

Aus dem Adolf-Butenandt-Institut
der Universität München
Lehrstuhl für Stoffwechselbiochemie

Vorstand: Prof. Dr. C. Haass

Polarisierter Transport des Prion-Proteins

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Armgard Uelhoff

aus
Recklinghausen

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. C. Haass

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. A. Kretzschmar
Priv. Doz. Dr. M. Dichgans

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. K. F. Winklhofer

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 19.07.2005

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation wurden bereits teilweise in folgender Publikation veröffentlicht:

A pathogenic PrP mutation and doppel interfere with polarized sorting of the prion protein

Armgard Uelhoff, Jörg Tatzelt, Adriano Aguzzi, Konstanze F. Winklhofer and Christian Haass

J Biol Chem.; 2004 December; *in press*.

Die Publikation befindet sich im Anhang.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
1 Einleitung	10
1.1 Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE)	10
1.1.1 Spongiforme Enzephalopathien beim Tier	12
1.1.2 Spongiforme Enzephalopathien beim Menschen	14
1.2 Das Prion-Protein (PrP)	17
1.2.1 Entdeckung	17
1.2.2 Eigenschaften der beiden Isoformen PrP ^c und PrP ^{Sc}	18
1.2.3 Das Prion-Konzept	18
1.2.4 Struktur des Prion-Proteins	20
1.2.5 Biogenese von PrP ^c	21
1.2.6 Physiologische Funktion des Prion-Proteins	23
1.3 Das PrP-homologe Protein Doppel (Dpl)	24
1.3.1 Entdeckung	24
1.3.2 Struktur von Dpl und PrP im Vergleich	24
1.3.3 Biogenese von Dpl	26
1.3.4 Physiologische Funktion von Dpl	27
1.3.5 Ektope Dpl Expression als Ursache für Neurodegeneration	27
1.3.6 Die Rolle von Dpl in Prion-Erkrankungen	29
1.4 Zellbiologische Grundlagen	30
1.4.1 Morphologie epithelialer Zellen	30
1.4.2 Polarisierter Transport in Epithelzellen	32
1.4.3 Sortierungssignale in Proteinen	34
1.4.3.1 Basolateraler Transport und Sortierungssignale	34
1.4.3.2 Apikaler Transport und Sortierungssignale	35
1.4.3.3 Hierarchie der Sortierungssignale	36

1.5	MDCK-Zellen als Modellsystem für die Untersuchung polarisierter Transportvorgänge krankheitsassoziierter Proteine	37
1.5.1	Proteolytische Prozessierung des β -Amyloid Vorläufer Proteins (β APP)	38
1.5.2	Polarisierter Transport der Alzheimer-assoziierten Proteine in MDCK-Zellen	39
1.5.3	Das MDCK Modellsystem	41
1.6	Zielsetzung der Arbeit	43
2	Material und Methoden	45
2.1	Geräte und Materialien	45
2.1.1	Allgemein	45
2.1.2	Molekularbiologie	47
2.1.3	Zellkultur	47
2.1.4	Proteinbiochemie und Immunocytochemie	48
2.2	Enzyme, Kits (Versuchssysteme), Chemikalien	49
2.2.1	Allgemein	49
2.2.2	Molekularbiologie	50
2.2.2.1	Vektoren	52
2.2.2.2	DNA Konstrukte	52
2.2.2.3	Oligonukleotide	53
2.2.3	Zellkultur	54
2.2.3.1	Transfizierte MDCK-Zelllinien	55
2.2.4	Proteinbiochemie und Immunocytochemie	55
2.2.5	Antikörper	57
2.3	Molekularbiologische Methoden	58
2.3.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	58
2.3.1.1	Standard-PCR	58
2.3.1.2	Rekombinante PCR	58
2.3.1.3	PCR – Bedingungen	60
2.3.2	Reinigung und Analyse der DNA	60
2.3.2.1	Agarose-Gelelektrophorese	60
2.3.2.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	61

2.3.2.3	Reinigung von DNA-Fragmenten	61
2.3.3	Enzymatische Modifikation der DNA	61
2.3.3.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	61
2.3.3.2	Dephosphorylierung von DNA	62
2.3.3.3	Ligation von DNA	62
2.3.4	Transformation von E. coli und Plasmidpräparation	62
2.3.4.1	E. coli-Kulturen	62
2.3.4.2	Herstellung kompetenter E. coli Zellen	63
2.3.4.3	Transformation von DNA-Konstrukten in kompetente E.coli	63
2.3.4.4	Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab (Mini-Präp)	64
2.3.4.5	Präparation von Plasmid-DNA in großem Maßstab (Maxi-Präp)	65
2.3.4.6	Sequenzierung der DNA-Konstrukte	65
2.4	Zellkultur	66
2.4.1	Kultivierung und Verdünnung muriner Neuroblastomzellen	66
2.4.1.1	Ausplattieren	66
2.4.1.2	Transiente Transfektion	66
2.4.1.3	Ernte	67
2.4.2	Kultivierung und Verdünnung von MDCK-Zellen	67
2.4.2.1	Anlegen von Dauerkulturen (Kryokonservierung)	67
2.4.2.2	Transfektion der MDCK-Zellen mit rekombinanter DNA	68
2.4.2.3	Wachstum in Filterkammern	68
2.5	Proteinbiochemische Methoden	69
2.5.1	Herstellung von Gesamtproteinlysaten und Nachweis der Löslichkeit	69
2.5.2	Proteinbestimmung	69
2.5.3	Nachweis von Proteinen	70
2.5.3.1	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page)	70
2.5.3.2	Western Blot Analyse	71
2.5.3.3	„Strippen“ von Western Blot Membranen	72
2.5.3.4	TCA Fällung	72
2.5.3.5	Immunopräzipitation	73
2.5.3.6	Quantifizierung von Proteinen	73
2.5.4	Biochemische Untersuchung von Proteinen	74
2.5.4.1	Analyse des Glykosylierungsstatus	74

2.5.4.2	Nachweis von Oberflächenproteinen	74
2.5.4.3	Untersuchung der Membranverankerung	75
2.5.4.4	Nachweis der Sekretion	75
2.5.5	Biotinylierung von apikalen und basolateralen Oberflächenproteinen polarisierter MDCK-Zellen	76
3	Ergebnisse	77
3.1	Expression, Nachweis und polarisierter Transport von PrP	77
3.1.1	Spezifität des 3F4 Antikörpers	77
3.1.2	Stabile exogene Expression von PrP/3F4	78
3.1.3	Biochemische Charakterisierung von PrP/3F4	80
3.1.4	Basolateraler Transport von PrP	86
3.2	Potentielle zelluläre Sortierungssignale von PrP	88
3.3	Einfluss der Membranverankerung und der komplexen Glykosylierung auf den polarisierten Transport von PrP	90
3.3.1	Beschreibung der biochemischen Eigenschaften von PrP-CD4	90
3.3.2	Beschreibung der biochemischen Eigenschaften von PrP-M204S	91
3.3.3	Beschreibung der biochemischen Eigenschaften von PrPmtGPI	92
3.3.4	Austausch des GPI-Ankers gegen die CD4-Transmembrandomäne ohne Einfluss auf den basolateralen Transport von PrP	93
3.3.4.1	Stabile exogene Expression von PrP-CD4	93
3.3.4.2	Basolateraler Transport von PrP mit heterologer Membranverankerung	94
3.3.5	Komplexe Glykosylierung und Membranverankerung ohne Einfluss auf den basolateralen Transport von PrP	95
3.3.5.1	Stabile exogene Expression von mtGPI und M204S	95
3.3.5.2	Basolaterale Sekretion von PrP-M204S und PrPmtGPI	97
3.4	Expression, Nachweis und polarisierter Transport von Doppel	98
3.4.1	Schematischer Vergleich der homologen Proteine PrP und Dpl	98
3.4.2	Biochemische Charakterisierung von Dpl	99
3.4.3	Stabile exogene Expression und Spezifität des 2234 Antikörpers	102
3.4.4	Unterschiedliche Sortierung von PrP und Dpl in MDCK-Zellen	104

3.5	Identifizierung des basolateralen Sortierungssignals	105
3.5.1	Die N-terminale Domäne von PrP beinhaltet ein basolaterales Sortierungssignal	106
3.5.1.1	Biochemische Charakterisierung von PrP-N/Dpl	106
3.5.1.2	Stabile exogene Expression von PrP-N/Dpl	110
3.5.1.3	Dpl mit N-terminaler Domäne von PrP wird basolateral transportiert	111
3.5.2	Die Hydrophobe Domäne als basolaterales Sortierungssignal	112
3.5.2.1	Biochemische Charakterisierung von PrP-HD/Dpl	113
3.5.2.2	Stabile exogene Expression von PrP-HD/Dpl	115
3.5.3	Basolateraler Transport von Dpl durch Übertragung der Hydrophoben Domäne von PrP	116
3.5.4	Fehltransport von PrP durch Deletion der Hydrophoben Domäne	117
3.5.4.1	Beschreibung der biochemischen Eigenschaften von PrP Δ HD	117
3.5.4.2	Stabile exogene Expression von PrP Δ HD	118
3.5.4.3	Apikale Fehlsortierung von PrP mit deletierter Hydrophoben Domäne	118
3.6	Veränderung des polarisierten Transportes von PrP durch pathogene Mutationen	120
3.6.1	Biochemische Charakterisierung von PrP-AV3	121
3.6.2	Stabile exogene Expression von PrP-AV3	124
3.6.3	Apikale Fehlsortierung von PrP-AV3	125
3.7	Fehlsortierung von PrP durch Koexpression von Dpl	126
3.7.1	Stabile exogene Koexpression von PrP und Dpl in MDCK-Zellen	126
3.7.2	Biochemische Charakterisierung von koexprimiertem PrP und Dpl	128
3.7.3	Apikaler Transport von PrP bei gleichzeitiger Expression von Dpl	131
4	Diskussion	134
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	134
4.2	MDCK-Zellen als Modellsystem	134

4.3	Atypisches Sortierungsverhalten von PrP	136
4.3.1	Basolateraler Transport von PrP	136
4.3.2	Membranverankerung und komplexe Glykosylierung ohne Einfluss auf den basolateralen Transport von PrP	137
4.3.3	Potentielle Sortierungssignale von PrP	138
4.3.4	Unterschiedliche Sortierung von PrP und Dpl in MDCK-Zellen	139
4.3.5	Die Hydrophobe Domäne - das basolaterale Sortierungssignal	139
4.3.6	Fehltransport von PrP durch Mutation oder Deletion der HD	141
4.4	Beeinflussung des polarisierten Transportes von PrP durch eine Koexpression von Dpl	143
4.5	Pathophysiologische Relevanz für Prion-Erkrankungen	146
5	Zusammenfassung	148
	Literaturverzeichnis	150
	Abkürzungsverzeichnis	173
	Danksagung	176
	Curriculum vitae	177
	Anhang: Publikation	178

1 Einleitung

1.1 Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE)

Prion-Erkrankungen, die auch als Transmissible Spongiforme Enzephalopathien bezeichnet werden, sind eine Gruppe tödlich verlaufender, neurodegenerativer Erkrankungen, die sowohl beim Tier als auch beim Menschen auftreten (Prusiner et al., 1998; Belay 1999; Collinge 2001; Collins et al., 2001). Pathologische Gemeinsamkeiten sind mikroskopisch sichtbare Läsionen im Gehirn der erkrankten Individuen. Massiver neuronaler Zelltod, Vakuolisierung, Hypertrophie der Astro- und Mikroglia und Ablagerung von Plaques geben dem Gehirn ein schwammartiges Aussehen.

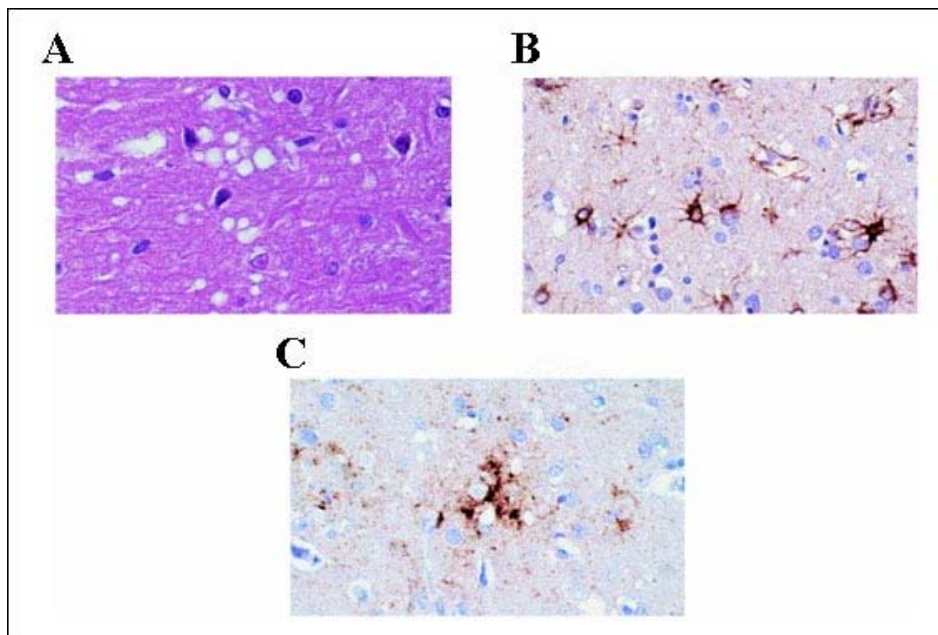


Abbildung 1: Charakteristische neuropathologische Merkmale von transmissiblen spongiformen Enzephalopathien von einem CJK (Creutzfeld-Jakob-Krankheit)-Patienten.

(A) Spongiforme, vakuolen-ähnliche Morphologie; (B) Proliferation der Astroglia; (C) Prion-Protein Ablagerungen (alle Darstellungen aus (Glatzel and Aguzzi 2001)).

Unter den neurodegenerativen Erkrankungen sind die TSE einzigartig, da die Krankheit spontan ausgelöst werden kann, aber auch durch Mutationen bedingt vererbt oder durch Infektion übertragen werden kann.

Historisch wurden Prion-Erkrankungen das erste Mal im Jahr 1732 in Großbritannien beschrieben (nach: (Mc Gowan 1922)). Es wurde von der Traberkrankheit (Scrapie) berichtet, bei der sich Schafe aufgrund intensiven Juckreizes ihre Wolle abkratzen (engl.:

to scrape – kratzen). In den Jahren 1920/1921 beschrieben Hans Creutzfeld und Alfons Jakob unabhängig voneinander das Auftreten eines seltenen Syndroms bei Patienten (Creutzfeldt 1920; Jakob 1921), der *Spastischen Pseudosklerose*. Diese erste humane TSE-Erkrankung wurde später nach ihren Erstbeschreibern Creutzfeld-Jakob-Krankheit (CJK) benannt. 1957 wurde von Gajdusek und Zigas (Zigas and Gajdusek, 1957) über eine infektiöse Krankheit berichtet, die unter den Ureinwohnern eines Stammes in Neuguinea epidemieartig auftrat. Im Jahr 1959 konnten zwischen dieser als Kuru bezeichneten Erkrankung und Scrapie bzw. CJK neuropathologische Ähnlichkeiten beobachtet werden (Klatzo et al., 1959). Der Auslöser dieser Erkrankungen war allerdings zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt.

1.1.1 Spongiforme Enzephalopathien beim Tier

Folgende TSE-Erkrankungen sind bei Tieren (vgl. Tabelle 1) 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 Krankheit (*Chronic Wasting Disease*, CWD) bei amerikanischen Hirschen, die transmissible Nerz-Enzephalopathie (*Transmissible Mink Encephalopathy*, TME) und die exotische Huftier-Enzephalopathie (*Exotic Ungulate Encephalopathy*, EUE) (Leopoldt, 1759; Hartsough and Burger, 1965; Williams and Young, 1980; Wells et al., 1987; Pearson et al., 1991).

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

Tabelle 1: Übersicht über die Spongiformen Enzephalopathien bei Tieren.

CWD: *Chronic Wasting Disease*; BSE: Bovine Spongiforme Enzephalopathie; TME: Transmissible *Mink* (Nerz) Enzephalopathie; FSE: Feline spongiforme Enzephalopathie; EUE: exotische Huftier Enzephalopathie.

Scrapie, die am häufigsten natürlich auftretende TSE, kann als Musterkrankheit aller beim Tier auftretenden Prion-Erkrankungen angesehen werden. Nach ihrer ersten Beschreibung wurde die Krankheit 1759 von Leopoldt auch in Deutschland beschrieben (Leopoldt, 1759). Einerseits wurde Scrapie als Infektionskrankheit betrachtet (Dickinson et al., 1965), andererseits aber auch eine genetische Veranlagung angenommen (Parry, 1962). Viele Tiere erkrankten durch die Verabreichung eines infektiösen Impfstoffes (Gordon, 1946). 1936 gelang es erstmals, experimentell zu beweisen, dass Scrapie übertragbar und somit eine Infektionskrankheit ist (Cuillé and Chelle, 1936).

Die ersten BSE-Fälle traten 1986 in Großbritannien auf (Wells et al., 1987). Seit diesem Zeitpunkt sind mehr als 200.000 Rinder in ganz Europa und auch Japan betroffen, und Schätzungen gehen von bis zu 1 Million infizierten Tieren aus (Brown et al., 2001). BSE ist bis jetzt die einzige epidemisch auftretende TSE-Erkrankung bei Tieren. Die Ursache der Erkrankung liegt wahrscheinlich in einer spontanen Ausbildung der Krankheit. Bei der Tierfutterherstellung wurden so Rinder verwendet, die teilweise mit BSE infiziert waren (Johnson and Gibbs, 1998). Ende der siebziger Jahre entstand hierdurch ein Problem, da das Verfahren zur Herstellung dieses Tiermehls aus wirtschaftlichen Gründen umgestellt wurde; bis dahin hatte man durch bestimmte Herstellungsverfahren den Erreger unwissentlich unschädlich gemacht. Nachdem in Großbritannien 1988 ein generelles Verbot der Tiermehlverfütterung an Wiederkäuer erlassen wurde, sind die auftretenden Fälle wieder rückläufig. Die Krankheitsverläufe der erkrankten Rinder und Schafe sind gekennzeichnet durch Verhaltens- und Bewegungsstörungen. Betroffene Rinder fallen außerdem durch eine starke Übererregbarkeit auf. 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.

Auch die bei Nerzen (TME) und Katzen (FSE) auftretenden Enzephalopathien sind infektiösen Ursprungs (Hanson et al., 1971; Pearson et al., 1991).

Bei der *Chronic Wasting Disease* (CWD), von der seit den achtziger Jahren aus Colorado und Wyoming (USA) berichtet wird, erkranken Tiere aus der Familie der Cervidae (Williams and Young, 1980). Betroffen sind der Maultierhirsch (*Odocoileus hemionus*), der Weißwedelhirsch (*Odocoileus virginianus*) und der Rocky-Mountain-Rothirsch (*Cervus elaphus nelsoni*) (Salman, 2003).

1.1.2 Spongiforme Enzephalopathien beim Menschen

Zu den TSE beim Menschen (vgl. Tabelle 2) 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 and Zigas, 1957; Lugaresi et al., 1986).

