692-693.
- Ellis, R. J. und F. U. Hartl (1999). "Principles of protein folding in the cellular environment." Curr Opin Struct Biol **9**: 102-110.

- Endo, T., D. Groth, *et al.* (1989). "Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein." Biochemistry **28**(21): 8380-8388.
- Feldman, D. E. und J. Frydman (2000). "Protein folding in vivo: the importance of molecular chaperones." Curr Opin Struct Biol **10**(1): 26-33.
- Finckh, U., T. Müller-Thomsen, *et al.* (2000). "High Prevalence of Pathogenic Mutations in Patients with Early-Onset Dementia Detected by Sequence Analysis of Four Different Genes." Am J Hum Genet **66**: 110-117.
- Finley, D., A. Ciechanover, *et al.* (1984). "Thermolability of ubiquitin-activating enzyme from the mammalian cell cycle mutant ts85." Cell **37**(1): 43-55.
- Fons, R. D., B. A. Bogert, *et al.* (2003). "Substrate-specific function of the translocon-associated protein complex during translocation across the ER membrane." J Cell Biol **160**: 529-539.
- Friedlander, R., E. Jarosch, *et al.* (2000). "A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response." Nat Cell Biol **2**(7): 379-84.
- Fuhrmann, U., E. Bause, *et al.* (1984). "Novel mannosidase inhibitor blocking conversion of high mannose to complex oligosaccharides." Nature **307**: 755-758.
- Gabizon, R., H. Rosenmann, *et al.* (1993). "Mutation and polymorphism of the prion protein gene in Libyan Jews with Creutzfeldt-Jakob disease (CJD)." Am J Hum Genet **53**(4): 828-35.
- Gajdusek, D. C. (1996). "Infectious amyloids: subacute spongiform encephalopathies as transmissible cerebral amyloidoses." Fields virology **3**: 2851-2899.
- Gajdusek, D. C., C. J. J. Gibbs, *et al.* (1966). "Experimental transmission of a kuru-like syndrome to chimpanzees." Nature **209**: 794-796.
- Gajdusek, D. C. und V. Zigas (1957). "Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea: epidemic occurrence of "kuru" in the native population." N Engl J Med **257**: 974-978.
- Gasset, M., *et al.* (1993). "Perturbation of the secondary structure of the scrapie prion protein under conditions associated with changes in infectivity." Proc Nat Acad Sci U S A **90**: 1-5.
- Gauczynski, S., J. M. Peyrin, *et al.* (2001). "The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein." Embo J **20**(21): 5863-75.
- Gerstmann, J., E. Sträussler, *et al.* (1936). "Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns." Z Neurol **154**: 736-762.
- Gething, M. J. und J. Sambrook (1992). "Protein folding in the cell." Nature **355**(6355): 33-45.

- Gibbs, C. J. J., D. C. Gajdusek, *et al.* (1968). "Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee." Science **161**: 388-389.
- Gibbson, R. A. und G. D. Hunter (1967). "Nature of the scrapie agent." Nature **215**: 1041-1043.
- Gilmore, R., G. Blobel, *et al.* (1982a). "Protein translocation across the endoplasmatic reticulum. I. Detection in the microsomal membrane of a receptor for the signal recognition particle." J Cell Biol **95**: 463-469.
- Gilmore, R., P. Walter, *et al.* (1982b). "Protein translocation across the endoplasmatic reticulum. II. Isolation and characterization of the signal recognition particle receptor." J Cell Biol **95**: 470-477.
- Glatzel, M. und A. Aguzzi (2001). "The shifting biology of prions." Brain Res Rev **36**: 241-248.
- Gordon, W. S. (1946). "Advances in veterinary research." Vet Res **58**: 516-520.
- Görlich, D., E. Hartmann, *et al.* (1992). "A protein of the endoplasmatic reticulum involved early in polypeptide translocation." Nature **357**: 47-52.
- Görlich, D. und T. A. Rapoport (1993). "Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmatic reticulum membrane." Cell **75**: 615-630.
- Gu, Y., J. Hinnerwisch, *et al.* (2003). "Identification of cryptic nuclear localization signals in the prion protein." Neurobiol Dis **12**: 133-149.
- Hadlow, W. J. (1959). "Scrapie and kuru." Lancet **ii**: 289-290.
- Hamman, B. D., J. C. Chen, *et al.* (1997). "The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane." Cell **89**: 535-544.
- Hanson, R. P., R. J. Eckroade, *et al.* (1971). "Susceptibility of mink to sheep scrapie." Science **172**(985): 859-61.
- Haraguchi, T., S. Fisher, *et al.* (1989). "Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins." Arch Biochem Biophys **274**(1): 1-13.
- Harmey, J. H., D. Doyle, *et al.* (1995). "The cellular isoform of the prion protein, PrP<sup>c</sup>, is associated with caveolae in mouse neuroblastoma (N2a) cells." Biochem Biophys Res Commun **210**(3): 753-9.
- Hartl, F. U. (1996). "Molecular chaperones in cellular protein folding." Nature **381**(6583): 571-9.
- Hartl, F. U. und M. Hayer-Hartl (2002). "Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein." Science **295**(5561): 1852-8.

- Hartsough, G. R. und D. Burger (1965). "Encephalopathy of mink. I. Epizootiologic and clinical observations." J Infect Dis **115**(4): 387-392.
- Hebert, D. N., B. Foellmer, *et al.* (1996). "Calnexin and Calreticulin promote folding, delay oligomerization and suppress degradation of influenza hemagglutinin in microsomes." EMBO J **15**(12): 2961-968.
- Hegde, R. S., J. A. Mastrianni, *et al.* (1998a). "A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease." Science **279**(5352): 827-834.
- Hegde, R. S., P. Tremblay, *et al.* (1999). "Transmissible and genetic prion diseases share a common pathway of neurodegeneration." Nature **402**(6763): 822-826.
- Hegde, R. S., S. Voigt, *et al.* (1998b). "Regulation of protein topology by trans-acting factors at the endoplasmic reticulum." Mol Cell **2**(1): 85-91.
- Helenius, A. und M. Aebi (2001). "Intracellular functions of N-linked glycans." Science **291**(5512): 2364-9.
- Heller, U., K. F. Winklhofer, *et al.* (2003). "Post-translational import of the prion protein into the endoplasmic reticulum interferes with cell viability: A critical role for the putative transmembrane domain." J Biol Chem **278**: 36139-36147.
- Higuchi, R. (1990). Recombinant PCR. PCR protocols. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky und T. J. White. San Diego, CA, USA, Academic Press: 177-183.
- Hill, A. F., M. Desbruslais, *et al.* (1997). "The same prion strain causes vCJD and BSE." Nature **389**(6650): 448-50, 526.
- Hornemann, S., C. Korth, *et al.* (1997). "Recombinant full-length murine prion protein, mPrP(23-231): purification and spectroscopic characterization." FEBS Lett **413**(2): 277-81.
- Hörnlimann, B., D. Heim, *et al.* (1995). Evaluation of BSE risk factors among European countries. Serono Symposia, Kingsmill, USA.
- Hörnlimann, B., D. Riesner, *et al.* (2001). Prionen und Prionenerkrankungen. Berlin, de Gruyter.
- Hsiao, K., H. F. Baker, *et al.* (1989). "Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Sträussler syndrome." Nature **338**: 342-345.
- Hurtley, S. M. und A. Helenius (1989). "Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum." Annu Rev Cell Biol **5**: 277-307.
- Hutter, G., F. L. Heppner, *et al.* (2003). "No superoxide dismutase activity of cellular prion protein in vivo." Biol Chem **384**: 1279-1285.
- Jakob, A. (1921). "Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen Befunde (spastische Pseudosklerose-

---

Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden)." Z Gesamte Neurol Psychiatrie **64**: 147-228.

Jakob, C. A., P. Burda, *et al.* (1998). "Degradation of misfolded endoplasmic reticulum glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by a specific oligosaccharide structure." J Cell Biol **142**(5): 1223-33.

James, T. L., H. Liu, *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 U S A **94**(19): 10086-91.

Jarrett, J. T. und P. T. Lansbury, Jr. (1993). "Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie?" Cell **73**: 1055-1058.

Jensen, T. J., M. A. Loo, *et al.* (1995). "Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing." Cell **83**(1): 129-35.

Jentsch, S., J. P. McGrath, *et al.* (1987). "The yeast DNA repair gene RAD6 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme." Nature **329**(6135): 131-4.

Johnson, A. E. und M. A. van Waes (1999). "The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane." Annu Rev Cell Dev Biol **15**: 799-842.

Kaneko, K., M. Vey, *et al.* (1997). "COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 2333-2338.

Kim, S. J. und R. S. Hegde (2002). "Cotranslational partitioning of nascent prion protein into multiple populations at the translocation channel." Mol Biol Cell **13**(11): 3775-86.

Kim, S. J., R. Rahbar, *et al.* (2001). "Combinatorial control of prion protein biogenesis by the signal sequence and transmembrane domain." J Biol Chem **276**(28): 26132-40.