Krankheit	Ursache	Ätiologie
FFI	Keimbahn-Mutation im Prion-Protein Gen	hereditär
GSS		hereditär
fCJK		hereditär
sCJK	Somatische Mutation oder spontane Erkrankung	idiopathisch
iCJK	Infektion durch ärztliche Behandlung	infektiös
nvCJK	Infektion	infektiös
Kuru	Ritueller Kannibalismus	infektiös

Tabelle 2: Übersicht über die Spongiformen Enzephalopathien der 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 häufigste Form der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit ist die sporadische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (sCJK), die in ca. 90% aller CJK-Fälle vorliegt und bei der weder Infektionsquelle noch Art und Weise der Krankheitsentstehung bekannt sind.

Rund 10% der CJK-Fälle werden durch Mutationen hervorgerufen und autosomal dominant vererbt (familiäre Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (fCJK)). Auch bei dem Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) und der Fatalen Familiären Insomnie (FFI) ist eine Mutation in dem für das Prion-Protein (PrP) kodierenden Gen der Auslöser. In weniger als 1 % der CJK-Fälle wird die Krankheit durch medizinische Eingriffe auf den Menschen übertragen (Iatrogene Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (iCJK)). Grund hierfür können Infektionen durch kontaminierte chirurgische Instrumente, Transplantation infektiösen Gewebes oder auch Injektion des Wachstumshormon Somatotropin sein (Duffy et al., 1974; Bernoulli et al., 1977; Kondo and Kroina, 1981; Will and Matthews, 1982; Davanipour, 1984).

Zu den durch Infektion erworbenen TSE beim Menschen gehört auch die neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (nvCJK). Diese steht höchstwahrscheinlich im Zusammenhang mit der BSE-Krankheit der Rinder. Nachdem die BSE-Erkrankung in Großbritannien ihren Höhepunkt erreicht hatte, konnte zeitversetzt ein Anstieg an nvCJK beobachtet werden.

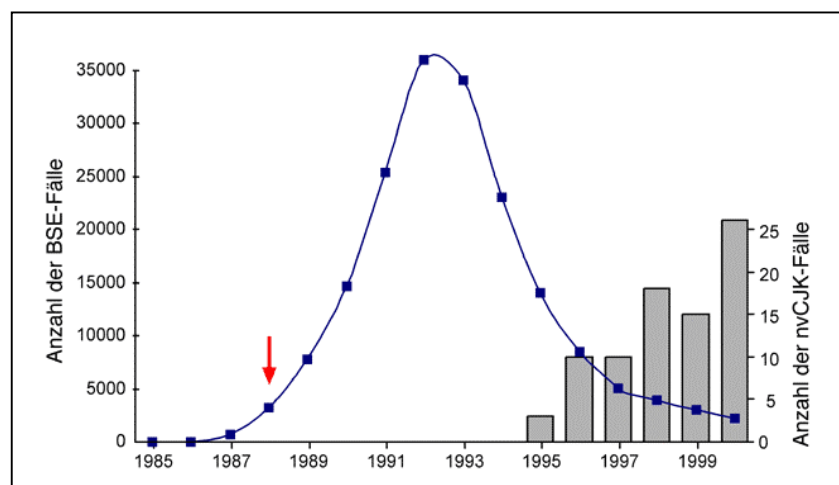


Abbildung 2: Fälle von Boviner Spongiformer Enzephalopathie (BSE, Quadrate) und neuer Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (nvCJK, Balken) in Großbritannien.

Der rote Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt des offiziellen Tiermehlverfütterungsverbotes an Wiederkäuer. (Abbildung aus der Dissertation von Ulrich Heller. „Analyse des Prion-Proteins der Maus in *Saccharomyces cerevisiae*: Fehlfaltung und Zelltod“, 2002.)

Biochemische Studien zeigten weiter, dass BSE- und nvCJK-Prionen in Bezug auf ihr Glykosylierungsmuster und ihre Sensitivität gegenüber proteolytischem Verdau nahezu identisch sind (Collinge et al., 1996; Bruce et al., 1997). Ein experimenteller Beweis für einen Zusammenhang der BSE-Krankheit und der nvCJK wurde durch Transmissionsexperimente von BSE in nicht humane Primaten erzielt. Es konnte hierbei

gezeigt werden, dass eine Infektion von Makaken mit BSE möglich war und die Hirne der erkrankten Tiere die gleichen charakteristischen floriden Plaques (lat.: *floridus* – blühend) (Plaques umgeben von einem Ring spongiformer Veränderungen) aufwiesen wie sie auch in nvCJK Patienten gefunden wurden (Lasmézas et al., 1996). Mit BSE- oder nvCJK-Material infizierte Mäuse wiesen dieselbe neuronale Vakuolisierung und Ablagerungen des Prion-Proteins in den Gehirnen auf, und die Inkubationszeiten waren außerdem identisch (Bruce et al., 1997). Diese verschiedenen Ergebnisse zeigen, dass BSE höchstwahrscheinlich auf den Menschen übertragen werden kann und die Ursache für die nvCJK Erkrankung ist (Raymond et al., 1997; Scott et al., 1999). Ein verlässlicher Nachweis, dass durch Nahrung aufgenommenes infiziertes Rindfleisch den Auslöser der Krankheit darstellt, fehlt jedoch.

Eine weitere beim Menschen infektiös verbreitete TSE ist die Kuru-Krankheit, die bei den Fore, einem Volk in Papua-Neuguinea, auftritt. Kuru wurde durch rituellen Kannibalismus übertragen (Gajdusek and Zigas, 1957) und war bei den am Ritus beteiligten Frauen und Kindern die häufigste Todesursache. Nach dem Verbot des Ritus 1959 konnte ein deutlicher Rückgang an Erkrankungen festgestellt werden. Heute werden nur noch einige wenige Kuru-Fälle festgestellt, wobei keiner der Patienten nach dem Inkrafttreten des Verbots geboren wurde (Gajdusek, 1996).

Alle TSE-Erkrankungen beim Menschen zeichnen sich durch eine lange Inkubationszeit aus. Unterschiede in den Krankheiten bestehen aber vor allem in der Symptomatik, der Krankheitsdauer und den pathologischen Charakteristika. Patienten, die von der sCJK betroffen sind, erkranken meist erst im Alter von 60 bis 70. Von der nvCJK betroffene Patienten werden dagegen meist schon im Alter von ca. 30 Jahren mit für sCJK untypischen Krankheitsbildern diagnostiziert (Chazot et al., 1996; Will et al., 1996). In den Gehirnen von nvCJK Patienten können z.B. floride Plaques nachgewiesen werden (Will et al., 1996). Der Krankheitsverlauf von nvCJK ist im Vergleich zu sCJK wesentlich länger (Zeidler et al., 1997a; Zeidler et al., 1997b).

Bei den verschiedenen humanen Prion-Erkrankungen sind unterschiedliche Regionen des Gehirns betroffen. Die Symptome sind bei Krankheitsbeginn Seh-, Sprach- und Bewegungsstörungen; im weiteren Verlauf lassen sich starke Persönlichkeitsveränderungen und Gedächtnisstörungen feststellen. Der Ausfall des Großhirns führt schließlich zum Tod der Patienten.

1.2 Das Prion-Protein (PrP)

1.2.1 Entdeckung

Nach Feststellung der Analogien von Kuru, CJK und Scrapie (vgl. 1.1) folgte die Suche nach der Identität des infektiösen Agens. 1954 wurde der Begriff *Slow Virus Infection* eingeführt, der Infektionen bezeichnete, die sich durch außergewöhnlich lange Inkubationszeiten auszeichneten. Im Jahr 1966 veröffentlichte T. Alper die experimentell begründete Hypothese, dass der Erreger der TSE-Krankheiten sich ohne Nukleinsäure vermehrt (Alper et al., 1967). Auslöser dafür war die sehr ungewöhnliche, aber hohe Resistenz des infektiösen Materials gegenüber Desinfektionsmaßnahmen und Verfahren, die gewöhnliche Viren und auch andere Krankheitserreger normalerweise unschädlich machen. Auch Experimente, bei denen das infektiöse Material hoher ionisierender Strahlung ausgesetzt wurde, blieben ohne Wirkung auf die Infektiosität. Kurze Zeit später wurde erstmals ein Zellmembranprotein als Erreger der TSE vorgeschlagen (Gibbson and Hunter, 1967). S. B. Prusiner stellte 1982 fest, dass Prozeduren, die Proteine zerstören oder modifizieren, die Infektiosität aufheben (Prusiner et al., 1981; Prusiner, 1982). So wurde der Begriff **Prion** (*Proteinaceous infectious particle*) geprägt, um eine klare Abgrenzung zu bisher identifizierten Erregern wie z.B. Bakterien oder Viren zu schaffen. Die Bezeichnung *Prionerkrankung* weist daher auf den verursachenden Erreger (Prion-Protein) hin; die Bezeichnung *Transmissible Spongiforme Enzephalopathien* beschreibt dagegen die Übertragbarkeit (Transmissibilität) und die Folgen der Krankheit (schwammartige Hirndegeneration).

Als Hauptbestandteil des infektiösen Agens konnte ein Protease-resistentes Glykoprotein identifiziert werden. Dieses aus Gehirnhomogenaten von Scrapie-infizierten Hamstern aufgereinigte Protein bildet *in vitro* schwer lösliche Aggregate, die denen in den Ablagerungen infizierter Gehirne ähneln (Bolton et al., 1982; Prusiner, 1982; Mc Kinley and Prusiner, 1983). Mit einer 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). Da das Gen sowohl in gesunden als auch infizierten Hamstern in gleichem Maße exprimiert wird (Oesch et al., 1985), muss das Protein in zwei verschiedenen Formen existieren. Das normale nichtinfektiöse Wirtsprotein wird als PrP^c (*Prion Protein cellular*, zelluläre Form des PrP), das potentiell infektiöse Protein als PrP^{Sc} (*Prion Protein Scrapie-Isoform*) bezeichnet. Hauptbestandteil

der infektiösen Partikel (Prionen) ist PrP^{Sc}. Daneben wurden aber auch ca. 10% Polysaccharide und ca. 1% Lipide gefunden (Riesner, 2003).

1.2.2 Eigenschaften der beiden Isoformen PrP^c und PrP^{Sc}

Die zelluläre (PrP^c) und die pathogene Form (PrP^{Sc}) des Prion-Proteins besitzen identische Aminosäuresequenzen und kovalente Modifikationen, unterscheiden sich aber in ihren biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften. Das zelluläre PrP^c ist in nicht-ionischen Detergenzien löslich und kann durch Proteasen leicht abgebaut werden. Im Gegensatz dazu ist PrP^{Sc} in nicht-ionischen Detergenzien unlöslich, und bei Inkubation mit Proteinase K (PK) bildet sich ein Fragment, das entweder nach seiner Größe PrP₂₇₋₃₀ oder nach seinem proteaseresistenten Verhalten PrPres benannt wird. Hoch aufgereinigtes PrP^c zeigt in Circular dichroismus-Messungen (CD) und Fourier-Transformation-Infrarot-Spektroskopie (FTIR) einen hohen α -helikalen Anteil, wohingegen PrP^{Sc} überwiegend β -Faltblatt-Struktur aufweist (Caughey et al., 1991; Gasset et al., 1993; Pan et al., 1993). Da chemisch keine Unterschiede zwischen beiden Proteinen festgestellt werden konnten, handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Konformationsisomere.

1.2.3 Das Prion-Konzept

Das Prion-Konzept beruht auf der von Stanley Prusiner 1982 postulierten Protein-only Hypothese. Diese besagt, dass nur das Prion-Protein in seiner Scrapie Form (PrP^{Sc}) für die Infektiosität von Prionen verantwortlich ist (Prusiner, 1982). Dieser neuartige Erreger kann sich weiter ohne eigenes Erbmaterial (DNA oder RNA) im Wirtsorganismus vermehren und schließlich Krankheiten hervorrufen (Prusiner, 1982). Mäuse, denen das für PrP-kodierende Gen PRNP (Prnp^{0/0}-Mäuse) deletiert wurde, verhalten sich resistent gegenüber einer Infektion mit PrP^{Sc} und können den Erreger auch nicht propagieren. Die Empfänglichkeit dieser *knock out*-Mäuse für eine Prion-Infektion kann allerdings durch Wiedereinführung von PrP-kodierenden Genen in diese Mäuse wieder hergestellt werden (Büeler et al., 1994). Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die Expression des zellulären Prion-Proteins eine Voraussetzung für die Entwicklung von Prion-Erkrankungen ist und dass für die Vermehrung des infektiösen Materials im Gehirn eine Umwandlung dieser endogenen nicht-pathogenen PrP-Form in die infektiöse Isoform PrP^{Sc} notwendig ist (Pan et al., 1993). Für diese Strukturumwandlung wurde ein direkter Kontakt der beiden Formen postuliert, der entweder in endosomalen Kompartimenten oder auf der Zelloberfläche

stattfindet (Caughey and Raymond, 1991; Borchelt et al., 1992; Taraboulos et al., 1995). Der genaue Mechanismus dieser Konversion ist zwar noch unbekannt, es wurde aber anhand verschiedener Modelle versucht, eine Erklärung zu finden. Die Modelle von Prusiner und Lansbury werden hierbei am meisten diskutiert. Beiden Modellen liegt dabei eine Konformationsumwandlung des PrP als primäres Ereignis zugrunde.

Das Heterodimer-Modell (*template assistance model*) von Prusiner schlägt eine autokatalytische Konversion vor, bei der die Bildung eines Heterodimers aus PrP^{Sc} und PrP^c den kritischen Schritt darstellt. Ein PrP^{Sc}-Molekül kann jeweils ein PrP^c-Molekül in einer autokatalytischen Reaktion umwandeln (Prusiner, 1991). Eine Aggregation von PrP^{Sc} ist dafür nicht notwendig.

Das *seeding*-Modell von Lansbury besagt dagegen, dass die Bildung eines Kristallisationskeims den kritischen Schritt in der Umwandlung von PrP^c zu PrP^{Sc} darstellt. Ausgehend von diesem Kristallisationskeim akkumuliert das pathogene Protein, wobei der Keim für die Propagierung von PrP^{Sc} eine bestimmte Mindestgröße erreichen muss (Jarrett and Lansbury, 1993).

Die Konversion in ein unlösliches, allerdings nicht infektiöses Prion-Protein konnte *in vitro* lange erfolgreich durchgeführt werden (Caughey et al., 1995). Eine *in vitro* Herstellung von infektiösem Material gelang allerdings erst kürzlich (Legname et al., 2004). Es konnte hierbei gezeigt werden, dass *in vitro* aus rekombinantem Maus-PrP hergestellte amyloide Fibrillen eine Prion-Erkrankung in transgenen Mäusen hervorrufen konnten. Das Gehirnhomogenat dieser erkrankten Mäuse konnte die Infektiosität übertragen, wenn auch mit erheblicher Verzögerung.

1.2.4 Struktur des Prion-Proteins

Die Struktur verschiedener rekombinanter, aus Bakterien aufgereinigter PrP-Spezies (murin, human, bovin) konnte mittlerweile durch Kernresonanzspektroskopie (NMR-Spektren) bestimmt werden (Riek et al., 1996; Riek et al., 1997). Sie zeigen alle eine ähnliche Struktur:

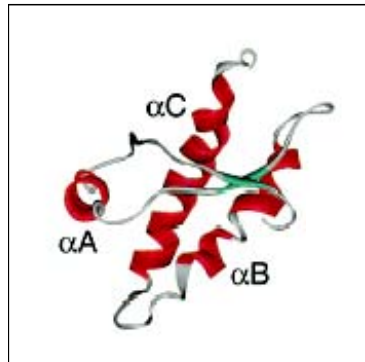


Abbildung 3: NMR-Struktur von Maus-PrP 121-231.

Bändermodell der Struktur der Maus Prion-Protein Domäne PrP121-231, welches die Positionen der drei Helices (rot) und der zwei antiparallelen β -Faltblätter (grün) zeigt (Mo et al., 2001).

Demnach kann das Prion-Protein in eine unstrukturierte N-terminale Domäne und eine strukturierte C-terminale Domäne unterteilt werden (Riek et al., 1996; Hornemann et al., 1997; James et al., 1997; Riek et al., 1997; Lopez et al., 2000; Zahn et al., 2000). Die N-terminale Domäne beinhaltet eine 23 Aminosäure (AS) lange Signalsequenz, die für den Import in das Endoplasmatische Retikulum (ER) benötigt wird, und fünf Oktarepeats (Wiederholung der acht Aminosäuren PQGGTWGQ), für die Kupferbindungseigenschaften gezeigt wurden (Brown et al., 1997b; Stöckel et al., 1998; Viles et al., 1999; Aronoff-Spencer et al., 2000). Am Ende dieses unstrukturierten Bereiches befindet sich im Übergang zu der strukturierten C-terminalen Domäne ein Bereich von 20 hydrophoben Aminosäuren, die in der Literatur als putative Transmembrandomäne beschrieben werden. Dieser auch als Hydrophobe Domäne (HD) bezeichnete Bereich kann *in vitro* aggregieren und Transmembran-Topologien des Prion-Proteins induzieren (Yost et al., 1990; Tagliavini et al., 1993).

Der strukturierte C-terminale Bereich des Proteins enthält zwei β -Faltblätter und drei α -helikale Strukturen. Die Helix 1 bildende Domäne wird durch die Bereiche der beiden kleinen antiparallelen Faltblätter eingeschlossen. Daran anschließend befinden sich die

Helices 2 und 3, die durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (Riek et al., 1996; Donne et al., 1997; Riek et al., 1997). Diese werden dadurch stabilisiert, und die Aminosäureseitenketten dieses C-terminalen Bereichs bilden zusammen mit denen des zweiten Faltblattes einen stabilen hydrophoben Kern. Eine komplexe Glykosylierung erhält das Protein an den Positionen Asn 180 und Asn 196 (Maussequenz) (Endo et al., 1989; Haraguchi et al., 1989; Rudd et al., 1999; Stimson et al., 1999). Am C-terminalen Bereich erfolgt die Anheftung eines Glykosylphosphatidylinositol (GPI) - Ankers, mit dem das Protein in der äußeren Zellmembran verankert ist (Stahl et al., 1987; Stimson et al., 1999).

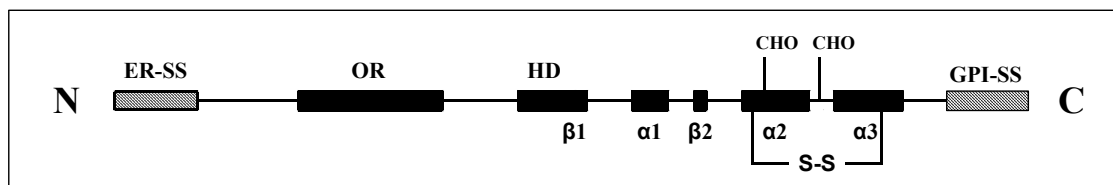


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Prion-Proteins.

N: N-terminales Ende; C: C-terminales Ende; ER-SS: Signalsequenz für das Endoplasmatische Retikulum; OR: Oktarepeats; HD: Hydrophobe Domäne; α 1-3: α -Helices; β 1-2: β -Faltblätter; CHO: Glykosylierungsstelle; S-S: Disulfidbrücke; GPI-SS: Glykosylphosphatidylinositol-Anker Signalsequenz.

Die Struktur von PrP^{Sc} konnte allerdings weder mit Röntgenstrukturanalyse noch mit Kernresonanzspektroskopie geklärt werden, da eine Untersuchung aufgrund der Unlöslichkeit von PrP^{Sc} bis jetzt nicht möglich war.

1.2.5 Biogenese von PrP^c

Das für Maus-PrP kodierende Gen PRNP enthält drei Exone und ist auf dem Chromosom 2 lokalisiert, wobei der gesamte proteinkodierende Teil des Gens (Open Reading Frame, ORF) in Exon 3 enthalten ist. Alternatives Spleißen der mRNA kann daher keinen direkten Einfluss auf das Protein ausüben.

Das Prion-Protein ist ein glykosyliertes Zelloberflächenprotein, das als 256 Aminosäure (Maus-PrP) langes Prä-Protein synthetisiert. Während des kotranslationalen Imports in das Endoplasmatische Retikulum (ER) wird die N-terminale ER-Signalsequenz abgespalten, und das Protein erhält eine *Core*-Glykosylierung an den Positionen Asn 180 und Asn 196. Nach vollständiger Translokation in das ER-Lumen fungieren die hydrophoben C-terminalen 23 AS als Erkennungssequenz für einen GPI-Anker, welcher als Ganzes im ER auf die sogenannte *ω -site* (AS 231, Maus-PrP) übertragen wird. Nach Transport in den Golgi-Apparat findet eine Modifikation der *Core*-Glykane in komplexe Glykane statt. Das

Protein wird anschließend mit Hilfe vesikulärer Strukturen an die Zelloberfläche transportiert. Dort wird es mit dem GPI-Anker an die Membran angeheftet und reichert sich zusammen mit anderen GPI-verankerten Proteinen in *lipid rafts*, cholesterolreiche Mikrodomänen, an (Harmey et al., 1995; Vey et al., 1996). Von dort kann es vermutlich über Clathrin-vermittelte Endozytose oder Kaveolen internalisiert und lysosomal degradiert bzw. zur Zelloberfläche zurücktransportiert werden (Shyng et al., 1993; Marella et al., 2002; Peters et al., 2003; Sunyach et al., 2003). Bei der Konversion von PrP^c zu PrP^{Sc} in infizierten Zellen kommt es zu einem direkten Kontakt zwischen den beiden Proteinen. Die Umwandlung des zellulären Proteins in seine pathogene Isoform findet vermutlich an der Plasmamembran oder entlang des endozytotischen Weges, z.B. in den Kaveolen, statt (Caughey and Raymond, 1991; Borchelt et al., 1992). Im Gegensatz zu PrP^c kann PrP^{Sc} nicht vollständig lysosomal degradiert werden, so dass es zu dessen Anreicherung in Lysosomen kommt.

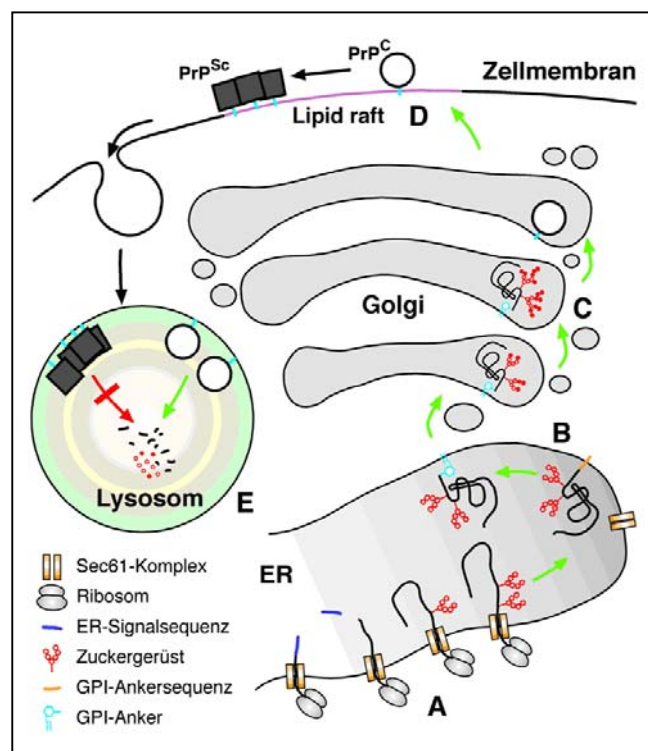


Abbildung 5: Biogenese des PrP.

(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^c im Lysosom abgebaut werden kann, widersteht PrP^{Sc} der Degradation und reichert sich an. (Abbildung aus der Dissertation von Ulrich Heller. „Analyse des Prion-Proteins der Maus in *Saccharomyces cerevisiae*: Fehlfaltung und Zelltod“, 2002.)

Das Prion-Protein wird in fast allen Geweben exprimiert, hohe Expressionslevel finden sich jedoch vor allem im Gehirn und in Lymphozyten (Cashman et al., 1990; Bendheim et al., 1992).

1.2.6 Physiologische Funktion des Prion-Proteins

Die Funktion für PrP^c konnte bis heute nicht identifiziert werden. Auch die Herstellung von PrP *knock out*-Mäusen brachte keine weiteren Erkenntnisse, die zur Klärung einer physiologischen Funktion von PrP^c beitragen konnte. Diese als Edinburgh (Edbg Prnp^{-/-}) und Zürich I (Zrch Prnp^{0/0}) bezeichneten PrP-defizienten Mäuse zeigten keinen signifikanten Phänotyp im Vergleich zu Wildtyp (wt) Mäusen (Büeler et al., 1992; Manson et al., 1994) beziehungsweise wiesen lediglich geringe elektrophysiologische Veränderungen und Störungen im zirkadianen Rhythmus auf (Tobler et al., 1996).

Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass PrP^c mit Hilfe der Oktarepeatregion (OR) in der N-terminalen Domäne des Proteins Kupferionen *in vitro* und *in vivo* binden kann (Brown et al., 1997b; Stöckel et al., 1998; Viles et al., 1999). Es wurde daher für PrP^c eine Rolle in der Kupferhomöostase vorgeschlagen, deren Störung zu den elektrophysiologischen Auffälligkeiten führen kann, die in den generierten PrP^{0/0}-Mäusen beobachtet wurde. Weiterhin wurde eine enzymatische Aktivität des Proteins postuliert, bei der Kupfer als essentieller Kofaktor eine Rolle spielen könnte. Eine solche Superoxiddismutase (SOD)-ähnliche Aktivität konnte allerdings nur von einigen Gruppen beobachtet werden (Brown et al., 1999; Hutter et al., 2003). Des Weiteren stehen Berichte über eine geringere Aktivität der zytosolischen SOD1 in den Gehirnen der *knock out*-Mäuse und eine erhöhte Aktivität dieses Enzyms in PrP-überexprimierenden Mäusen Daten anderer Autoren gegenüber. Diese konnten weder eine Veränderung der Kupferkonzentration noch der SOD-Aktivität in Abhängigkeit von einer PrP-Expression erkennen. Eine mögliche Einflussnahme von PrP^c auf die Übertragung von Kupfer auf das Enzym SOD und auf dessen Aktivität wird daher kontrovers diskutiert (Brown et al., 1997a; Waggoner et al., 2000). Die Bindung von Kupfer an PrP^c bedingt eine Konformationsänderung in der Oktarepeatregion. Es konnte gezeigt werden, dass die Endozytose von PrP^c durch eine solche Kupferbindung stimuliert wird (Pauly et al., 1998; Sumudhu et al., 2001). Eine Rolle für PrP^c als Kupfertransporter ist daher möglich.

Auch eine neuroprotektive Wirkung von PrP wurde diskutiert, da das Protein nach Interaktion mit dem Stress-induzierbaren Protein 1 (STI 1) vor Anisomycin-induzierter Apoptose schützt.

Andere Untersuchungen zogen eine Funktion von PrP^c in der Signaltransduktion in Betracht. Nach Antikörper vermittelter Dimerisierung von PrP wurde eine veränderte Phosphorylierung der Tyrosin-Kinase Fyn beobachtet, die eine erhöhte Aktivierung des Enzyms zur Folge hatte (Mouillet-Richard et al., 2000). Wie jedoch das zytosolische Fyn mit dem an der Oberfläche befindlichen PrP^c interagieren soll, wurde nicht gezeigt. Interaktion mit verschiedenen Proteinen wie z.B. Laminin, dem 37 kDa/76 kDa Laminin-Rezeptor, weisen auf eine mögliche Rolle von PrP in der Zelladhäsion und Neuritenwachstum hin (Rieger et al., 1997; Graner et al., 2000).

1.3 Das PrP-homologe Protein Doppel (Dpl)

1.3.1 Entdeckung

Das PrP-homologe Protein Doppel wurde identifiziert bei der Sequenzanalyse einer aus Mäusen isolierten genomischen DNA (Westaway et al., 1991; Lee et al., 1998; Moore et al., 1999). In direkter Nachbarschaft zu PRNP befindet sich eine DNA Sequenz, die in verschiedenen Mausarten, aber auch in anderen Säugetieren konserviert ist. Dieser Abschnitt kodiert für ein Protein, das starke Ähnlichkeit mit dem Prion-Protein zeigt. Da dieses Gen 16 Kilobasen stromabwärts des PRNP liegt (human 27 kb), wurde das Protein Doppel (*downstream of the PRNP locus*) und der kodierende Genabschnitt PRND benannt (Moore et al., 1999). Der Genkomplex, der sowohl den kodierenden Bereich für PrP als auch den für Dpl beinhaltet, wird PRN genannt und zeigt ebenfalls eine hohe Konservierung in verschiedenen Spezies; ein Unterschied besteht meist nur in dem Abstand zwischen PRNP und PRND. Dieser PrP-Gen-Komplex PRN ist wahrscheinlich während der Evolution durch Genverdopplung entstanden.

1.3.2 Struktur von Dpl und PrP im Vergleich

Aufgrund der hohen Aminosäure-Sequenzhomologie zwischen den verschiedenen Säugetier Dpl Proteinen wurde schon kurz nach Entdeckung des Proteins eine ähnliche dreidimensionale Struktur vermutet (Moore et al., 1999). Die Struktur von verschiedenen rekombinanten Dpl Proteinen konnte nun mittlerweile durch Kernresonanzspektroskopie (NMR-Spektren) (Mo et al., 2001; Lührs et al., 2003) bestimmt werden.

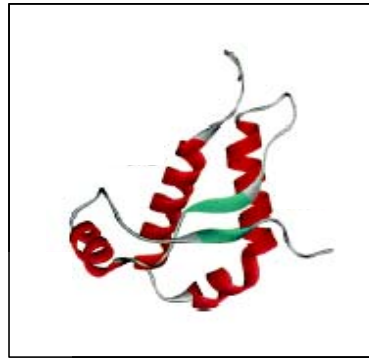


Abbildung 6: NMR-Struktur von Maus-Dpl 26-157.

Bändermodell der Struktur der Maus-Dpl Domäne 26-157, welches die Positionen der drei Helices (rot) und der zwei antiparallelen β -Faltblätter (grün) zeigt (Mo et al., 2001).

Das PrP-homologe Dpl kann wie PrP in eine unstrukturierte N-terminale Domäne (Mo et al., 2001) und eine strukturierte C-terminale Domäne unterteilt werden. Im Gegensatz zu PrP ist der N-terminale Bereich von Dpl wesentlich kürzer und enthält keine mit der Oktarepeat Region oder der Hydrophoben Domäne in PrP vergleichbare Strukturanteile. Der größte Anteil von Dpl ist wie PrP globulär gefaltet und enthält drei α -Helices und zwei β -Faltblätter. Auch hier wird in der linearen Repräsentation des Proteins die Helix 1 durch die beiden antiparallelen Faltblätter eingeschlossen, deren Orientierung sich aber in den beiden Proteinen unterscheidet. Bei Dpl verläuft die Ebene der Faltblätter in Bezug auf die Helices 2 und 3 parallel (vgl. Abbildung 6), wohingegen bei PrP diese senkrecht verlaufen (vgl. Abbildung 3). Helices 2 und 3 werden auch in Dpl durch Ausbildung von Disulfidbrücken miteinander verbunden; im Gegensatz zu PrP besitzt Dpl allerdings zwei Brücken. Durch Interaktion der Aminosäureseitenketten von Helices 2 und 3 mit denen der beiden Faltblätter wird die C-terminale Domäne stabilisiert. Der Vergleich möglicher N-Glykosylierungen zeigt, dass in Dpl, wie auch in PrP, zwei N-Glykosylierungsstellen vorliegen (Silverman et al., 2000). Am C-terminalen Bereich erfolgt auch bei Dpl eine Anheftung an die äußere Zellmembran mittels eines GPI – Ankers (Silverman et al., 2000).

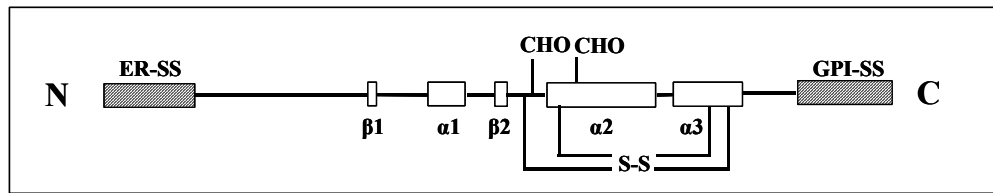


Abbildung 7: Schematische Darstellung des PrP-homologen Proteins Dpl.

N: N-terminales Ende; C: C-terminales Ende; ER-SS: Signalsequenz für das Endoplasmatische Retikulum; α 1-3: α -Helices; β 1-2: β -Faltblätter; CHO: Glykosylierungsstelle; S-S: Disulfidbrücke; GPI-SS: Glykosylphosphatidylinositol-Anker Signalsequenz.

PrP und Dpl weisen nur ca. 25 % Aminosäure-Sequenzhomologie auf, besitzen aber dennoch eine hohe strukturelle Ähnlichkeit. Obwohl die N-terminale Domäne von Dpl weder eine Oktarepeatregion noch eine der HD ähnliche Domäne beinhaltet, ist die C-terminale Domäne des Proteins sehr PrP-homolog.

1.3.3 Biogenese von Dpl

Das für Maus Dpl kodierende Gen PRND wird im Gegensatz zu PRNP in der 3' gelegenen untranslatierten Region (3'UTR) durch ein Intron unterbrochen. Die mRNA unterliegt daher alternativen Spleißungen, die zu einem 2.7/1.7 kb Größenpolymorphismus führen.

Wie PrP ist auch Dpl ein glykosyliertes Zelloberflächenprotein und wird als 179 Aminosäure (Maus-Dpl) langes Prä-Protein synthetisiert. Nach Import in das ER und Abspaltung der 26 Aminosäuren lange N-terminale ER-Signalsequenz erhält Dpl eine Kernglykosylierung an den Positionen Asn 99 und Asn 111. Der GPI-Anker wird nach Abspaltung der 24 Aminosäure lange hydrophobe C-terminale Erkennungssequenz (*omega*-site AS 155, Maus-Dpl) auf das Protein übertragen. Nach komplexer Glykosylierung im Golgi wird das Protein zur Zelloberfläche transportiert und dort mit dem GPI-Anker an die Membran angeheftet (Silverman et al., 2000). Hier reichert sich Dpl, ähnlich wie PrP, in *lipid rafts* an und kann ebenfalls von der Zelle durch Endozytose aufgenommen werden (Massimino et al., 2004).

1.3.4 Physiologische Funktion von Dpl

Dpl mRNA wird in gesunden Tieren hauptsächlich in den Hoden und im Herz, im Gegensatz zu PrP aber nur sehr schwach im Gehirn exprimiert (Moore et al., 1999; Silverman et al., 2000). In Dpl *knock out*-Mäusen konnte gezeigt werden, dass weibliche Tiere fruchtbar, männliche Tiere dagegen zeugungsunfähig waren. Es konnte weiterhin festgestellt werden, dass die Spermien morphologische Abnormalitäten aufwiesen und unbeweglich waren. Der Spermienkopf wies starke Verformungen auf und das Akrosom war stark unterentwickelt. Aus diesen Studien wurde geschlossen, dass Dpl eine entscheidende Rolle in der Akrosomenfunktion und der männlichen Gametogenese spielt (Behrens et al., 2002).

Des Weiteren kann Dpl mRNA auch während der Embryogenese und in den Gehirnen neugeborener Mäuse detektiert werden (Li et al., 2000). Für Dpl wird daher eine physiologische Funktion in der Gehirnentwicklung diskutiert.

1.3.5 Ektope Dpl Expression als Ursache für Neurodegeneration

Bei der Suche nach einer physiologischen Funktion des Prion-Proteins wurden (vgl. 1.2.6) verschiedene *knock out*-Mäuse hergestellt. Zrch Prnp^{0/0}- und auch Edbg Prnp^{-/-}-Mäuse entwickelten beide keinen signifikanten Phänotyp. 1996 berichtete Sakaguchi von PrP^{0/0}-Mäusen, die eine massive Degeneration zerebellärer Purkinje-Zellen und Demyelinisierungen entwickelten (Sakaguchi et al., 1996; Moore et al., 1999). Infolgedessen kam es in den als Nagasaki (NgsK Prnp^{-/-}) und Rcm0 bezeichneten Mäusen ab einem bestimmten Entwicklungsalter zu schwerwiegenden Bewegungsstörungen (Ataxien). Der beobachtete Phänotyp konnte darauf zurückgeführt werden, dass in NgsK- und Rcm0-Mäusen, nicht aber in Zrch- bzw. Edbg-Mäusen, PRND mRNA in den Gehirnen vermehrt exprimiert wurde. Die für die Herstellung der ataktischen PrP *knock out*-Mäuse verwendeten Konstrukte führten zu *intergenic splicing events*, die den Dpl-Locus unter die Kontrolle des PRNP-Promotors brachten (Moore et al., 1999). Im Gegensatz zu dem PRND-Promotor ist dieser in neuronalen Zellen hoch aktiv. PRND unter der Kontrolle des PRNP-Promotors führte deshalb zu einer Überexpression von Dpl im Gehirn. Durch die Wiederholung der *knock out* Experimente in der Mauslinie Zürich II konnten diese Ergebnisse bestätigt werden (Moore et al., 1999; Li et al., 2000; Rossi et al., 2001). Weitere Experimente zeigten, dass eine direkte Korrelation besteht zwischen dem

Ausmaß des Phänotyps und der PRNP-Expressionsstärke im Gehirn der erkrankten Mäuse (Rossi et al., 2001). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass durch Wiedereinführung von PRNP die Neurotoxizität in *Ngsk Prnp^{0/0}*-Mäusen aufgehoben werden konnte (Nishida et al., 1999). Die in *Ngsk*-, *Zrch II*- und *Rcm0 Prnp^{-/-}*-Mäusen beobachtete Neurodegeneration ist also auf eine ektope Überexpression von PRNP im Gehirn zurückzuführen. Diese neuronale Zelldegeneration in *Ngsk*-, *Rcm0*- und *Zrch II PRNP^{0/0}*-Mäusen kann allerdings durch die Einführung eines PRNP-Transgens aufgehoben werden. PrP^c kann daher eine Dpl-vermittelte Neurotoxizität antagonisieren, und nur die Abwesenheit einer PrP^c-Expression ermöglicht es Dpl, einen Zelltod zu induzieren.