Kitamoto, T., R. Iizuka, *et al.* (1993). "An Amber Mutation of Prion Protein in Gerstmann-Sträußler Syndrome with Mutant PrP Plaques." Biochem Biophys Res Commun **192**(2): 525-531.

Klatzo, I., D. C. Gajdusek, *et al.* (1959). "Pathology of kuru." Lab Invest **8**: 799-847.

Klausner, R. D. und R. Sitia (1990). "Protein degradation in the endoplasmic reticulum." Cell **62**(4): 611-4.

Kocisko, D. A., J. H. Come, *et al.* (1994). "Cell-free formation of protease-resistant prion protein." Nature **370**: 471-474.

Kondo, K. und Y. Kroina (1981). "A case control study of Creutzfeldt-Jacob disease: association with physical injuries." Ann Neurol **11**: 377-381.

- Kornfeld, R. und S. Kornfeld (1985). "Assembly of asparagine-linked oligosaccharides." Annu Rev Biochem **54**: 631-664.
- Korth, C., K. Kaneko, *et al.* (2000). "Expression of unglycosylated mutated prion protein facilitates PrP<sup>Sc</sup> formation in neuroblastoma cells infected with different prion strains." J. Gen. Virol **81**(Part 10): 2555-2563.
- Kozutsumi, Y., M. Segal, *et al.* (1988). "The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins." Nature **332**(6163): 462-4.
- Kretzschmar, H. A., T. Tings, *et al.* (2000). "Function of PrP(C) as a copper-binding protein at the synapse." Arch Virol Suppl **16**(16): 239-49.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4." Nature **227**: 680-685.
- Lasmezas, C. I., J. P. Deslys, *et al.* (1996). "BSE transmission to macaques." Nature **381**: 743-744.
- Lee, A. S. (1987). "Coordinate regulation of a set of genes by glucose and calcium ionophores in mammalian cells." Trends Biochem Sci **12**: 20-23.
- Lehmann, S. und D. A. Harris (1997). "Blockade of glycosylation promotes acquisition of scrapie-like properties by the prion protein in cultured cells [published erratum appears in J Biol Chem 1998 Mar 6;273(10):5988]." J Biol Chem **272**(34): 21479-87.
- Leopoldt, J. G. (1759). Von denen mancherley Krankheiten des Schaafviehes, und was vor Euren damit vorgenommen werden. Nützliche und auf die Erfahrung gegründete Einleitung zu der Landwirthschaft. Fünf Theile. Berlin und Glogau, Christian Friedrich Günthern: 344-360.
- Liao, S., J. Lin, *et al.* (1997). "Both luminal and cytosolic gating of the aqueous ER translocon pore are regulated from inside the ribosome during membrane protein integration." Cell **90**: 31-41.
- Little, E. und A. S. Lee (1995). "Generation of a mammalian cell line deficient in glucose-regulated protein stress induction through targeted ribozyme driven by a stress-inducible promoter." J Biol Chem **270**(16): 9526-34.
- Lopez, C. D., C. S. Yost, *et al.* (1990). "Unusual topogenic sequence directs prion protein biogenesis." Science **248**(4952): 226-229.
- Lopez, G. F., R. Zahn, *et al.* (2000). "NMR structure of the bovine prion protein." Proc Nat Acad Sci U S A **97**(15): 8334-339.
- Lorenz, H., O. Windl, *et al.* (2002). "Cellular Phenotyping of Secretory and Nuclear Prion Proteins Associated with Inherited Prion Diseases." J Biol Chem **277**: 8508-8516.