Interessanterweise führt die Expression eines PrP-Konstruktes, bei dem die N-terminale Domäne von Aminosäure 32-134 (PrP Δ F) deletiert ist und daher strukturelle Ähnlichkeit mit Dpl aufweist, in *Zrch I Prnp^{0/0}*-Mäusen zur Entwicklung von Ataxie und Degeneration zerebellärer Zellen. Die Pathologie dieses als Shmerling-Syndrom bezeichneten Krankheitsbildes ist dem des durch ektope Expression von Dpl induzierten *Zrch II Prnp^{0/0}*-Phänotyps sehr ähnlich. Auch hier ist die Toxizität durch Einführung von wtPrP antagonisierbar (Shmerling et al., 1998). Expression von sowohl PrP Δ F als auch Dpl in Mäusen mit endogener PRNP Expression hatte dagegen keinerlei Effekt. Mögliche Erklärungen für den Mechanismus einer solchen antagonistischen Interaktion zwischen Dpl/PrP Δ F und PrP^c können im Moment nur durch verschiedene Modelle gegeben werden. Das Kompletions-Modell (vgl. Abbildung 8, (A)) postuliert, dass PrP^c und Dpl/PrP Δ F um eine Interaktion mit einem Liganden X konkurrieren, wobei PrP eine höhere Bindungsaffinität besitzt als Dpl bzw. PrP Δ F. In Abwesenheit von PrP können Dpl bzw. PrP Δ F binden und so ein apoptotisches Signal auslösen. Bei gleichzeitiger Expression dieser Proteine kann PrP aber durch bevorzugte Bindung an den Liganden diese Kaskade verhindern (Shmerling et al., 1998; Weissmann and Aguzzi, 1999).

Das Sensibilisierungs-Modell (vgl. Abbildung 8, (B)) dagegen besagt, dass Bindung von PrP an den Liganden X ein antiapoptotisches Signal auslöst, in Abwesenheit von PrP die zerebellären Zellen aber einem kontinuierlich schwachen apoptotischen Signal ausgesetzt sind, ausgelöst durch Dpl/PrP Δ F. Dieses Modell unterstützt eine neuroprotektive Funktion von PrP.

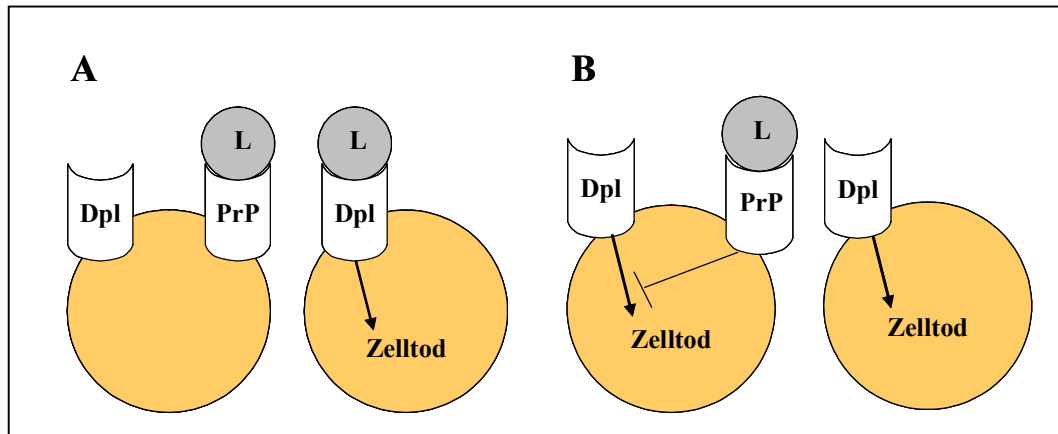


Abbildung 8: Modelle für einen Dpl – PrP^c Antagonismus.

(A) Konkurrenzmodell. In Anwesenheit beider Proteine besitzt PrP eine höhere Affinität zu dem Liganden X als Dpl. Bei alleiniger Expression von Dpl kann das Protein den Liganden binden und ein apoptotisches Signal auslösen, das zum Zelltod führt. (B) Sensibilisierungsmodell. Dpl sendet ein schwaches kontinuierliches apoptotisches Signal aus. Die Bindung des Liganden X an PrP veranlasst dieses, ein antiapoptotisches Signal auszulösen. Der apoptotische Effekt von Dpl wird so antagonisiert (Modifiziert nach (Behrens and Aguzzi, 2002)).

1.3.6 Die Rolle von Dpl in Prion-Erkrankungen

PrP^c kann durch eine Konformationsänderung in das pathogene PrP^{Sc} umgewandelt werden und spielt dadurch eine entscheidende Rolle in TSE-Erkrankungen. Das in der N-terminalen Domäne verkürzte PrP^{ΔF}, das eine strukturelle Ähnlichkeit zu Dpl besitzt, ist in der Lage, eine PrP^{Sc}-Bildung zu propagieren. Die beiden kodierenden Genabschnitte PRNP/PRND befinden sich in enger Nähe zueinander, und die Proteine PrP und Dpl besitzen ähnliche Strukturen, Topologien und Prozessierungswege im sekretorischen Weg. Dpl kann außerdem bei Überexpression im ZNS Neurodegeneration induzieren. Die Umwandlung von Dpl in eine pathogene Dpl^{Sc} Form und auch eine Einflussnahme auf TSE-Erkrankungen ist daher prinzipiell möglich.

In verschiedenen Studien wurde daher untersucht, ob Dpl Einfluss nehmen kann auf eine PrP^{Sc} Bildung und ob es die Empfänglichkeit für eine Prion-Infektion bzw. deren Verlauf verändern kann. Es wurde festgestellt, dass die Abwesenheit von Dpl eine Prion-bedingte Pathologie nicht verhindern kann und Dpl deshalb für die Ausbildung einer TSE-Erkrankung nicht notwendig ist (Behrens et al., 2001). Des Weiteren hatte eine Überexpression von Dpl im ZNS keinerlei Einfluss auf Inkubationszeit, Vakuolisierung oder Ausmaß einer PrP^{Sc}-Ablagerung in den Gehirnen TSE infizierter Mäuse (Tuzi et al., 2002). Auch ein Zusammenhang zwischen humanen Prion-Erkrankungen und

verschiedenen Polymorphismen innerhalb des PRND konnte nicht gefunden werden (Mead et al., 2000; Peoc'h et al., 2000). Da es zusätzlich keinerlei Anhaltspunkte dafür gibt, dass Dpl in einer alternativen, krankheitsassoziierten Dpl^{Sc} Form vorliegen kann (Mastrangelo and Westaway, 2001; Nicholson et al., 2001), spielt Dpl in TSE-Erkrankungen nach heutigem Kenntnisstand keine Rolle.

1.4 Zellbiologische Grundlagen

Transmissible Spongiforme Enzephalopathien sind neurodegenerative Erkrankungen. Ein Charakteristikum dieser Erkrankungen ist die Umwandlung des zellulären Prion-Proteins (PrP^c) in eine pathogene Form (PrP^{Sc}) (Prusiner et al., 1998; Collinge, 2001). PrP^c wird in fast allen Geweben exprimiert, eine besonders hohe Expression befindet sich aber in Neuronen (Cashman et al., 1990). Neurone sind wie Endothel- bzw. Epithelzellen polarisierte Zellen. Eine Gemeinsamkeit dieser Zellen besteht in der Ausbildung und Aufrechterhaltung einer Polarität in Bezug auf die Zusammensetzung der Plasmamembranen (Foletti et al., 1999; Mostov et al., 2000). Diese Polarität wird durch Mechanismen, wie z.B. polarisierte Transportvorgänge, Aufbau von Diffusionsbarrieren oder ein spezialisiertes Zytoskelett gewährleistet. Es ist bekannt, dass Defekte in diesen Mechanismen einen Effekt auf die Zellpolarität haben und zur Ausbildung von verschiedenen organspezifischen oder systemischen Krankheiten führen können (Hobbs et al., 1992; Hansson et al., 1995; Menasche et al., 2000). Kenntnis über den Aufbau und die Regulationsmechanismen polarisierter Zellen ist daher für ein besseres Verständnis dieser Krankheiten wichtig.

1.4.1 Morphologie epithelialer Zellen

Seitlich kohärent miteinander zu einem geschlossenen einschichtigen Zellverband verbundene Zellen bilden ein Epithel, das innere und äußere Körperoberflächen bedeckt. Die Zellen innerhalb des Epithels besitzen eine bestimmte Plasmamembran-Polarität. Jede epitheliale Zelle ist unterteilt in eine apikale und eine basolaterale Membran, die durch *tight junctions* voneinander getrennt werden. Grund hierfür ist die Bildung einer Permeationsschranke. Diese verhindert, dass Moleküle durch Diffusion von der einen zur anderen Seite übertreten. Somit wird gewährleistet, dass die beiden Kompartimente, die von dem Epithel getrennt werden, mit ihren unterschiedlichen Zusammensetzungen erhalten bleiben. Die apikale Seite ist entweder zur äußeren Umgebung hin (epidermale

Zellen) oder zum Lumen hin gerichtet (Epithelzellen, die Hohlgorgane auskleiden). Die basolaterale Seite, die den Rest der Zelle einnimmt, kann weiter unterteilt werden in eine basale und laterale Domäne. Die basale Domäne steht in Kontakt mit der darunter liegenden Membran, die laterale Domäne mit den benachbarten Zellen. Diese Zell-Matrix bzw. Zell-Zell Verbindung wird durch Komponenten des Zytoskeletts vermittelt, die dem Zellverband eine mechanische Stabilität verleihen, sowie durch spezielle Zellverbindungen (*junctions*), die eine Adhäsion und Kommunikation der Zellen untereinander ermöglichen (vgl. Abbildung 9). Diese Verbindungen werden eingeteilt in abdichtende (*occluding junctions*), verankernde (*anchoring junctions*) und kommunizierende Verbindungen (*communication junctions*). Zu den abdichtenden Verbindungen gehören die *tight junctions*, die benachbarte Zellen dicht zusammenhalten und eine selektive Permeationsbarriere darstellen. Verbindungen, wie z.B. *adherens junctions*, Desmosome und Hemidesmosome (*anchoring junctions*), verankern das Zytoskelett einer Zelle entweder mit dem Zytoskelett der Nachbarzelle oder der extrazellulären Matrix. *Gap junctions* erlauben dagegen den Zellen, z.B. anorganische Ionen oder kleine wasserlösliche Moleküle auszutauschen (*communication junctions*).

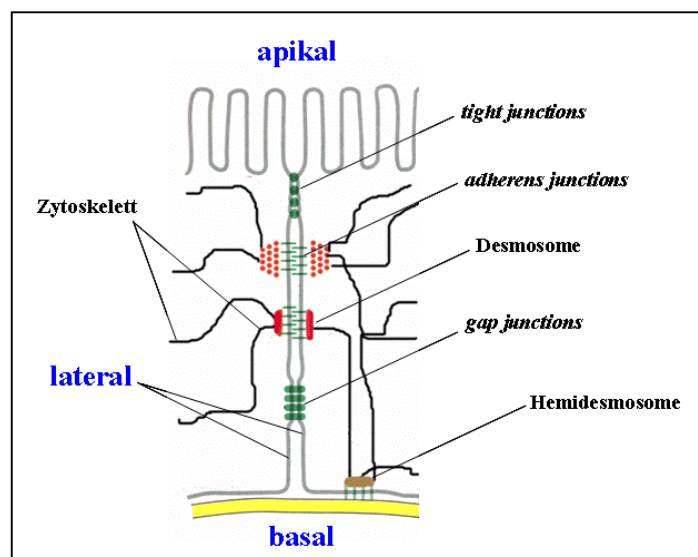


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Morphologie epithelialer Zellen und ihre Verbindung miteinander.

Dargestellt sind zwei aneinander grenzende Epithelzellen. Blau beschriftet sind die polarisierten Plasmamembranen der Zellen, schwarz beschriftet sind die Zellverbindungen und das intrazelluläre Zytoskelett.

1.4.2 Polarisierter Transport in Epithelzellen

Polarisierte Zellen sind durch zwei in ihrer Funktion unterschiedliche, durch *tight junctions* voneinander getrennte, Plasmamembranen charakterisiert. Die beiden Seiten besitzen unterschiedliche Protein-, Lipid- und Zuckerzusammensetzungen. Der Entstehung und der Aufrechterhaltung dieser beiden verschiedenen Domänen muss eine strikte Regulation zugrunde liegen. Diese gewährleistet, dass Transportprozesse neu synthetisierter Proteine innerhalb der Zelle spezifisch sind, so dass bestimmte Proteine entweder die apikale oder die basolaterale Zelloberfläche erreichen. Des Weiteren müssen die Proteine an den beiden Zelloberflächen gezielt internalisiert, degradiert oder wieder verwendet werden. Die polarisierte Verteilung der Proteine resultiert aus mehreren Prozessen (Mostov et al., 2000).

Neu synthetisierte Proteine gelangen vom ER in den Golgi-Apparat und von dort in das *Trans*-Golgi-Netzwerk (TGN). Das TGN ist in polarisierten Zellen der Ort, in dem die Proteine, die entweder zur apikalen oder basolateralen Plasmamembran transportiert werden sollen, getrennt und in verschiedene Vesikel sortiert werden. Bislang sind zwei Möglichkeiten für einen Transport dieser Vesikel an die Zelloberfläche bekannt. Der biosynthetische Weg stellt einen direkten Weg vom *Trans*-Golgi-Netzwerk zur Zelloberfläche dar (vgl. Abbildung 10 (A)); im transzytotischen Weg werden die Vesikel zunächst zur basolateralen Plasmamembranseite transportiert, die Proteine anschließend durch Endozytose direkt wieder aufgenommen und mittels Endosomen zur apikalen Membran transportiert (vgl. Abbildung 10 (B)) (Bonilha et al., 1997; Mostov et al., 2000). Alle epithelialen Zellen benutzen sowohl den biosynthetischen als auch den transzytotischen Weg, um eine korrekte, der Polarisation entsprechenden Plasmamembranzusammensetzung zu erreichen und diese zu erhalten (Bomsel et al., 1989). Welcher dieser Wege allerdings bevorzugt wird, ist Zelltyp-spezifisch (Bastaki et al., 2002).

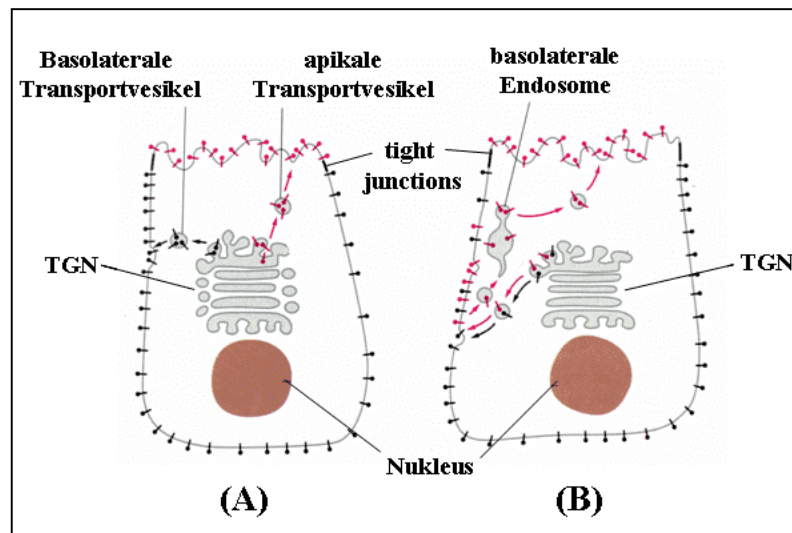


Abbildung 10: Schematische Darstellung der biosynthetischen und transzytotischen Transportwege in polarisierten Epithelzellen.

(A) Biosynthetischer, direkter Transportweg von neu synthetisierten Proteinen von dem *Trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) zur apikalen (rot) oder basolateralen (schwarz) Zelloberfläche. (B) Indirekter, transzytotischer Transportweg neu synthetisierter Proteine. Zur basolateralen Domäne transportierte Proteine werden durch Endozytose wieder in die Zelle aufgenommen, zu Endosomen geleitet und anschließend zur apikalen Seite durch Transzytose transportiert (Abbildung aus (Alberts et al., 2002)).

Eine Kontrolle der Proteinverteilung an der Plasmamembran und die Aufrechterhaltung der Zellpolarität erfolgt nicht nur durch den polarisierten Transport neu synthetisierter Proteine oder durch die Ausbildung einer Diffusionsbarriere zwischen apikaler und basolateraler Membran. Die *steady-state* Proteinzusammensetzung der Plasmamembran wird durch Endozytose kontinuierlich verändert. MDCK-Zellen sind z.B. in der Lage, 50% ihrer Zelloberfläche innerhalb einer Stunde zu endozytieren (Mostov et al., 2003). Zusätzliche Mechanismen müssen eine korrekte Lokalisation der Proteine auf den Zelloberflächen gewährleisten. Eine Möglichkeit ist das selektive Zurückhalten der Proteine auf der Plasmamembran. Hierfür ist wahrscheinlich bei vielen Proteinen eine 80-90 AS große, homologe Protein-Protein-Interaktionsdomäne (PDZ) verantwortlich (Fanning and Anderson, 1999; Hung and Sheng, 2002). Es konnte für Proteine mit einer PDZ Domäne gezeigt werden, dass sie mit Bereichen in der zytoplasmatischen Domäne von Transmembranproteinen interagieren und dies den Transport und die Lokalisation dieser Proteine beeinflussen kann (Kim, 1997; Brown and Breton, 2000; Chung et al., 2002). Durch diese Interaktion können die Proteine z.B. von einer endozytotischen Aufnahme ausgeschlossen und an einer spezifischen Zelloberfläche zurückgehalten werden (Harris and Lim, 2001). Internalisierte Proteine gelangen dagegen in endosomale Vesikel. Von dort aus werden sie entweder weiter zu Lysosomen (Degradation) oder zurück zu der Plasmamembran transportiert, von der sie endozytotisch aufgenommen wurden.

1.4.3 Sortierungssignale in Proteinen

Der polarisierte Transport von Proteinen zur Zelloberfläche, die Aufrechterhaltung ihrer Lokalisation oder auch die Wiederaufnahme in die Zelle geschieht nicht zufällig. Diese Vorgänge sind abhängig von spezifischen Signalen innerhalb der Proteine. Diese Signale sind dafür verantwortlich, dass die Proteine im TGN in bestimmte apikale oder basolaterale Transportvesikel integriert werden, somit spezifisch eine der beiden Seiten erreichen und dort entweder an der Membran zurückgehalten oder endozytiert werden (Ikonen and Simons, 1998).

1.4.3.1 Basolateraler Transport und Sortierungssignale

Basolaterale Sortierungssignale wurden bisher nur in zytoplasmatischen Domänen der Proteine gefunden. Klassische Sortierungssignale enthalten auf Tyrosin oder Dileucin basierende Aminosäuremotive (Matter et al., 1992; Mellmann, 1996). Es wurde auch eine basolaterale Sortierung von Proteinen beschrieben, die dihydrophobe Motive beinhalten oder aber keinerlei Sequenzhomologie zu einem dieser Motive zeigen (Letourneur and Klausner, 1992; Le Gall et al., 1995). Ein atypisches basolaterales Sortierungssignal, das aus nur einem einzigen Leucin besteht, wurde für das Typ I Membranprotein CD147 beschrieben (Deora et al., 2004). Untersuchungen verschiedener Hormonrezeptoren zeigten aber auch, dass unabhängig von einer primären AS-Sequenzhomologie mögliche basolaterale Sortierungssignale den Sekundärstrukturen der Proteine zugeordnet werden können (Beau et al., 2004).

Der Transport von Proteinen zur basolateralen Plasmamembran wird vermittelt durch *clathrin coated vesicles*, die für den vesikulären Transport von Proteinen vom TGN zur Plasmamembran oder auch deren endozytotischen Aufnahme von der Zelloberfläche verantwortlich sind. Diese Transportvesikel bilden sich durch das Einschnüren von Membranen, die an ihrer Oberfläche Clathrin und Adaptor Proteine (AP) enthalten. AP-1B und AP4 erkennen und binden basolaterale Sortierungssignale, schließen die zu transportierenden Proteine selektiv in Vesikel ein und regulieren dadurch den basolateralen Transport (Folsch et al., 1999).

1.4.3.2 Apikaler Transport und Sortierungssignale

Im Gegensatz zu den zytoplasmatisch lokalisierten basolateralen Sortierungssignalen ist eine apikale Sortierung von Proteinen abhängig von im Lumen gelegenen Domänen, Transmembrandomänen oder Membranverankerungen. Hierzu zählen vor allem posttranslationale Proteinmodifikationen, wie z.B. Glykosylierungen (Gut et al., 1998; Benting et al., 1999) und GPI-Verankerung (Fiedler et al., 1993; Le Gall et al., 1995); aber auch PDZ-Domänen können für einen apikalen Transport verantwortlich sein (Milewski et al., 2001).

Die Transportwege der Proteine vom TGN zur apikalen Zelloberfläche werden stark diskutiert. Wahrscheinlich ist eine durch die apikalen Sortierungssignale vermittelte Zusammenlagerung der Proteine in Cholesterolsphingolipidhaltigen Mikrodomänen (*lipid rafts*) innerhalb des TGN verantwortlich dafür, dass diese entlang mikrotubulärer Strukturen innerhalb der Zelle nach Verlassen des TGN zur Zelloberfläche gelangen (Simons and Ikonen, 1997). Die Zusammenlagerung der *raft* Komponenten und eine Stabilisierung der Vesikel werden dabei von Caveolin-1 vermittelt (Zurzolo et al., 1994). Es konnte aber für eine Reihe apikal transportierter Proteine auch eine *raft*-unabhängige Sortierung beobachtet werden (Arreaza and Brown, 1995). Für Proteine mit N-Glykosylierungen wurde unter anderem postuliert, dass diese von Lektin-ähnlichen Proteinen erkannt und gebunden werden und mit diesen zusammen zur apikalen Plasmamembran transportiert werden, vermittelt durch Signale innerhalb dieser Sorting-Lektine (Fiedler et al., 1994). Aber auch hier konnte wiederum bei einer Reihe von Proteinen eine apikale Sortierung unabhängig von ihrer Glykosylierung gezeigt werden (Marzolo et al., 1997; Bravo-Zehnder et al., 2000).

Schließlich wird auch ein Einfluss zytoplasmatischer Signale auf eine apikale Sortierung nicht mehr ausgeschlossen. Es gibt allerdings keinerlei Anhaltspunkte dafür, dass diese Signale mit den für die basolaterale Sortierung verantwortlichen Adaptor Proteinen interagieren (Chuang and Sung, 1998; Gokay et al., 2001).

Apikale Sortierungssignale, aber auch ihre Transportwege zur apikalen Zelloberfläche sind offensichtlich vielseitig und keineswegs eindeutig geklärt.

1.4.3.3 Hierarchie der Sortierungssignale

Aus der Komplexität der unterschiedlichen basolateralen und apikalen Sortierungssignale lässt sich schließen, dass die Sortierungsmaschinerie der Zelle Unterschiede in der Priorität der erkennbaren Signale machen muss, wenn mehrere Signale innerhalb eines Proteins vorliegen. Basolaterale Signale besitzen dabei *per se* eine höhere Priorität als apikale Signale. Bei Inaktivierung oder Entfernung eines primären Sortierungssignals kann es gleichzeitig zur Aktivierung eines sonst verborgenen Signals kommen (Casanova et al., 1991; Hunziker et al., 1991). Dies kann aber ebenfalls durch Überladung bzw. Absättigung bestimmter Transportmechanismen im TGN zustande kommen (Matter and Mellmann, 1994; Marmorstein et al., 2000). Die Aktivierung sekundärer Sortierungssignale kann daher z.B. zu einer apikalen Lokalisation eigentlich basolateral sortierter Proteine führen (Jacob et al., 1999). Es ist aber auch möglich, dass die Zelle das Protein ohne Selektivität in einem *default pathway* zur Zelloberfläche transportiert. Der Mechanismus, der zur Festlegung einer Hierarchie von verschiedenen Sortierungssignalen innerhalb eines Proteins führt, ist allerdings noch unbekannt.

1.5 MDCK-Zellen als Modellsystem für die Untersuchung polarisierter Transportvorgänge krankheitsassoziierter Proteine

Für neuronale Zellen ist bekannt, dass sie, ähnlich wie Epithelzellen, in verschiedene funktional voneinander getrennte Domänen polarisieren, deren Aufrechterhaltung ebenfalls durch spezifische Sortierungsmechanismen innerhalb der Zellen gewährleistet wird. Auf diesem Hintergrund postulierten Dotti und Simons ein Modell, bei dem die Plasmamembran des Zellkörpers und der Dendriten der basolateralen Seite, die Plasmamembran des Axons und dessen verzweigte Nervendigungen der apikalen Seite von Epithelzellen entspricht (vgl. Abbildung 11). Viele Proteine, bei denen ein polarisierter Transport zu einer bestimmten Zelloberfläche in Epithelzellen nachgewiesen werden konnte, sind auch in Neuronen auf der vergleichbaren Plasmamembran-Domäne lokalisiert (Dotti and Simons, 1990).

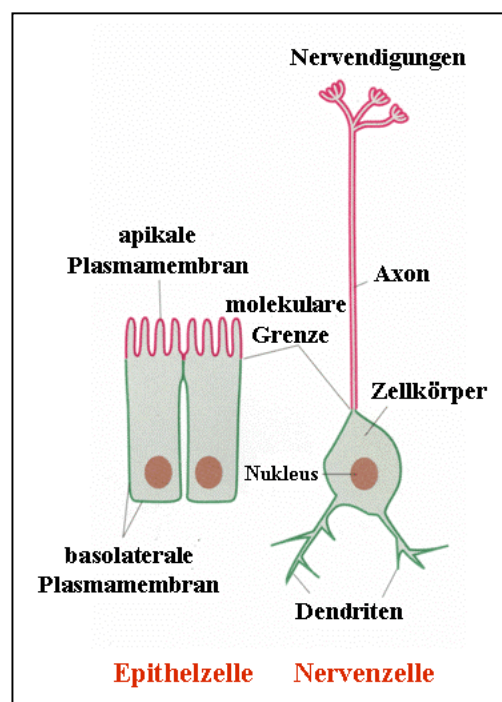


Abbildung 11: Schematische Darstellung der polarisierten Domänen in Epithelzellen und neuronalen Zellen.

Dargestellt sind eine Epithelzelle und eine neuronale Zelle. Apikale bzw. axonale Domänen sind rot, basolaterale bzw. dendritische Domänen sind grün gekennzeichnet (Abbildung aus (Alberts et al., 2002)).

Nach heutigem Kenntnisstand ist sicher, dass es viele Ausnahmen zu diesem apikalen/axonalen bzw. dendritischen/basolateralen Modell gibt (Simons et al., 1995; Jareb and Banker, 1998; Poyatos et al., 2000). Epitheliale und neuronale Transport- und

Sortierungsmechanismen, die zur Ausbildung und Aufrechterhaltung einer Polarität führen, können daher nicht direkt übertragen oder gleichgesetzt werden (Colman, 1999). Bei der Untersuchung verschiedener krankheitsassoziiierter Proteine konnte aber in früheren Studien gezeigt werden, dass die Charakterisierung polarisierter Transportvorgänge in epithelialen MDCK-Zellen dazu beitragen kann, pathophysiologische Mechanismen aufzuzeigen. So konnte z.B. als eine Ursache für die Entstehung der familiären Hypercholesterolämie eine Punktmutation innerhalb des basolateralen Sortierungssignals des LDL-Rezeptors identifiziert werden, die zu einer Fehlsortierung des Rezeptors auf die apikale Plasmamembran führt (Hobbs et al., 1992; Koivisto et al., 2001). Die Aufnahme von Cholesterol in die Hepatozyten, die normalerweise ausschließlich von der basolateralen Seite stattfindet, wird dadurch stark reduziert; die Ausbildung einer Hypercholesterolämie ist die Folge. Aber auch bei der Alzheimer Krankheit, der Mukoviszidose, dem Liddle-Syndrom, der Wilson-Krankheit oder bei der angeborenen Diabetes insipidus konnte ein Einfluss polarisierter Transportvorgänge auf die Entstehung der Krankheiten gezeigt werden (Lo et al., 1994; De Strooper et al., 1995; Hansson et al., 1995; Moyer et al., 1999; Forbes and Cox, 2000; Marr et al., 2002).

1.5.1 Proteolytische Prozessierung des β -Amyloid Vorläufer Proteins (β APP)

Das β -Amyloid Vorläuferprotein (β APP) kann auf dem sekretorischen Prozessierungsweg von verschiedenen Proteasen, den α -, β - und γ -Sekretasen, proteolytisch gespalten werden (vgl. Abbildung 12). Überwiegend findet eine Prozessierung durch die α -Sekretase statt, wodurch die Ektodomäne als lösliches Molekül sezerniert wird (β APPs α). Der in der Membran verbleibende C-terminale Rest (β APP CTF α) wird anschließend durch die γ -Sekretase gespalten. Hierdurch wird die intrazelluläre Domäne von β APP (*β APP intracellular domain*, AICD (Sastre et al., 2001)) und das lösliche p3 freigesetzt (Haass et al., 1993). Wird β APP hingegen zuerst durch die β -Sekretase (BACE) und anschließend durch die γ -Sekretase geschnitten, so entsteht aus dem zunächst generierten C-terminalen Rest (β APP CTF β), anstelle von p3, das Amyloid β -Peptid A β und AICD (Haass et al., 2002).

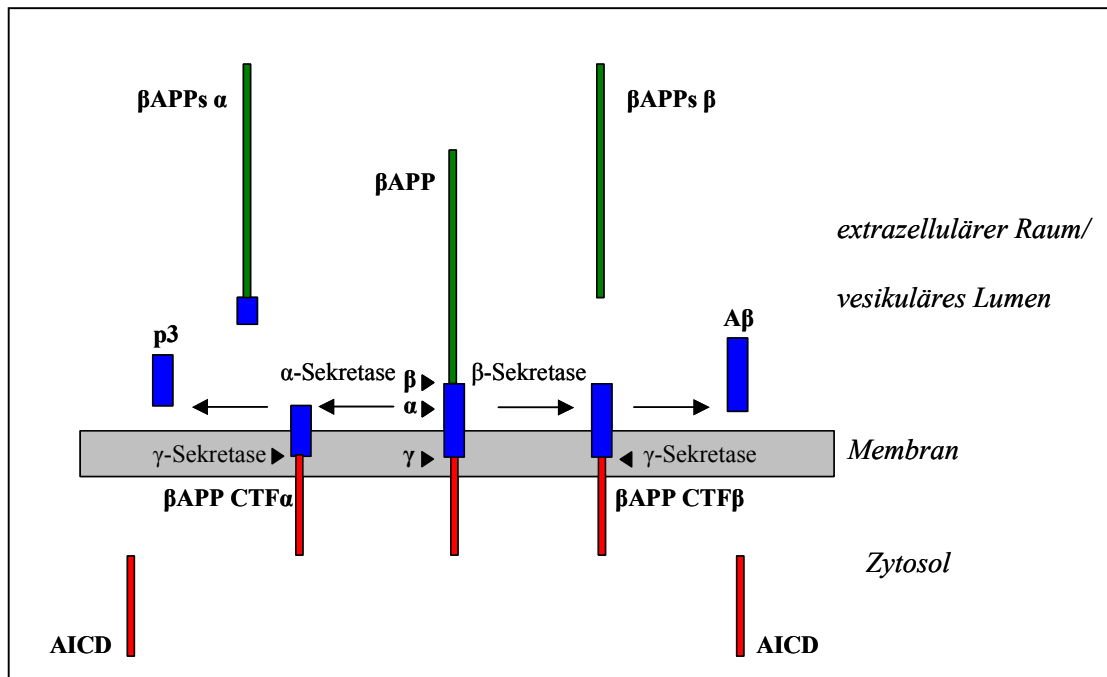


Abbildung 12: Proteolytische Prozessierung von β -APP durch α -, β - und γ -Sekretase.

Dargestellt ist die β APP-Ektodomäne (grün), die intrazelluläre Domäne (rot) und die A β -Domäne (vergrößert, blau), sowie die nach der Prozessierung durch die gekennzeichneten Sekretasen entstehenden Produkte (Modifiziert nach (Haass et al., 1993)).

1.5.2 Polarisierter Transport der Alzheimer-assoziierten Proteine in MDCK-Zellen

In der Alzheimer Krankheit (AD) kommt es zur Bildung von Amyloid-Plaques in dem an polarisierten Zellen angrenzenden extrazellulären Raum. Diese Ablagerungen entstehen in der Umgebung von Neuriten und zerebralen Blutgefäßen, die das A β -Peptid sezernieren. Polarisierter Transportvorgänge können daher im Zusammenhang mit Proteinen, die mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert sind, eine wichtige Rolle spielen. Das Sortierungsverhalten der Alzheimer-relevanten Proteine wurde in früheren Studien unter Verwendung von MDCK-Zellen als Modellsystem analysiert, um einen möglichen Einfluss polarisierter Transportmechanismen auf die Produktion und Ablagerung von A β aufzuzeigen. Bei diesen Untersuchungen konnte für das β -Amyloid Vorläuferprotein (β APP) ein basolateraler Transport festgestellt werden (Haass et al., 1994; Haass et al., 1995a; Lo et al., 1994; De Strooper et al., 1995). Die Aktivität der α -Sekretase befindet sich fast ausschließlich in basolateralen Kompartimenten. Für die β -Sekretase BACE konnte dagegen hauptsächlich eine Lokalisation in apikalen Kompartimenten festgestellt

werden (Capell et al., 2002). Nach dem polarisierten Transport von β APP zur basolateralen Plasmamembran ist damit die Wahrscheinlichkeit einer α -Sekretase vermittelten β APP Prozessierung wesentlich höher als eine BACE vermittelte Prozessierung. Das durch die α -Sekretase freigesetzte β APPs α wird daher fast ausschließlich in das basolaterale Medium sekretiert (Haass et al., 1994). Das durch BACE prozessierte, sekretierte β APPs β kann hingegen sowohl apikal als auch basolateral nachgewiesen werden (Capell et al., 2002). Die aus der α - oder β -Prozessierung von β APP resultierenden, membrangebundenen Fragmente β APP CTF α bzw. β APP CTF β enthalten noch das in der zytoplasmatischen Domäne von β APP vorhandene Sortierungssignal und werden basolateral transportiert (Haass et al., 1995a). Im Anschluss werden sowohl β APP CTF α als auch β APP CTF β durch die γ -Sekretase prozessiert, deren Aktivität sich auf beiden Plasmamembranseiten befindet (Capell et al., 2002). Sowohl das aus β APP CTF α entstehende p3 als auch das aus β APP CTF β stammende A β werden in das basolaterale Medium freigesetzt (Haass et al., 1994; Lo et al., 1994; De Strooper et al., 1995).

Die Untersuchung des polarisierten Transportes der Alzheimer-assoziierten Proteine zeigt daher einen Zusammenhang zwischen polarisierten Transportvorgängen und der Bildung des im Verlauf der Krankheit abgelagerten Proteins A β auf. Durch den differentiellen Transport von BACE und ihrem Substrat β APP wird die Entstehung von A β limitiert (Capell et al., 2002). Die unter physiologischen Bedingungen höhere Wahrscheinlichkeit einer α -Sekretase vermittelten β APP Prozessierung verringert ebenfalls die Bildung des krankheitsauslösenden A β . In einer schwedischen Familie mit familiärer Alzheimer Erkrankung (FAD) wurde eine erhöhte Produktion des krankheitsauslösenden Proteins A β nachgewiesen (Citron et al., 1992; Cai et al., 1993). Es konnte gezeigt werden, dass dies auf eine Doppelmutation innerhalb des β APP (β APP schwedische Mutation; β APP_{sw}) zurückzuführen ist. Diese erhöht die Affinität von BACE zu ihrem Substrat, so dass β APP_{sw} auf dem sekretorischen Transportweg, vor der polarisierten Sortierung, verfrüht von BACE geschnitten wird (Haass et al., 1995b). Die α -Sekretase vermittelte Prozessierung, durch die normalerweise eine A β Bildung limitiert ist, wird dadurch vermindert. Bei der Untersuchung des polarisierten Transportes dieser β APP_{sw} Mutation konnte eine apikale Sekretion von β APPs β und eine erhöhte basolaterale Sekretion von A β festgestellt werden (Lo et al., 1994). Die Folge einer vermehrten A β Bildung ist eine massive Ablagerung von Plaques und die Entstehung eines frühen Krankheitsbildes. Dies zeigt, dass die Untersuchung polarisierter Transportvorgänge und die dabei eventuell auftretenden Veränderungen in dem Sortierungsverhalten krankheitsassoziierten Proteine

dazu beitragen können, die pathologischen Mechanismen einer Krankheit besser nachvollziehen und erklären zu können.

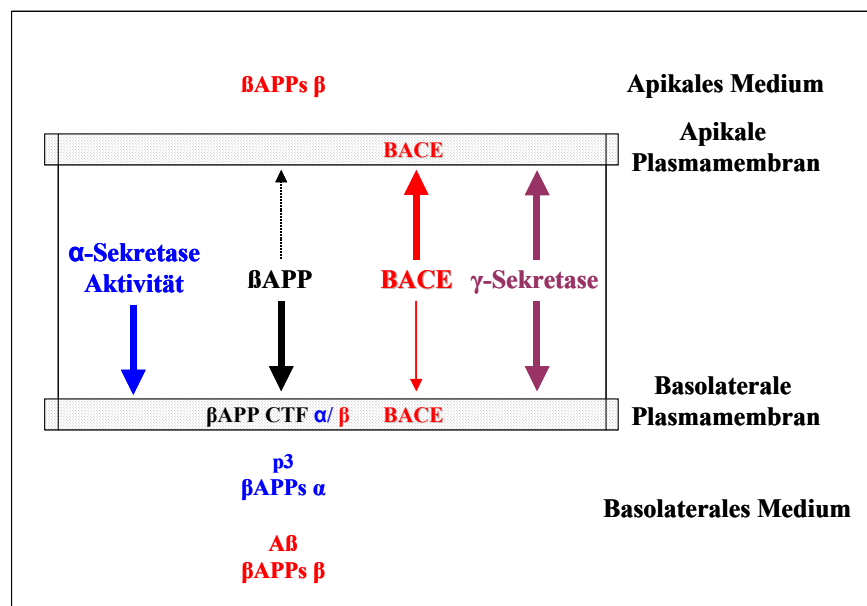


Abbildung 13: Polarisierte Sortierung von β APP und den proteolytischen Proteasen.