- Lugaresi, E., R. Medori, *et al.* (1986). "Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei." N Engl J Med **315**(16): 997-1003.
- Ma, J., R. Wollmann, *et al.* (2002). "Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol." Science **298**(5599): 1781-5.
- Ma, Y. und L. M. Hendershot (2001). "The unfolding tale of the unfolded protein response." Cell **107**(7): 827-30.
- Maley, F., R. B. Trimble, *et al.* (1989). "Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases." Anal Biochem **180**(2): 195-204.
- Manson, J., *et al.* (1995). "PrP gene dosage and long term potentiation." Neurodegeneration **4**: 113-115.
- Manson, J. C., A. R. Clarke, *et al.* (1994). "129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal." Mol Neurobiol **8**: 121-127.
- Marcotte, E. M., *et al.* (1999). "Chicken prion tandem repeats form a stable, protease-resistant domain." Biochemistry **38**: 667-676.
- Martins, V. R., E. Graner, *et al.* (1997). "Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor." Nat Med **3**(12): 1376-82.
- Matlack, K. E., W. Mothes, *et al.* (1998). "Protein translocation: tunnel vision." Cell **92**: 381-390.
- Mc Arthur, A. J., *et al.* (1991). "Melatonin directly resets the rat suprachiasmatic circadian clock in vitro." Brain Res **565**: 158-161.
- Mc Gowan, J. P. (1922). "Scrapie in sheep." Scottish J Agric **5**: 365-375.
- Mc Kinley, M. P., S. B. Prusiner, *et al.* (1983). "A protein-resistant protein is a structural component of the scrapie prion." Cell **35**: 57-62.
- McCracken, A. A. und J. L. Brodsky (1996). "Assembly of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin, and ATP." J Cell Biol **132**(3): 291-8.
- McKnight, C., M. Briggs, *et al.* (1989). "Functional and nonfunctional LamB signal sequences can be distinguished by their biophysical properties." J Biol Chem **264**: 17293-17297.
- Menetret, J. F., A. Neuhof, *et al.* (2000). "The structure of ribosome-channel complexes engaged in protein translocation." Mol Cell **6**: 1219-1232.

- Meyer, D. I. und B. Dobberstein (1980). "Identification and characterization of a membrane component essential for the translocation of nascent proteins across the endoplasmic reticulum." J Cell Biol **87**: 503-508.
- Miller, J. D. und P. Walter (1993). "A GTPase cycle in initiation of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane." Ciba Found Symp **176**: 147-159.
- Miura, T., *et al.* (1996). "Metal-dependent alpha-helix formation promoted by the glycine-rich octapeptide region of prion protein." FEBS Lett **396**: 248-252.
- Morgan, D. G., J. F. Menetret, *et al.* (2002). "Structure of the mammalian ribosome-channel complex at 17A resolution." J Mol Biol **324**: 871-886.
- Mori, K., A. Sant, *et al.* (1992). "A 22 bp cis-acting element is necessary and sufficient for the induction of the yeast KAR2 (BiP) gene by unfolded proteins." Embo J **11**(7): 2583-93.
- Morillas, M., W. Swietnicki, *et al.* (1999). "Membrane environment alters the conformational structure of the recombinant human prion protein." J. Biol. Chem **274**(52): 36859-36865.
- Mouillet-Richard, S., M. Ermonval, *et al.* (2000). "Signal Transduction Through Prion Protein." Science **289**: 1925-1928.
- Müller, G. und R. Zimmermann (1987). "Import of honeybee prepromelittin into the endoplasmic reticulum: structural basis for independence of SRP and docking protein." EMBO J **6**(7): 2099-107.
- Netzer, W. J. und F. U. Hartl (1998). "Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and -independent mechanisms." Trends Biochem Sci **23**(2): 68-73.
- Ng, D. T., E. D. Spear, *et al.* (2000). "The unfolded protein response regulates multiple aspects of secretory and membrane protein biogenesis and endoplasmic reticulum quality control." J Cell Biol **150**(1): 77-88.
- Nuoffer, C., A. Horvath, *et al.* (1993). "Analysis of the sequence requirements for glycosylphosphatidylinositol anchoring of *Saccharomyces cerevisiae* Gas1 protein." J Biol Chem **268**(14): 10558-63.
- Oesch, B., D. Westaway, *et al.* (1985). "A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein." Cell **40**: 735-746.
- Oxenkrug, G. F., *et al.* (1998). "The effect of MAO-A inhibition and cold-immobilization stress on N-acetylserotonin and melatonin in SHR and WKY rats." J Neural Transm Suppl **52**: 333-336.
- Pan, K.-M., M. Baldwin, *et al.* (1993). "Conversion of  $\alpha$ -helices into  $\beta$ -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 10962-10966.

- Pan, Y. T., H. Hori, *et al.* (1983). "Castanospermine inhibits the processing of the oligosaccharide portion of the influenza viral hemagglutinin." Biochemistry **22**(16): 3975-84.
- Parodi, A. J. (2000). "Protein glycosylation and its role in protein folding." Annu Rev Biochem **69**: 69-93.
- Parry, H. B. (1962). "Scrapie: a transmissible and hereditary disease of sheep." Heredity **17**: 75-105.
- Patil, C. und P. Walter (2001). "Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals." Curr Opin Cell Biol **13**(3): 349-55.
- Pattison, I. H. (1965). Experiments with scrapie with special reference to the nature of the agent and the pathology of the disease. Slow, latent and temperate virus infections, NINDB Monograph 2. D. C. Gajdusek, C. J. J. Gibbs und M. P. Alpers. Washington, DC, USA, U.S. Government Printing: 249-257.
- Pauly, P. C., *et al.* (1998). "Copper stimulates endocytosis of the prion protein." J Biol Chem **273**: 33107-33110.
- Pearson, G. R., T. J. Gruffydd-Jones, *et al.* (1991). "Feline spongiform encephalopathy." Vet Rec **128**(22): 532.
- Petersen, R. B., M. Tabaton, *et al.* (1992). "Analysis of the prion protein gene in thalamic dementia." Neurology **42**(10): 1859-63.
- Plempner, R. K., S. Bohmler, *et al.* (1997). "Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation." Nature **388**(6645): 891-5.
- Pohlschroder, M., W. A. Prinz, *et al.* (1997). "Protein translocation in the three domains of life: variations on a theme." Cell **91**: 563-566.
- Poulter, M., H. F. Baker, *et al.* (1992). "Inherited prion disease with 144 base pair gene insertion. 1. Genealogical and molecular studies." Brain **115**(Pt 3): 675-85.
- Priola, S. A. und V. A. Lawson (2001). "Glycosylation influences cross-species formation of protease-resistant prion protein." Embo J **20**(23): 6692-6699.
- Prusiner, S. B. (1982). "Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie." Science **216**: 136-144.
- Prusiner, S. B. (1991). "Molecular biology of prion diseases." Science **252**: 1515-1522.
- Prusiner, S. B. (1995). "The prion diseases." Scientific American **2**: 48-57.
- Prusiner, S. B., *et al.* (1981). "Thiocyanate and hydroxyl ions inactivate the scrapie agent." Proc Nat Acad Sci U S A **78**: 4606-4610.

- Prusiner, S. B., *et al.* (1982). "Further purification and characterization of scrapie prions." Biochemistry **21**: 6942-6950.
- Prusiner, S. B., M. P. McKinley, *et al.* (1981). "Scrapie agent contains a hydrophobic protein." Proc Natl Acad Sci U S A **78**: 6675-6679.
- Prusiner, S. B., M. R. Scott, *et al.* (1998). "Prion protein biology." Cell **93**(3): 337-48.
- Raymond, G. J., J. Hope, *et al.* (1997). "Molecular assessment of the potential transmissibilities of BSE and scrapie to humans." Nature **388**: 285-288.
- Rieger, R., F. Edenhofer, *et al.* (1997). "The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells." Nat Med **3**(12): 1383-8.
- Riek, R., S. Hornemann, *et al.* (1996). "NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231)." Nature **382**(6587): 180-2.
- Riek, R., S. Hornemann, *et al.* (1997a). "NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231)." FEBS Lett **413**(2): 282-8.
- Riek, R., S. Hornemann, *et al.* (1997b). "NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231)." FEBS Lett **413**(2): 282-8.
- Riesner, D. (2003). "Biochemistry and structure of PrPC and PrPSC." British Medical Bulletin **66**: 21-33.
- Robbins, P. W., R. B. Trimble, *et al.* (1984). "Primary structure of the Streptomyces enzyme endo-beta-N-acetylglucosaminidase H." J Biol Chem **259**(12): 7577-83.
- Rogers, M., F. Yehiely, *et al.* (1993). "Conversion of truncated and elongated prion proteins into the scrapie isoform in cultured cells." Proc Natl Acad Sci U S A **90**: 3182-3186.
- Rothe, C. und L. Lehle (1998). "Sorting of invertase signal peptide mutants in yeast dependent and independent on the signal-recognition particle." Eur J Biochem **252**: 16-24.
- Rudd, P. M., T. Endo, *et al.* (1999). "Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(23): 13044-9.
- Rutkowski, D. T., C. M. Ott, *et al.* (2003). "Signal sequences initiate the pathway of maturation in the endoplasmatic reticulum lumen." J Biol Chem **278**: 30365-30372.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, *et al.* (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-91.
- Salman, M. D. (2003). "Chronic Wasting Disease in Deer and Elk: Scientific Facts and Findings." J Vet Med Sci **65**: 761-768.