Dargestellt ist die Oberflächenverteilung von β APP (schwarz), BACE (rot), α -Sekretase Aktivität (blau) und γ -Sekretase (lila). Die resultierenden Prozessierungsprodukte sind in den Farben der proteolytischen Proteasen dargestellt.

1.5.3 Das MDCK Modellsystem

Die Untersuchung der Alzheimer-assoziierten Proteine zeigt, dass die Charakterisierung polarisierter Transportprozesse in MDCK-Zellen dazu beitragen kann, pathophysiologische Mechanismen für die Ausbildung einer Krankheit aufzuzeigen. In früheren Studien wurden aber auch das Sortierungsverhalten und die Sortierungsmechanismen anderer Proteine in MDCK-Zellen analysiert. MDCK-Zellen stellen daher ein etabliertes Modellsystem dar, um Transportprozesse in polarisierten Zellen zu untersuchen (McRoberts et al., 1981; Richardson et al., 1981; Fuller et al., 1984; Bomsel et al., 1989). Im Vergleich zu neuronalen Zellen sind MDCK-Zellen leichter zu kultivieren und können stabil transfiziert werden. Dies ermöglicht die Herstellung von Zelllinien, die als Einzelzellklone über längere Zeit in Kultur gehalten werden können und dabei das zu untersuchende Protein konstitutiv mit gleich bleibender Expression synthetisieren. Um den polarisierten Transport von Proteinen charakterisieren zu können, werden MDCK-Zellen in Kammern auf einer permeablen Polycarbonatmembran kultiviert (vgl. Abbildung 14), so

dass sie apikal und basolateral Zugang zu Nährmedium haben. Nach ca. 4-5 Tagen bilden die Zellen eine polarisierte Monozellschicht, die den Filter abdichtet. In dieser Zeit kommt es zur Ausbildung einer Polarität. Diese Polarisierung bedeutet für die MDCK-Zelle, dass sich die apikale Membran von der basolateralen Membran in ihrer Funktion und Zusammensetzung unterscheidet (Balcarova-Stander et al., 1984). Die beiden unterschiedlichen Plasmamembranen werden voneinander unabhängig experimentell zugänglich (Bomsel et al., 1989), so dass der polarisierte Transport zu und die Lokalisation von Proteinen an einer der beiden Plasmamembranenseiten spezifisch durch z.B. Immunfluoreszenz oder Biotinylierung (vgl. 2.5.5) untersucht und nachgewiesen werden kann.

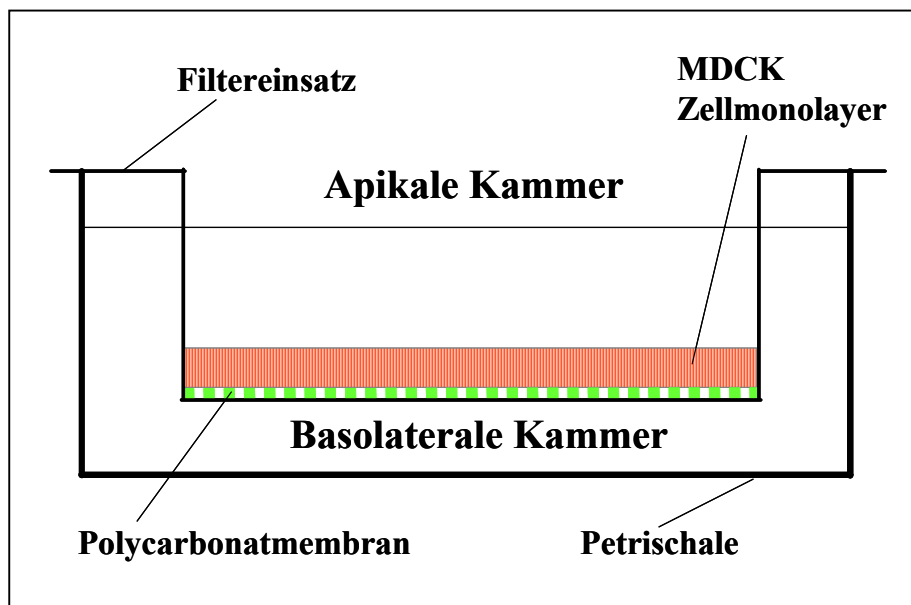


Abbildung 14: MDCK Zellmonolayer in einer Transwell-Filterkammer.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ein gerichteter intrazellulärer Transport von Proteinen ist essentiell für das Entstehen und den Erhalt physiologischer Funktionen von polarisierten Zellen, wie z.B. Neuronen, Epithel- oder Endothelzellen. Es ist bekannt, dass Defekte in diesen Transportvorgängen die Zellpolarität beeinflussen und zur Ausbildung von Krankheiten führen können (Hobbs et al., 1992; Hansson et al., 1995; Menasche et al., 2000). Für verschiedene Proteine, die eine fundamentale Rolle in neurodegenerativen Erkrankungen spielen, wurden in der Vergangenheit polarisierte Transportvorgänge eingehend untersucht (Haass et al., 1994; Lo et al., 1994; De Strooper et al., 1995; Haass et al., 1995a; Sastre et al., 2001). So konnte für die mit der Alzheimer Krankheit assoziierten Proteine gezeigt werden, dass polarisierte Transportvorgänge die Bildung des krankheitsauslösenden Proteins A β beeinflussen können (Capell et al., 2002). Über das Sortierungsverhalten des Prion-Proteins (PrP), dem eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien zukommt, war dagegen zu Beginn dieser Arbeit nichts bekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher zu untersuchen, ob PrP, wie auch andere mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziierten Proteine, in *Madin-Darby canine kidney* (MDCK) Zellen einem polarisierten Transport unterliegt. Bei Vorliegen eines polarisierten Transportes sollten potentielle Sortierungssignale für diesen Transport identifiziert werden. Das Sortierungsverhalten verschiedener Mutanten sollte Aufschluss darüber geben, welche Domänen innerhalb des Prion-Proteins Einfluss auf den polarisierten Transport nehmen bzw. letztendlich für diesen verantwortlich sind. Da für verschiedene Proteine eine Veränderung im physiologischen Sortierungsverhalten mit einer Krankheitsentstehung (vgl. 1.5) in Zusammenhang gebracht werden konnte, sollte durch die Charakterisierung pathogener Mutanten eine mögliche Rolle des polarisierten Transportes in der Pathogenese von Prion-Erkrankungen aufgezeigt werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es auch, den polarisierten Transport des PrP-homologen Proteins Doppel (Dpl) zu untersuchen. Dpl weist auf Aminosäureebene nur eine ca. 25% Homologie zu PrP auf. Die C-terminale Domäne besitzt allerdings hohe strukturelle Ähnlichkeit zu der C-terminalen Domäne von PrP. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Dpl in PrP-defizienten Mäusen Neurodegeneration auslöst, die durch Wiedereinführung von PrP verhindert werden kann (Rossi et al., 2001). In dieser Arbeit wurde eine vergleichende Analyse des Sortierungsverhaltens von PrP und dessen homologen Proteins Dpl durchgeführt, um eventuelle Unterschiede in dem

Sortierungsverhalten dieser beiden homologen Proteine aufzeigen. Dies könnte einen Ansatzpunkt liefern, den noch immer ungeklärten pathophysiologischen Mechanismus des antagonistischen Effekts von PrP auf die Dpl-induzierte Neurodegeneration besser zu verstehen.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Materialien

2.1.1 Allgemein

Schüttler (KM2)	Edmund Buhler
Überkopf-Schüttler (Roto-shake Genie)	Scientific Industries
Thermoschüttler (Thermomixer compact)	Eppendorf
Magnetrührer (IKAMAG RCT basic)	IKA Labortechnik
Vortex (Vortex Genie 2)	Scientific Industries
Wasserbad MT	Roth, Karlsruhe
Mikrowelle	Bosch
Heizblöcke	Liebisch
Zentrifuge für Eppendorfreaktionsgefäße (Biofuge pico)	Heraeus, Kendro
Tischzentrifuge Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Biofuge A	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifuge für Eppendorfreaktionsgefäße (Biofuge fresco)	Heraeus, Kendro
Kühlzentrifuge (Megafuge 1.0R)	Heraeus, Kendro
Kühlzentrifuge (J2-21M)	Beckmann
Rotoren: Type JA-10, Type JA-14, Type JA-20	Beckmann
Kühlzentrifuge (GS-6R)	Beckmann
Rotoren: Type GH3.8	
pH-Elektrode (Blueline 23 pH)	Schott
pH-Meter (Inolab pH Level 1)	WTW
pH-Meter	Fischer Scientific, Nidderau
Laborwaage Mettler Toledo PB602	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Analysenwaage Mettler Toledo AG285	Mettler-Toldeo GmbH, Giessen
Analysenwaage (Analytical + 200 g - 0,0001 g)	Ohaus
Feinwaage (Standard 2000 g - 0,01 g)	Ohaus

Fotometer (SmartSpec™ 3000)	Bio-Rad
Einwegküvetten (10 x 11x 45 mm)	Sarstedt
Quarzküvetten (10 x 10 x 45 mm)	Hellma
Spektralfotometer DU-640	Beckmann
Wärmeschrank 37°C (Function line)	Heraeus
Brutschränke	Heraeus
Wärmeschrank 56°C	Heraeus
Gefrierschrank -20°C	Elektrolux
AEG Öko-Arctis -20°C	AEG, Frankfurt am Main
Forma Scientific Bio Freezer -80°C	ThermoQuest, Egelsbach
Kühlschrank 4°C	Elektrolux
Kühlschrank AEG Öko Santo 4°C	AEG, Frankfurt am Main
Autoklav (Tuttnauer 3850 EL)	Systec
Wasseraufbereitungsanlage (Ionenaustauscher, Milli-Q academic)	Millipore
Pipettierhilfe (Accu-Jet)	Brand
Pipettierhilfe pipet-aid	Drummond Scientific, Broomall, PA, USA
Einwegauslaufpipetten (25 ml, 10 ml, 5 ml)	Sarstedt
Einmalpipetten, steril	Nunc, Wiesbaden
Pipetten Gilson	Abimed, Langenfeld
P2, P10, P20, P200, P1000	
Pipettenspitzen für Gilson P-Serie	Continental Lab Products, San Diego, CA, USA
Einmal-Pasteurpipetten	neoLab, Heidelberg
Reaktionsgefäße (50 ml, 15 ml, 2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml, 0,2 ml)	Sarstedt
Safe-Lock Micro Test Tubes	Eppendorf, Hamburg
1,5ml und 2ml	
Schraubdeckel-Reaktionsgefäße	Sarstedt
1,5ml und 2ml	
PCR-Reaktionsgefäße 0,2ml	Abgene, Hamburg

Propylen-Zentrifugenröhren 15 ml und 50 ml	Falcon, Heidelberg
Centricon YM-10 -Konzentratoren Dialyseschlauch („cut off“ 12-14 kDa, 28 mm Durchmesser)	Millipore Spectrapor
Skalpellklinge Einmalkanülen Neolus 26G 0,45mm Einmalspritzen Omnifix-F1ml Einmalspritzen 50 ml	Bayha, Tuttlingen Terumo, Tokyo, Japan Braun, Melsungen Becton Dickinson, Heidelberg
2.1.2 Molekularbiologie	
PCR-Maschine (Mastercycler personal) T3 Thermocycler	Eppendorf Biometra GmbH, Göttingen
Schüttelinkubator (Certomat BS-1) Elektrophoresekammern (Modell: B1; Modell: B2) Agarosegeldokumentationseinheit UV-Lampe (White/Ultraviolet Transilluminator) Kamera (CCD Video Camera Module) Dokumentation (Quickstore plus II) Drucker (p91), Mitsubishi	B. Braun Biotech Owl Separation System MS Laborgeräte
2.1.3 Zellkultur	
Sterilwerkbank (Hera Safe HS12) CO ₂ -Inkubator (Hera cell) Bunsenbrenner (Vulcan) Zentrifuge (Megafuge 1,0) Wasserbad (Typ 1002 ; Typ 1003) Mikroskop (Wiloverts 10x 4/10/20) Klonierungszyylinder (8x8 mm)	Heraeus, Kendro Heraeus, Kendro Heraeus, Kendro Heraeus, Kendro GFL Hund Bellco

Einfriergefäße (Qualifreeze)	Qualilab
Einwegpipetten, steril (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt
Einweg-PP-Röhrchen, steril (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Polysterol-Röhrchen, steril, 18 x 95 mm	Greiner, Frickenhausen
Pasteurpipetten	Sarstedt
Zelllifter	Corning Costar
Zellkulturschalen (60 x 15 mm, 100 x 17 mm, 24 well, 12 well)	Nunc
Zellkulturflaschen	BD Biosciences Falcon, Heidelberg
Zellkulturschalen Ø3,5cm	BD Biosciences Falcon Heidelberg
Zellschaber	Corning Inc., Corning, NY, USA
Filterkammern (Transwell, Polycarbonatmembran 3,0 µm) Durchmesser je Filter 24 mm (6-well Platte)	Corning Costar
Sterilfiltereinheiten (250 ml, 500 ml)	Nalgene
Sterilfilter Millex®-HA 0,45µm	Millipore, Eschborn
Sterilfilter Millex®-GS 0,22µm	Millipore, Eschborn
Zählkammer, Neubauer	Merck eurolab, Ismaning

2.1.4 Proteinbiochemie und Immunocytochemie

Elektrophoresekammern

Polyacrylamidgel-Elektrophorese- Kammer Hoefer SE600 mit Power Supply EPS	Pharmacia Biotech, Freiburg
Mini-PROTEAN 3 electrophoresis cell	Bio-Rad
X Cell Sure Lock™ Mini Cell	Novex, Invitrogen

Transferkammer:

Mini Trans-Blot transfer cell	Bio-Rad
Transferkammer Hoefer TE-Serie mit Power Supply EPS 2A200	Pharmacia Biotech, Freiburg

Whatman Chromatographie-Papier

Schleicher & Schuell,
Dassel

Protran (Nitrozellulose Transfer Membran)	Schleicher & Schuell, Dassel
Spannungsquelle (Power Pac 300)	Bio-Rad
Scanner: Umax Astra 1220S	
Filmentwicklungsgerät (Curix 60)	Agfa
Expositionskassetten für Röntgenfilme	Fischer Scientific, Nidderau
Röntgenfilme Kodak-X-Omat DS BioMax TMMR	Kodak Kodak
Photoshop 5.5, Universal Imaging Corporation Adobe	

2.2 Enzyme, Kits (Versuchssysteme), Chemikalien

2.2.1 Allgemein

Aceton	Merck, Darmstadt
BSA	USB, Cleveland, OH, USA
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Sigma, Deisenhofen
Glycin	USB, Cleveland, OH, USA
Glycerol	USB, Cleveland, OH, USA
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	USB, Cleveland, OH, USA
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
SDS	Roth, Karlsruhe
Tris	USB, Cleveland, OH,

Triton X-100	USA USB, Cleveland, OH, USA
Tween-20	USA USB, Cleveland, OH, USA

Nicht spezifisch aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Roth, Merck, Serva oder Sigma bezogen. Sind keine anderen Angaben gemacht, so wurden die Chemikalien mit dem Reinheitsgrad p.a. eingesetzt. Alle Lösungen wurden mit voll entsalztem H₂O angesetzt, das mit einer Milli-Q Anlage zur bidest. Qualität aufgereinigt wurde und einen elektrischen Widerstand >18.2 MΩ cm bei 25°C hat. Bei Prozentangaben handelt es sich um Volumenprozent, soweit keine anderen Angaben gemacht wurden.

2.2.2 Molekularbiologie

Agarose (Electrophoresis Grade)	Gibco, Invitrogen
Alkaline Phosphatase (Shrimp)	Roche Biochem.
Bacto-Agar	Becton, Dickinson
Bacto-Trypton	Becton, Dickinson
Desoxynucleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Sigma, Deisenhofen
DNA Molekulargewichts Marker	MBI Fermentas, St. Leon- Rot
1 kb DNA-Leiter	
100 bp DNA-Leiter	
DNA Ligations Kit (Rapid Ligation Kit)	Roche Biochem.
DNA Aufreinigung im großen Maßstab (AX500 Nucleobond)	Macherey Nagel
E. coli - K12 Stamm: DH5α	
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	USA USB, Cleveland, OH, USA
Ethidiumbromid (EtBr)	Sigma, Deisenhofen
Hefe Extract	Becton, Dickinson
NucleoSpin Extract	Macherey Nagel
PCR Produkt Aufreinigungs Kit (PCR Clean-up)	
DNA Elution aus dem Gel	

NucleoSpin Plasmid DNA Aufreinigungs Kit

Macherey Nagel

PCR Kits

GC-rich PCR System

Roche Biochem.

PWO PCR System

Roche Biochem.

Restriktionsendonukleasen

Gibco, Invitrogen

RNase A

Sigma

T4-DNA-Ligase

Roche Biochem.

2.2.2.1 Vektoren

Eukaryotische Expressionsvektoren
 pcDNA3.1 Zeo+
 pcDNA6/V5 HisA

Invitrogen

2.2.2.2 DNA Konstrukte

Bezeichnung	Vektor	Klonierungsenzyme
PrP/3F4	pcDNA 3.1. Zeo (+)	EcoRI; XhoI
	pcDNA6/V5 HisA	HindIII; XhoI
Dpl	pcDNA 3.1. Zeo (+)	EcoRI; XhoI
PrP-CD4	pcDNA 3.1. Zeo (+)	HindIII; XhoI
PrP-M204S	pcDNA 3.1. Zeo (+)	HindIII; XhoI
PrPmtGPI	pcDNA 3.1. Zeo (+)	HindIII; XhoI
PrP Δ HD	pcDNA 3.1. Zeo (+)	HindIII; XhoI
PrP-AV3	pcDNA 3.1. Zeo (+)	HindIII; XhoI
PrP-N/Dpl	pcDNA 3.1. Zeo (+)	EcoRI; XhoI
PrP-HD/Dpl	pcDNA 3.1. Zeo (+)	EcoRI; XhoI

Tabelle 3: Zusammenstellung der verwendeten DNA-Konstrukte.

Angegeben ist die Bezeichnung des Konstruktes, des Zielvektors und der Restriktionsenzyme mittels derer die gewünschte DNA – Sequenz in den Vektor eingefügt wurde.

Das Ausgangskonstrukt PrP/3F4, das für verschiedene Umklonierungen und für die Herstellung der PrP/Dpl Chimäre verwendet wurde, sowie die Konstrukte PrP-CD4, PrP-M204S, PrPmtGPI, PrP Δ HD und PrP-AV3 wurden von Herrn PD Dr. J. Tatzelt zur Verfügung gestellt. Das Ausgangskonstrukt Dpl, das für Umklonierungen und für die Herstellung der PrP/Dpl Chimäre verwendet wurde, wurde von Herrn Prof. Dr. A. Aguzzi zur Verfügung gestellt.

2.2.2.3 Oligonukleotide

PCR-Primer: Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind umrandet.