- Sambrook, J., E. F. Fritsch, *et al.* (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Press.
- Sanders, S. L., J. P. Whitfield, *et al.* (1992). "Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the ER." Cell **69**: 353-365.
- Sanger, F., S. Nicklen, *et al.* (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.
- Sanghera, N. und T. J. T. Pinheiro (2002). "Binding of prion protein to lipid membranes and implications for prion conversion." J. Mol. Biol **315**: 1241-1256.
- Schandel, K. A. und D. D. Jenness (1994). "Direct evidence for ligand-induced internalization of the yeast alpha-factor pheromone receptor." Mol Cell Biol **14**(11): 7245-7255.
- Schlenstedt, G. und R. Zimmermann (1987). "Import of frog prepropeptide GLa into microsomes requires ATP but does not involve docking protein or ribosomes." EMBO J **6**(3): 699-703.
- Schlesinger, D. H., G. Goldstein, *et al.* (1975). "The complete amino acid sequence of ubiquitin, an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells." Biochemistry **14**(10): 2214-8.
- Schmitt-Ulms, G., G. Legname, *et al.* (2001). "Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein." J Mol Biol **314**(5): 1209-25.
- Schreuder, B. E. (1994). "Animal spongiform encephalopathies-an update. Part 1. Scrapie and lesser known animal spongiform encephalopathies." Vet Res **16**: 174-181.
- Scott, M. R., R. Will, *et al.* (1999). "Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(26): 15137-42.
- Serban, D., A. Taraboulos, *et al.* (1990). "Rapid detection of Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie prion proteins." Neurology **40**: 110-117.
- Sharonova, I. N., *et al.* (1998). "High-affinity copper block of GABA-receptor-mediated currents in acutely isolated cerebellar Purkinje cells of the rat." Eur J Neurosci **10**: 522-528.
- Shyng, S. L., *et al.* (1994). "A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits." J Cell Biol **125**: 1239-1250.
- Sommer, T. und S. Jentsch (1993). "A protein translocation defect linked to ubiquitin conjugation at the endoplasmic reticulum." Nature **365**(6442): 176-9.
- Sousa, M. C., M. A. Ferrero-Garcia, *et al.* (1992). "Recognition of the oligosaccharide and protein moieties of glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase." Biochemistry **31**(1): 97-105.

- Stahl, N., D. R. Borchelt, *et al.* (1987). "Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid." Cell **51**: 229-240.
- Stimson, E., J. Hope, *et 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**(15): 4885-95.
- Stöckel, J., J. Safar, *et al.* (1998). "Prion protein selectively binds copper(II) ions." Biochemistry **37**(20): 7185-93.
- Stryer, L. (1999). Biochemie. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Suh, K., J. E. Bergmann, *et al.* (1989). "Selective retention of monoglucosylated high mannose oligosaccharides by a class of mutant vesicular stomatitis virus G proteins." J Cell Biol **108**: 811-819.
- Supattapone, S., P. Bosque, *et al.* (1999). "Prion protein of 106 residues creates an artificial transmission barrier for prion replication in transgenic mice." Cell **96**(6): 869-78.
- Taraboulos, A., M. Rogers, *et al.* (1990). "Acquisition of protease resistance by prion proteins in scrapie-infected cells does not require asparagine-linked glycosylation." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(21): 8262-6.
- Taraboulos, A., M. Scott, *et al.* (1995). "Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform." J. Cell Biol. **129**: 121-132.
- Telling, G. C., M. Scott, *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.
- Tobler, I., *et al.* (1997). "Sleep and sleep regulation in normal and prion protein-deficient mice." J Neurosci **17**: 1869-1879.
- Tobler, I., S. E. Gaus, *et al.* (1996). "Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein." Nature **380**(6575): 639-42.
- Towbin, H., T. Staehelin, *et al.* (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.
- Travers, K. J., C. K. Patil, *et al.* (2000). "Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation." Cell **101**(3): 249-58.
- Trombetta, E. S., J. F. Simons, *et al.* (1996). "Endoplasmic reticulum glucosidase II is composed of a catalytic subunit, conserved from yeast to mammals, and a tightly bound noncatalytic HDEL-containing subunit." J Biol Chem **271**(44): 27509-516.

- Tsubuki, S., H. Kawasaki, *et al.* (1993). "Purification and characterization of a Z-Leu-Leu-Leu-MCA degrading protease expected to regulate neurite formation: a novel catalytic activity in proteasome." Biochem Biophys Res Commun **196**(3): 1195-201.
- Valent, Q. A., D. A. Kendall, *et al.* (1995). "Early events in preprotein recognition in E.Coli: interaction of SRP and trigger factor with nascent polypeptides." Embo J **14**: 5494-5505.
- Vey, M., S. Pilkuhn, *et al.* (1996). "Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 14945-14949.
- Viles, J. H., F. E. Cohen, *et al.* (1999). "Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(5): 2042-7.
- Voigt, S., B. Jungnickel, *et al.* (1996a). "Signal sequence-dependent function of the TRAM protein during early phases of protein transport across the endoplasmic reticulum membrane." J Cell Biol **134**: 25-35.
- Voigt, S., B. Jungnickel, *et al.* (1996b). "Signal sequence-dependent function of the TRAM protein during early phases of protein transport across the endoplasmic reticulum membrane." J Cell Biol **134**(1): 25-35.
- von Heijne, G. (1985). "Signal sequences. The limits of variation." J Mol Biol **184**: 99-105.
- Walmsley, A. R., F. Zeng, *et al.* (2001). "Membrane topology influences N-glycosylation of the prion protein." EMBO J **20**(4): 703-12.
- Walter, P. und G. Blobel (1980). "Purification of a membrane-associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic reticulum." Proc Nat Acad Sci U S A **77**: 7112-7116.
- Walter, P. und G. Blobel (1982). "Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum." Nature **299**: 691-698.
- Walter, P., R. Gilmore, *et al.* (1984). "Protein translocation across the endoplasmic reticulum." Cell **38**: 5-8.
- Walter, S. und J. Buchner (2002). "Molecular chaperones - cellular machines for protein folding." Angew Chem Int Ed Engl **41**(7): 1098.
- Wang, Q. und A. Chang (1999). "Eps1, a novel PDI-related protein involved in ER quality control in yeast." EMBO J **18**(21): 5972-82.
- Wells, G. A. H., A. C. Scott, *et al.* (1987). "A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle." Vet. Rec. **121**: 419-420.

- Whitley, P., I. Nilsson, *et al.* (1996). "A Nascent Secretory Protein May Traverse the Ribosome Endoplasmic Reticulum Translocase Complex As an Extended Chain." J. Biol. Chem. **271**(11): 6241-6244.
- Wiertz, E. J., D. Tortorella, *et al.* (1996). "Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction." Nature **384**(6608): 432-8.
- Wildegger, G., S. Liemann, *et al.* (1999). "Extremely rapid folding of the C-terminal domain of the prion protein without kinetic intermediates." Nat Struct Biol **6**(6): 550-3.
- Will, R. G., J. W. Ironside, *et al.* (1996). "A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK." Lancet **347**(9006): 921-925.
- Will, R. G. und W. B. Matthews (1982). "Evidence for case-to case transmission of Creutzfeldt-Jacob-disease." J Neurol Neurosurg Psychiatry **45**: 235-238.
- Williams, E. S. und S. Young (1980). "Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy." J Wildl Dis **16**(1): 89-98.
- Williams, E. S. und S. Young (1993). "Neuropathology of chronic wasting disease of mule deer (*Odocoileus hemionus*) and elk (*Cervus elaphus nelsoni*)." Vet Pathol **30**: 36-45.
- Winklhofer, K. F., U. Heller, *et al.* (2003a). "Inhibition of complex glycosylation increases formation of PrP<sup>Sc</sup>." Traffic **4**: 313-322.
- Winklhofer, K. F., J. Heske, *et al.* (2003b). "Determinants of the in vivo-folding of the prion protein: a bipartite function of helix 1 in folding and aggregation." J Biol Chem **278**(17): 14961-14970.
- Wopfner, F., G. Weidenhöfer, *et al.* (1999). "Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein." J Mol Biol **289**(5): 1163-1178.
- Yost, C. S., C. D. Lopez, *et al.* (1990). "Non-hydrophobic extracytoplasmic determinant of stop transfer in the prion protein." Nature **343**(6259): 669-672.
- Zahn, R., A. Liu, *et al.* (2000). "NMR solution structure of the human prion protein." Proc Nat Acad Sci U S A **97**(1): 145-150.
- Zanata, S. M., M. H. Lopes, *et al.* (2002). "Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection." Embo J **21**(13): 3307-3316.
- Zeidler, M., E. C. Johnstone, *et al.* (1997a). "New variant Creutzfeldt-Jakob disease: psychiatric features." Lancet **350**: 908-910.
- Zeidler, M., G. E. Stewart, *et al.* (1997b). "New variant Creutzfeldt-Jakob-disease: neurological features and diagnostic tests." Lancet **350**: 903-907.

Zhou, M. und R. Schekman (1999). "The engagement of Sec61p in the ER dislocation process." Mol Cell **4**(6): 925-34.

Zigas, V. und D. C. Gajdusek (1957). "Kuru: Clinical Study of a new Syndrome Resembling Paralysis Agitans in natives of the Eastern Highlands of Australian New Guinea." Medical Journal of Australia **II**: 745-754.