GAATTC	<i>EcoRI</i>
AAGCTT	<i>HindIII</i>
CTCGAG	<i>XhoI</i>

Konstrukt	Oligonukleotide	cDNA
PrP/3F4	vw : 5'-AAACTT AAGCTT GGTACCGAGCTCGGATCCACT-3' vw : 5'-CCG GAATTC GTCATCATGGCGAACCTTGGCTA-3' rw : 5'-CCG CTCGAG CATCCCACGACAGGAAGATGAGG-3'	Das Ausgangskonstrukt für Umklonierungen und für die Herstellung der PrP/Dpl Chimäre wurde von Herrn PD Dr. J.Tatzelt zur Verfügung gestellt
Dpl	vw : 5'-AT GAATTC ACCGCCATGAAGAACCGGCTGGGT-3' rw : 5'-AT CTCGAG TTACTTCACAATGAACCAAACG-3'	Das Ausgangskonstrukt für Umklonierungen und für die Herstellung der PrP/Dpl Chimäre wurde von Herrn Prof. A. Aguzzi zur Verfügung gestellt
PrP-N/Dpl	vw : 5'-GGGCTGCGGCAGCTGGGGCAGTAGTGGGGGGCCTTG GTGGCTACATGCTGGGGAGCGCCATGAACCGCCCAG GAGCCTTC-3' rw : 5'-GATGAAGGCTCCTGGGCGGTTTCATGGCGCTCCCCAGC ATGTA-3'	PrP / Dpl
PrP-HD/Dpl	vw : 5'-GGGCTGCGGCAGCTGGGGCAGTAGTGGGGGGCCTTG GTGGCTACATGCTGGGGAGCGCCATGAACCGCCCAG GAGCCTTC-3' rw : 5'-ATGGCGCTCCCCAGCATGTAGCCACCAAGGCCCCCA CTACTGCCCCAGCTGCCGCAGCCCCCTCAGTACCCG AGCTTCGGT-3'	Dpl

Tabelle 4: PCR-Oligonukleotide und cDNA.

Aufgeführt sind die für die PCR-Ansätze der verschiedenen DNA-Konstrukte verwendeten Oligonukleotide und die entsprechende cDNA. Die Darstellung zeigt jeweils die Synthese des DNA-Stranges vom 5'- zum 3'-Ende (vw) und vom 3'- zum 5'-Ende (rw). Die DNA-Sequenzen der Oligonukleotide sind vom 5'- zum 3'-Ende angegeben.

Die Synthese der *Primer* wurde von der Firma Invitrogen durchgeführt.

2.2.3 Zellkultur

Antibiotika

Penicillin/Streptomycin (5000 U/ml / 5 mg/ml)

Gibco, Invitrogen

BlasticidinTM (5mg/ml)

Gibco, Invitrogen

ZeocinTM (100 mg/ml)

Gibco, Invitrogen

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Merck, Karlsruhe

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

Invitrogen, Karlsruhe

(mit Glucose, L-Glutamin, ohne Na-Pyruvate)

FKS

PAA

L-Glutamin (100x, 200mM)

Invitrogen, Karlsruhe

Lipofectamine Reagent

Invitrogen, Karlsruhe

MDCK strain II (*Madin-Darby canine kidney*) Zellen

ATTC

MEM (Methionin frei, mit L-Glutamin)

Invitrogen, Karlsruhe

Minimal Essential Medium (MEM)

Invitrogen, Karlsruhe

N2a (murine Neuroblastomzellen)

ATCC-Nr. CCI 131

n-Buttersäure (Na-Salz)

Sigma

Optimem1 (mit Glutamax-I)

Invitrogen, Karlsruhe

Plus Reagenz

Invitrogen, Karlsruhe

Poly-L-Lysin (MW 111000)

Sigma

Trypsin-EDTA (in HBSS)

Invitrogen, Karlsruhe

Transfektionsreagenz FuGENETM

Roche Biochem.

Trypan Blue

Invitrogen, Karlsruhe

2.2.3.1 Transfizierte MDCK-Zelllinien

Name	Zelllinie	überexprimierte Proteine	Resistenz
PrP/3F4	MDCK	PrP/3F4	Zeocin
Dpl	MDCK	Dpl	Zeocin
CD4	MDCK	PrP-CD4	Zeocin
M204S	MDCK	PrP-M204S	Zeocin
mtGPI	MDCK	PrPmtGPI	Zeocin
AV3	MDCK	PrP-AV3	Zeocin
Δ HD	MDCK	PrP- Δ HD	Zeocin
N/Dpl	MDCK	PrP-N/Dpl	Zeocin
HD/Dpl	MDCK	PrP-HD/Dpl	Zeocin
PrP/Dpl	MDCK/Dpl	Dpl PrP/3F4	Zeocin Blasticidin

Tabelle 5: Bezeichnung und exogene Proteinexpression der benutzten Zelllinien.

Aufgeführt sind alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten, genetisch veränderten Zelllinien. Angegeben ist der Name der jeweiligen Ursprungszelllinie, alle exogen exprimierten Proteine und die entsprechenden Resistenzen zur Selektion der stabil exprimierenden Einzelzellklone.

2.2.4 Proteinbiochemie und Immunocytochemie

APS	USB, Cleveland, OH, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Desoxycholat (DOC)	Sigma, Deisenhofen
ECL-Plus Western Blotting Kit	Amersham Biosciences
ECL Western Blotting Kit	Amersham Biosciences
Endoglykosidase H	Roche Biochem.
EZ-Link TM -Sulfo-NHS-LC-Biotin	KMF-Laborchemie
Instant-Magermilchpulver	Uelzena, Uelzen
Molekulargewichtsmarker	
See Blue Plus2	Invitrogen, Karlsruhe
Pre-Stained Protein Standard	

N-Glycosidase F	Roche Biochem.
Ni-NTA-Agarose	Qiagen
N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck
Phosphatidylinositol Phospholipase C	Roche Diagnostics, Mannheim
Polyacrylamid/Bisacrylamid (29:1) 40 %	Roth, Karlsruhe
Protease Inhibitor Cocktail (PI-Mix) <i>(for Mammalian Cell Extracts)</i>	Sigma
Protein A Sepharose CL-4B (PAS)	Sigma
Protein Assay (nach Bradford)	Bio-Rad
Rinderserum Albumin (BSA, Fraktion V)	Sigma
Sarkosyl	USB, Cleveland, OH, USA
Trichloressigsäure (TCA)	USB, Cleveland, OH, USA

2.2.5 Antikörper

Alle im Folgenden beschriebenen monoklonalen Antikörper sind ausnahmslos Maus IgG-Antikörper, während es sich bei den polyklonalen Antikörpern um Kaninchen IgG-Antikörper handelt.

AK	Zielprotein	Wirt	IP	WB	IF	Bezugsquelle
3F4	PrP (AS 108/111)	Maus	1:200	1:3500	1:200	Signet Laboratories, Dedham, MA, USA
2234	Doppel	Kaninchen	1:400	1:5000	1:400	Prof. Dr. Adriano Aguzzi (Rossi et al. 2001)
5313	β APP ₆₉₅ (AS 444-592)	Kaninchen	1:300	---	---	(Steiner et al. 1999)
22C11	β APPs α	Maus	---	1:5000	---	Chemicon International

Tabelle 6: Übersicht der Primär-Antikörper.

Angegeben ist die Bezeichnung des Antikörpers (AK), des zur Immunisierung eingesetzten Antigens und die benutzten Verdünnungen in der Immunopräzipitation (IP), im Western Blot (WB) und in der Immunofluoreszenz (IF). Wurde der AK bereits in anderen Arbeiten eingesetzt ist das entsprechende Zitat angegeben. Bei kommerziell erworbenen oder von anderen Arbeitsgruppen freundlicherweise zur Verfügung gestellten AK ist die Bezugsquelle angegeben.

AK	Antigen	Wirt	Applikation	Verdünnung	Firma
anti-Kaninchen- HRP	Kaninchen IgG	Ziege	WB	1:5000	Promega
anti-Maus-HRP	Maus IgG	Ziege	WB	1:5000	Promega

Tabelle 7: Übersicht der Sekundär-Antikörper.

Angegeben sind die Bezeichnungen der AK, die Antigene, gegen die die Ak gerichtet sind, die Spezies in denen die AK generiert wurden, die Applikationen und die eingesetzten Verdünnungen der AK sowie die Bezugsquellen.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

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

2.3.1.1 Standard-PCR

Reaktionsansatz

In einem 0,2 ml PCR-Tube wurde folgendes Reaktionsgemisch hergestellt und in der PCR-Maschine prozessiert:

	Volumen [μ l]	Endkonzentration
Matrizen - DNA	1	ca. 2 ng/ μ l
Pwo – Puffer (10x, Peq Lab)	5	1 x
dNTP - Mix (25mM, Roche)	0,5	je 0,25 mM
Primer I (15 pM)	1	0,3 pM
Primer II (15 pM)	1	0,3 pM
Pwo – Polymerase (1U/ μ l, Peq Lab)	3	0,06 U/ μ l
H ₂ O	38,5	

2.3.1.2 Rekombinante PCR

Zur Einführung von Punktmutationen, Deletionen und Fusionierung von verschiedenen Sequenzen wurde die rekombinante Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt.

Hierbei werden in zwei getrennten Ansätzen (PCR1, PCR2, vgl. Abbildung 15 (A)) *Primer* verwendet, die Punktmutation oder andere Modifikationen enthalten. Die amplifizierten DNA-Fragmente dienen in einer zweiten Reaktion (PCR 3, vgl. Abbildung 15 (B)) als Matrize, wobei die hybridisierenden Sequenzhomologien als innere *Primer* fungieren und beide Stränge der DNA vervollständigt werden. Die externen *Primer* sorgen für die Amplifikation des Produktes.

Durchführung

PCR 1 und PCR 2 sind Standard-PCRs (vgl. 2.3.1.1).

PCR 3:

In einem 0,2 ml PCR-Tube wurde folgendes Reaktionsgemisch hergestellt und in der PCR-Maschine prozessiert:

	Volumen [μ l]	Endkonzentration
PCR 1-Produkt	1	ca. 2 ng/ μ l
PCR 2-Produkt	1	ca. 2 ng/ μ l
Pwo-Puffer (10x)	5	1 x
dNTP - Mix (25mM)	0,5	je 0,25 mM
Primer I (15 pM)	1	0,3 pM
Primer II (15 pM)	1	0,3 pM
Pwo – Polymerase (1U/ μ l)	3	0,06 U/ μ l
H ₂ O	37,5	

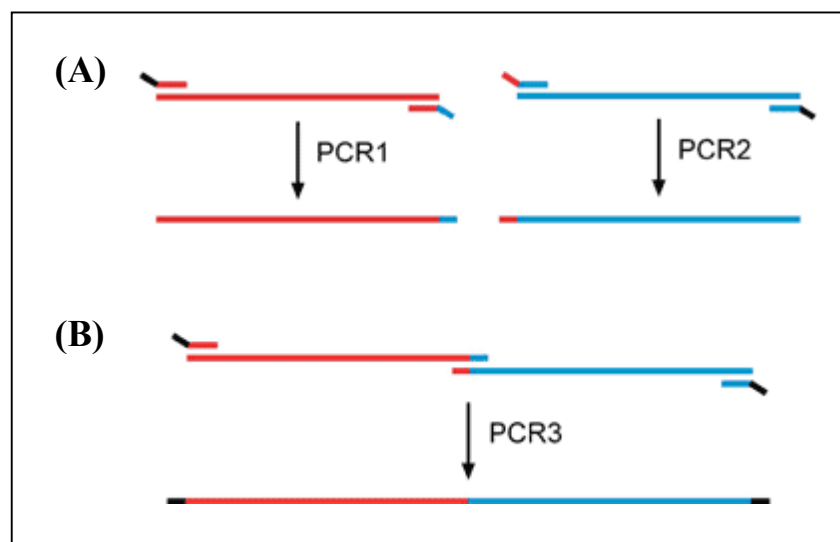


Abbildung 15: Klonierungsstrategie zur Verknüpfung zweier Genfragmente.

(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: nicht homologe Sequenzen für Restriktionsschnittstellen.

2.3.1.3 PCR – Bedingungen

Die entsprechenden Reaktionsansätze wurden gemischt und in der PCR-Maschine mit folgendem Programm prozessiert:

Denaturierung	94°C, 3 Minuten
10 Zyklen:	
Denaturierung	94°C, 45 Sekunden
Annealing	54°C, 1 Minute
Elongation	72°C, 2 Minuten
20 Zyklen:	
Denaturierung	94°C, 45 Sekunden
Annealing	50°C, 1 Minute
Elongation	72°C, 2 Minuten
Verlängerte Elongation	72°C, 5 Minuten

Die Produkte der jeweiligen PCR wurden in 1% (w/v) Agarosegelen aufgetrennt (vgl. 2.3.2.1), die amplifizierte DNA Fragmente aus dem Gel eluiert und anschließend mit den entsprechenden Restriktionsenzymen nachgeschnitten (vgl. 2.3.3.1). Die so erhaltenen DNA Fragmente wurden in den Expressionsvektor subkloniert (vgl. 2.3.3.3).

2.3.2 Reinigung und Analyse der DNA

2.3.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

TBE-Puffer (Stocklösung 10-fach):

9 mM Tris-borat und 2 mM EDTA in dH₂O, pH 8,0

DNA-Ladepuffer (Stocklösung 6-fach):

30 % (v/v) Glycerin, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF in dH₂O

Ethidiumbromid (Stocklösung 50000-fach):

10 mg/ml in dH₂O

Zur elektrophoretischen Trennung und Analyse von linearisierten DNA-Fragmenten, superhelikaler Plasmid-DNA sowie zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten wurden 0,8-2 % (w/v) Agarosegele eingesetzt. Die entsprechende Menge Agarose wurde in der Mikrowelle in TBE-Puffer gelöst, nach Abkühlung wurde Ethidiumbromid zu einer

Endkonzentration von 0,2 µg/ml zur Agarosegellösung gegeben. Nach Mischung wurde die Gellösung in die Gelkammer gegossen, und der gewünschte Probentaschenkamm wurde eingesetzt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/6 Volumen 6-fach DNA-Ladepuffer versetzt. Als Größenstandard diente eine 1 kb DNA Leiter. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung 80-120 V (je nach Größe des Gels) mit TBE-Puffer in einer Agarose-Gelkammer durchgeführt.

2.3.2.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die gewünschte DNA-Bande wurde unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des „*Nucleo Spin Extract Kit*“ nach Vorschrift des Herstellers aufgereinigt.

2.3.2.3 Reinigung von DNA-Fragmenten

Nach enzymatischen DNA-Modifikationen wurde der Reaktionsansatz ohne Auftrennung im Agarosegel mit dem „*Nucleo Spin Extract Kit*“ entsprechend der Vorschrift des Herstellers aufgereinigt.

2.3.3 Enzymatische Modifikation der DNA

2.3.3.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Verwendete Enzyme:

Eco RI (MBI Fermentas): 10 U/µl

Xho I (MBI Fermentas): 10 U/µl

Hind III (MBI Fermentas): 10 U/µl

Für analytische Ansätze nach Plasmidpräparationen wurden 1-2 µg Plasmid-DNA in dem vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer mit 10 U der entsprechenden Restriktionsenzyme (vgl. 2.2.2.1) in einem Endvolumen von 20 µl für 3-4 h bei 37 °C inkubiert. Die Analyse der Restriktion erfolgte mittels Agarosegeltrennung (vgl. 2.3.2.1).

Für präparative Ansätze im Rahmen der Klonierung wurden 10 - 15 µg Plasmid-DNA oder 5 - 10 µg des entsprechenden PCR-Produktes in dem vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer mit 10 U der entsprechenden Restriktionsenzyme (vgl. 2.2.2.1) in einem Endvolumen von 30 µl für 6 - 8 h bei 37 °C inkubiert. Die DNA-Fragmente wurden

anschließend unter Verwendung des *Nucleo Spin Extract Kit* (Macherey-Nagel) gereinigt (vgl. 2.3.2.2).

2.3.3.2 Dephosphorylierung von DNA

Vor einer Ligation (vgl. 2.3.3.3) wurden die 5'-Phosphatgruppen der linearisierten Plasmidmoleküle (vgl. 2.3.3.1) mit Shrimp alkalischer Phosphatase (SAP; 1 U/ μ l, Roche) entfernt, um eine intramolekulare Selbstligation zu verhindern (Sambrook and Russel, 2001). Dazu wurden 10 - 15 μ g linearisierte Plasmid-DNA mit 1 U SAP und Reaktionspuffer des Herstellers in einem Gesamtvolumen von 200 μ l über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde anschließend unter Verwendung des *Nucleo Spin Extract Kit* (Macherey-Nagel) gereinigt (vgl. 2.3.2.3).

2.3.3.3 Ligation von DNA

Die Insertion des mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdauten DNA-Fragments in den zuvor linearisierten und dephosphorylierten Plasmid Vektor erfolgte mit Hilfe der DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 (T4 Ligase; 5 U/ μ l). 200 - 300 ng Plasmid, 0,5 - 1 μ g des entsprechenden DNA-Fragmentes, 5 U T4 Ligase und Ligationspuffer des Herstellers wurden in einem Endvolumen von 20 μ l 1 h bei RT inkubiert. Zur Kontrolle der Religationsfähigkeit des Vektors wurde dieser parallel ohne Insert sowie mit und ohne Ligase inkubiert. 10 – 15 μ l des Ligationsansatzes wurden zur Transformation in kompetente *E. coli* verwendet (vgl. 2.3.4.2).

2.3.4 Transformation von *E. coli* und Plasmidpräparation

2.3.4.1 *E. coli*-Kulturen

LB-Medium (*Low Salt Luria-Bertani Medium*):

1 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % Hefe-Extrakt und 0,5 % (w/v) NaCl in dH₂O.
pH 7,0 mit NaOH einstellen und bei 120 °C und 1,2 bar für 20 min autoklavieren. Ggf. nach dem Abkühlen die entsprechenden Selektionsantibiotika zusetzen.

LB-Agar-Platten (1,5% (w/v)):

15 g/l Bacto-Agar in LB-Medium, autoklaviert (120°C; 1,2 bar; 20min). Nach Abkühlung auf ca. 50°C wurden die entsprechenden Selektionsantibiotika (Ampicillin 100 μ g/ml) zugesetzt und Platten (sterile Bakterienschalen, 10cm Durchmesser) gegossen.

Ampicillin (Stocklösung 1000-fach):

100mg/ml in dH₂O, steril filtriert. Aliquote wurden bei -20°C gelagert.

E. coli Bakterien wurden, soweit nicht anders angegeben, über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator mit 200UpM im gewünschten Volumen LB-Medium kultiviert.

Zur Separierung von Einzelklonen wurden Kulturen auf LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Ampicillin wurde bei Bedarf als Selektionsantibiotika zugesetzt.

2.3.4.2 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

CaCl₂-Puffer:

50 mM CaCl₂, 10 mM Tris pH 8,0 in dH₂O

Um Zellen von *E. 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 (Normington et al., 1989). Eine DH5 α -Übernachtskultur einer einzelnen Kolonie wurde in 100 ml LB-Medium verdünnt und im Schüttelinkubator bei 200 UpM / 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (3500 g, 10min, 4 °C) und in 1/2 Ausgangs-Kulturvolumen, eiskaltem CaCl₂-Puffer resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut, wie oben beschrieben, pelletiert und in 1/20 Kulturvolumen eiskaltem CaCl₂-Puffer resuspendiert. Die so hergestellten kompetenten Zellen wurden entweder direkt für die Transformation verwendet oder in 20% Glycerol/CaCl₂-Puffer resuspendiert, aliquotiert und bei -80 °C konserviert.