## 8. Veröffentlichungen

Konstanze F. Winklhofer, **Johanna Heske**, Ulrich Heller, Anja Reintjes, Walter Muranyi, Ismail Moarefi, and Jörg Tatzelt (2003); “Determinants of the *in Vivo* Folding of the Prion Protein”; *Journal of Biological Chemistry* 278 (17): 14961-14970.

Ulrich Heller, Konstanze F. Winklhofer, **Johanna Heske**, Anja Reintjes and Jörg Tatzelt (2003); “Post-translational import of the prion protein into the endoplasmatic reticulum interferes with cell viability: a critical role for the putative transmembrane domain”; *Journal of Biological Chemistry* 278 (38): 36139-36147.

**Johanna Heske**, Ulrich Heller, Konstanze F. Winklhofer, and Jörg Tatzelt (2003); „The C-terminal globular domain of the prion protein is necessary and sufficient for import into the endoplasmatic reticulum“; eingereicht.

Sophia Kiachopoulos, **Johanna Heske**, Konstanze F. Winklhofer and Jörg Tatzelt (2003); „Misfolding of the Prion Protein at the plasma membrane induces endocytosis and intracellular retention“; eingereicht.

## 9. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Martin Biel.

Besonders möchte ich mich bei PD Dr. Jörg Tatzelt für die umfangreiche Betreuung dieser Arbeit, die fortwährende Unterstützung und zahlreichen Diskussionen bedanken.

Das gute Gelingen dieser Arbeit wäre ohne die hervorragenden Arbeitsbedingungen in der Abteilung Zelluläre Biochemie von Prof. Dr. F. Ullrich Hartl nicht möglich gewesen. Dafür, und für seine anregenden Fragen, Diskussionen und Ideen möchte ich ihm herzlich danken.

Einzelne Bereiche dieser Arbeit wurden durch erfolgreiche Zusammenarbeit mit anderen Arbeitsgruppen ermöglicht. So danke ich Dr. Walter Muranyi für die Durchführung der Immunfluoreszenz und Dr. Ismail Moarefi für die Unterstützung bei den Strukturvorhersagen.

Danken möchte ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Tatzelt:

Dr. Konstanze F. Winklhofer, Dr. Ulrich Heller, Dr. Penelope Kay-Jackson, Sophia Kiachopoulos und Iris Henn. Ihnen allen danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre und ihre hilfsbereite Unterstützung. Besonders danke ich Frau Dr. Konstanze F. Winklhofer für ihre nette und umfassende Betreuung.

Anja Reintjes danke ich für ihre technische Assistenz und ihre sehr hilfsbereite Art.

Luis Figueiredo, Dr. Daniel Klunker, Dr. Dean Naylor, Dr. Anna Stines und Dr. Jose M. Barral, sowie allen anderen Mitarbeitern der Abteilung von Prof. F. Ulrich Hartl

möchte ich ganz herzlich für die kollegiale Unterstützung, das angenehme Arbeitsklima und die schöne Zeit am Max-Planck-Institut danken.

Bei Dr. Daniel Klunker und Dr. Ullrich Heller bedanke ich mich für das Korrekturlesen sowie hilfreiche Anregungen beim Zusammenstellen dieser Arbeit.

Schließlich möchte ich besonders meinen Eltern Erika und Robert Heske für ihre fortwährende Unterstützung danken.

---

## 10. Lebenslauf

Name: Johanna Heske

Geburtstag: 19.02.1975

Geburtsort: Ingolstadt/Donau

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Familienstand: Ledig

1981-1985: Grundschule Auf der Schanz, Ingolstadt

1985-1994: Reuchlin-Gymnasium, Ingolstadt

1994-1999: Studium der Pharmazie an der LMU München

1996 1. Staatsexamen

1998 2. Staatsexamen

11/98 –05/99: Praktikum an der University of Illinois at Chicago (UIC),  
Chicago, USA

05/99-11/99: Praktikum an der Apotheke Am Bonner Platz, München

1999: 3. Staatsexamen

01/00-07/00: Arbeit als Apothekerin

08/00-12/03: Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie,  
Martinsried, Abteilung F.-U. Hartl, Arbeitsgruppe: J. Tatzelt,  
Thema: Funktionelle Charakterisierung des Prion Proteins:  
Bedeutung der C-terminalen Domäne des Prion Proteins  
für den Import in das Endoplasmatische Retikulum  
Untersuchung der Faltung des Prion Proteins *In Vivo*