2.3.4.3 Transformation von DNA-Konstrukten in kompetente *E.coli*

100 μ l kompetente *E.coli* (vgl. 2.3.4.2) wurden auf Eis aufgetaut und mit 10 - 15 μ l Ligationsansatz bzw. Kontrollansätzen (vgl. 2.3.3.3) oder 0,2 μ g Plasmid DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Um eine Aufnahme der DNA in die Zelle zu ermöglichen, wurden die Zellen für 2 min bei 42 °C (Hitzeschock) und weitere 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz bei RT mit 1 ml LB- Medium versetzt und 1 h bei 37 °C / 700 UpM auf einem Thermoschüttler inkubiert. Die Zellen wurden in der Tischzentrifuge 1 min bei 16000 g pelletiert, in 200 μ l LB-Medium resuspendiert und auf LB-Agar-Platten mit 100 μ g/ml Ampicillin (Roth) ausplattiert. Nach 16 - 24 h Inkubation bei 37 °C wurden Klone von der Ligations-Platte gepickt und auf Einbau des gewünschten DNA-Fragments untersucht (vgl. 2.3.4.4).

2.3.4.4 Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab (Mini-Präp)

Lösung 1:

50 mM D-Glucose, 25 mM Tris pH 8,0 und 10 mM EDTA pH 8,0 in dH₂O

Lösung 2:

0,2 M NaOH und 1 % SDS in dH₂O

Lösung 3:

3 M Kaliumacetat in dH₂O; pH mit Eisessig auf 5,1 einstellen

RNase (DNase-frei):

10 mg/ml RibonukleaseA (RNase; Sigma) in einem Puffer aus 10 mM Tris pH 7,5 und 10 mM NaCl in dH₂O lösen. Lösung 15 min bei 100 °C erwärmen und langsam auf RT abkühlen lassen. Aliquotieren und bei -20 °C aufbewahren.

Zur Identifizierung rekombinanter E. coli Klone (vgl. 2.3.4.3) wurden kleine Mengen Plasmid-DNA nach einer veränderten Version der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979) isoliert. 1 ml einer 3 ml E. coli Übernachtskultur wurde in der Tischzentrifuge 1 min bei 16000 g sedimentiert und der Überstand dekantiert. Das Sediment wurde in 100 µl Lösung 1 durch Vortexen resuspendiert und mit 200 µl frisch zubereiteter Lösung 2 versetzt. Nach ca. 5 min Inkubation auf Eis wurde das Gemisch mit 150 µl eiskalter Lösung 3 neutralisiert und weitere 5 min auf Eis inkubiert. Die unlöslichen Bestandteile (chromosomale DNA und Zellbruchstücke) wurden durch Zentrifugation (16000 g / 15 min/ 4 °C) abgetrennt, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA mit 1 ml eiskaltem Ethanol (100 %) aus dem Überstand gefällt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde die Plasmid-DNA ebenfalls durch Zentrifugation abgetrennt (16000 g/ 15 min/ 4 °C) und das erhaltene Sediment mit 500 µl eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen. Der Überstand wurde dekantiert und das DNA-Pellet bei 37 °C bis zur Ethanolfreiheit getrocknet. Das trockene DNA-Pellet wurde anschließend in 18 µl dH₂O resuspendiert, mit 2 µl RNase-Lösung versetzt und 15 min bei 37 °C inkubiert. 5µl der so erhaltenen Plasmid-DNA wurden zur Kontrolle der DNA-Fragment-Integration im analytischen Maßstab mit Restriktionsendonukleasen verdaut (vgl. 2.3.3.1). Alternativ wurden DNA Mini-Präparationen mit dem Nucleo Spin Plasmid DNA-Reinigungs Kit entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die so aufgereinigte DNA konnte direkt zur Sequenzierung und Transfektion eingesetzt werden.

2.3.4.5 Präparation von Plasmid-DNA in großem Maßstab (Maxi-Präp)

200 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum wurde mit der Vorkultur des gewünschten E. coli Klons angeimpft und über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C / 800 UpM inkubiert. Die Bakterien in der Übernachtskultur wurden abzentrifugiert (6500 g / 15min / 4°C). Die Lyse des Pellets und die Gewinnung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des Nucleobond AX 500 Kits (Macherey-Nagel) nach den Anweisungen des Herstellers. Die von der Säule eluierte Plasmid-DNA wurde mit 0,7 Volumenanteilen Isopropanol gefällt, durch Zentrifugation (10000 g, 45 min, 4°C) pelletiert und nach einem Waschschrift mit 70% Ethanol in 200µl dH₂O aufgenommen. Die Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Zur Überprüfung der DNA auf Fragmenteinbau wurde 1µg DNA im analytischen Maßstab mit geeigneten Restriktionsendonukleasen verdaut (vgl. 2.3.3.1) und im Agarosegel aufgetrennt (vgl. 2.3.2.1).

2.3.4.6 Sequenzierung der DNA-Konstrukte

Alle hergestellten DNA-Konstrukte wurden zur Verifizierung sequenziert. Die Sequenzierung der DNA wurde von der Firma GATC Biotech AG (Konstanz) bzw. MediGenomix, Martinsried durchgeführt.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Kultivierung und Verdünnung muriner Neuroblastomzellen

PBS-Puffer (steril; PBS^{-/-}):

140 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄ und 1,75 mM KH₂PO₄, pH 7,4 mit HCl eingestellt in H₂O. Die fertige Lösung wurde bei 120°C und 1,2 bar für 20 min autoklaviert.

Trypsin-EDTA-Lösung:

0,05 % Trypsin, 0,53 mM EDTA*4Na in Hanks' B.S.S (Gibco Invitrogen Corporation)

Kulturmedium:

10 % fötales Kälberserum (FKS), 1% Antibiotika-Lösung (Endkonzentration: 1U/ml Penicillin G, 1µg/ml Streptomycin), 2 mM Glutamin in MEM

Die Kultivierung der adhärent wachsenden N2a-Zellen erfolgte in Zellkulturschalen bzw. – flaschen bei 37°C, 5% CO₂ und Feuchtigkeitssättigung im CO₂-Inkubator. Alle fünf Tage wurden die Zellen wie folgt passagiert: Nach Abziehen des Kulturmediums wurden die Zellen mit 5 ml PBS^{-/-} gewaschen und anschließend mit 0,5 ml Trypsin-EDTA-Lösung einige Minuten lang inkubiert. Die Zellen wurden leicht von ihrer Unterlage abgeklopft, in 8 ml vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert und 1:8 bzw. 1:16 wieder ausgesät.

2.4.1.1 Ausplattieren

Ein Aliquot der mit Trypsin gelösten und resuspendierten Zellen (siehe 2.4.1) wurde mit dem gleichen Volumen Trypanblau vermischt und in einer Neubauer-Kammer gezählt.

Die in vier Quadraten ausgezählte und gemittelte Zellzahl wurde mit 1×10^4 pro ml multipliziert und in einer Dichte von 1×10^6 Zellen in 2 ml Kulturmedium auf 3,5 cm Schalen ausplattiert.

2.4.1.2 Transiente Transfektion

24 Stunden nach dem Ausplattieren der Zellen wurden diese 2 x mit MEM gewaschen und mit 1 µg Plasmid-DNA mit dem Transfektions-Kit Lipofectamine plus nach Angaben des Herstellers Invitrogen transfiziert. Nach 3 Stunden Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde 1ml Vollmedium zugesetzt.

2.4.1.3 Ernte

24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet. Hierzu wurden die Zellen 2 x mit je 2 ml PBS^{-/-} (vgl. 2.4.1) gewaschen und mit Hilfe eines Zellschabers abgeschabt. Die Zellen wurden für 20 Sekunden bei 13000 rpm abzentrifugiert, das Zellpellet auf Eis gestellt und entsprechend weiterverarbeitet.

2.4.2 Kultivierung und Verdünnung von MDCK-Zellen

PBS-Puffer (steril; PBS^{-/-}):

vgl. 2.4.1

Trypsin-EDTA-Lösung:

vgl. 2.4.1

Kulturmedium (Grundmedium):

10 % FKS, 1% Antibiotika-Lösung (Endkonzentration: 1U/ml Penicillin G, 1µg/ml Streptomycin), 2 mM Glutamin in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) High Glucose

Die Kultivierung der adherent wachsenden MDCK-Zellen erfolgte nach Standardprotokollen (Kruse and Patterson, 1973) bei 37°C, 5 % CO₂ und Feuchtigkeitssättigung im CO₂-Inkubator. Bei Konfluenz wurden die Zellen mit sterilem PBS^{-/-}-Puffer gewaschen, mit Trypsin-EDTA Lösung versehen und bei 37°C inkubiert, bis alle Zellen abgelöst waren. Für eine Petrischale mit einem Durchmesser von 10 cm wurden 2 ml Trypsin-EDTA Lösung eingesetzt. Die abgelösten Zellen wurden sofort in 2 ml Kulturmedium aufgenommen, um den Trypsinierungsvorgang zu stoppen, und in sterile 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Durch Zentrifugation (400g, 5 min, RT) wurden die Zellen pelletiert, im Kulturmedium resuspendiert und in einer Verdünnung von 1:4 bis 1:10 wieder ausgesät. Die Verdopplungsrate beträgt ca. 24-36 Stunden.

2.4.2.1 Anlegen von Dauerkulturen (Kryokonservierung)

Einfriermedium:

90 % FKS, 10 % DMSO

PBS-Puffer (steril; PBS^{-/-}):

vgl. 2.4.1

Trypsin-EDTA Lösung:

vgl. 2.4.1

Zum Anlegen von Dauerkulturen wurden konfluent gewachsene Zellen einer 10 cm Schale, wie unter 2.4.2 beschrieben, pelletiert. Das Zellsediment wurde in 1 ml frischem Einfriermedium (4°C) resuspendiert und anschließend in ein Kryoröhrchen überführt. Die Kulturen wurden in Einfriergefäßen, die eine langsame, definierte Abkühlung

gewährleisten, bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und nach ca. 1 Woche zur Dauerlagerung in Boxen überführt.

2.4.2.2 Transfektion der MDCK-Zellen mit rekombinanter DNA

Selektionsmedium:

Die gewünschten Selektionsantibiotika wurden in der angegebenen Konzentration zu dem Grundmedium hinzugegeben: ZeocinTM Stocklösung (100mg/ml), Endkonzentration 200 $\mu\text{g/ml}$; BlastidicinTM Stocklösung (5mg/ml), Endkonzentration 2,5 $\mu\text{g/ml}$

Die entsprechenden Zellen wurden in einer 10 cm Schale bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % kultiviert und mittels FuGENETM gemäß den Anweisungen des Herstellers mit der gewünschten Plasmid-DNA transfiziert. Da MDCK-Zellen sehr schlecht zu transfizieren sind, konnten transiente Transfektionen nicht durchgeführt werden. Um stabile Einzelzellklone zu erhalten, wurden die Zellen 24 h nach Transfektion in verschiedenen Verdünnungen in das entsprechende Selektionsmedium umgesetzt. Je nach Antibiotikum benötigte eine vollständige Selektion 3-4 Wochen. Stabile Klone wurden mit Trypsin-EDTA Lösung (vgl. 2.4.1) unter Verwendung steriler Klonierungszyylinder abgelöst und in 24 well Platten transferiert und die Zellen anschließend weiter vermehrt. Um 2-3 stabil exogen exprimierende Einzelzellklone mit unterschiedlicher Expressionsstärke zu erhalten, mussten ca. 30 Einzelzellklone isoliert werden.

2.4.2.3 Wachstum in Filterkammern

Medium für auf Filtern wachsende MDCK-Zellen:

20 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin in DMEM (mit Glucose, L-Glutamin, ohne Na-Pyruvat)

Medium mit Na-Butyrat:

10 mM Na-Butyrat (Stocklösung (100-fach): 1 M Na-Butyrat (in sterilem dH_2O) in Grundmedium

MDCK-Zellen wurden zur Ausbildung eines polarisierten „Monolayers“ auf TranswellTM-Filter ausgesät und 5-6 Tage bei täglichem Mediumwechsel kultiviert. Die FKS Konzentration des Grundmediums wurde auf 20 % erhöht. Für biochemische Experimente wurden Filter mit einem Durchmesser von 24 mm eingesetzt, das apikale Medienvolumen betrug 1,5 ml, das basolaterale 2,6 ml. Es wurden ca. $2,5 \times 10^6$ Zellen auf einen 24 mm Filter ausgesät.

Zur Erhöhung der Expression von exogen exprimiertem PrP-AV3 wurden die Einzelzellklone über Nacht, d.h. 15-18 Stunden, mit 10 mM Na-Butyrat behandelt (Gottlieb et al., 1986).

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Herstellung von Gesamtproteinlysaten und Nachweis der Löslichkeit

PBS-Puffer (PBS^{-/-}):

vgl. 2.4.1

Detergenzpuffer, ionisch:

0,5% Triton X-100, 0,5% DOC, PI-Mix 1:200 in PBS-Puffer

80-90 % konfluent kultivierte Zellen wurden auf Eis 2 x mit 500 µl kaltem PBS^{-/-}-Puffer gewaschen und anschließend in 1 ml PBS^{-/-}-Puffer abgeschabt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10000 g / 20 Sekunden / RT) pelletiert und der PBS-Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 180 µl Detergenzpuffer resuspendiert, 5 min auf Eis inkubiert und der unlösliche Rückstand durch Zentrifugation (10000 g / 20 min / 4°C) abgetrennt. Sowohl der Überstand als auch das Pellet wurden in Laemmli-Probenpuffer (vgl. 2.5.3.1) 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 (vgl. 2.5.3.1).

2.5.2 Proteinbestimmung

BSA-Standard Lösung:

2 mg / ml BSA

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Gesamtproteinlysaten erfolgte mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assay Kit und basiert auf der Methode nach Bradford (Bradford 1976).

1 µl der zu messenden Probe wurden in einer 1 cm Plastikkuvette vorgelegt, mit 1 ml der 1:5 verdünnten Bio-Rad Protein Assay Reagenzlösung versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm fotometrisch ermittelt. Parallel wurde eine Eichkurve mit 2-10 µg BSA angesetzt. Alle Proben und die BSA-Standards wurden als 3-fache Bestimmung angesetzt. Die Funktion der Eichkurve wurde durch lineare Regression ermittelt und aus dieser die Proteinkonzentration der Proben berechnet.

2.5.3 Nachweis von Proteinen

2.5.3.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page)

Proteine wurden durch eindimensionale, diskontinuierliche SDS-PAGE aufgetrennt (Laemmli 1970). Je nach der Größe des zu untersuchenden Proteins wurde eine Polyacrylamid-Konzentration von 8% oder 12% für das Trenngel und 4% für das Sammelgel verwendet. Die Elektrophorese wurde mit 150-250 V in einer Hoefer-SE600-Kammer durchgeführt.

Trenngelpuffer („Lower Tris“):

1,5 M Tris und 0,4 % (w/v) SDS in dH₂O; pH 8,8 mit HCl eingestellt

Sammelgelpuffer („Upper Tris“):

0,5 M Tris und 0,4 % (w/v) SDS in dH₂O; pH 6,8 mit HCl eingestellt

Acrylamid – Lösung:

40 % Acrylamid – BIS – Acrylamid 29:1 in dH₂O

APS:

10 % (w/v) Ammonium Persulfat in dH₂O

TEMED:

N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (Merck)

Laemmli-Probenpuffer (2x):

120 mM Tris pH 6,8; 2 % (w/v) SDS; 20 % (v/v) Glycerol; 0,5 % (w/v) Bromphenolblau, 2 % (v/v) Mercaptoethanol

Laemmli-Probenpuffer (4x):

240 mM Tris pH 6,8; 4 % (w/v) SDS; 40 % (v/v) Glycerol; 1 % (w/v) Bromphenolblau; 4 % (v/v) Mercaptoethanol

Elektrophoresepuffer:

25 mM Tris; 0,2 M Glycin und 0,1 % SDS in dH₂O

Zusammensetzung je 1 Gel (1,5 mm; 10ml)

	Trenngel (8 %)	Trenngel (12 %)		Sammelgel (4 %)
dH₂O	5,4 ml	6,6 ml	dH₂O	6,4 ml
Acrylamid-Lösung	2 ml	4,5 ml	Acrylamid-Lösung	1 ml
Trenngelpuffer	2,5 ml	3,75 ml	Sammelgelpuffer	2,5 ml
TEMED	10 µl	15 µl	TEMED	10 µl
APS	100 µl	150 µl	APS	100 µl

Die Prozentigkeit der verwendeten Gele ist für das jeweilige Experiment im Ergebnisteil angegeben.

Vor Verwendung wurden die Glasplatten und Spacer mit Ethanol von Rückständen befreit, das Trenngel bis zu einer Höhe von ca. 3 cm unterhalb des oberen Randes gegossen und mit Butanol überschichtet. Nach Polymerisation wurde das Butanol abgegossen, das Gel mit Wasser gespült und dieser Raum mit saugfähigem Papier getrocknet. Das Sammelgel wurde dann bis zum oberen Glasrand gegossen und der Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Nach dem vollständigen Aushärten des Sammelgels wurde der Kamm vorsichtig entfernt und die Geltaschen wurden mit Laufpuffer gespült. Die Proteinproben wurden in maximal 50 µl 4 x Laemmli-Probenpuffer, das Pellet in 200 µl 2 x Laemmli-Probenpuffer resuspendiert. Beide Proben wurden 5 min lang bei 100°C aufgekocht, anschließend 4 min bei 13000 UpM zentrifugiert und in die Taschen des Gels eingebracht. Nach Einbau in die Elektrophorese-Apparatur wurde das Pufferreservoir mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Eventuell an der Gelunterseite vorhandene Luftblasen wurden mit einem Zellschaber entfernt. Als Molekulargewichtsstandard wurden 6 µl See Blue Plus 2 geladen. Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei 150 V und nach Eintritt der Proteine in das Trenngel bei 220 V.

2.5.3.2 Western Blot Analyse

Transferpuffer:

20 mM Tris-Base, 150 mM Glycin, 0,01 % (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol

PBST-Puffer:

1 % (v/v) Tween 20 in PBS^{-/-} (vgl. 2.4.1)

Blockierungspuffer:

5 % (w/v) Magermilchpulver in PBST-Puffer

Nach Auftrennung der Proteine mittels Gelelektrophorese wurden die Proteine in einer Transferkammer auf eine Nitrocellulose-Membran mit der Porengröße 0,45 µm übertragen.

Transferaufbau:

- Anodenplatte
- Poröser Schwamm in Transfer-Puffer äquilibriert
- Whatman-Papier in Transfer-Puffer äquilibriert
- Nitrocellulose-Membran
- SDS-Polyacrylamid-Gel
- Whatman-Papier in Transfer-Puffer äquilibriert
- Poröser Schwamm in Transfer-Puffer äquilibriert
- Kathodenplatte

Der Transfer erfolgte 2 h lang bei konstantem Stromfluß von 1 A bei 4°C.

Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen 30 min bei RT in Blockierungspuffer geschüttelt. Die so vorbehandelte Membran wurde nach kurzem Waschen mit PBST 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C mit primären AK (vgl. 2.2.5), verdünnt in PBST, in einer Rollerflasche inkubiert. Überschüssiger oder unspezifisch gebundener AK wurde durch 3 x 10 min Waschen der Membran mit PBST entfernt. Der entsprechende HRP-gekoppelte sekundäre AK (vgl. 2.2.5) wurde ebenfalls in PBST verdünnt und 45 min bei RT mit der Membran inkubiert. Ungebundener Zweitantikörper wurde durch 3 x 10-minütiges Waschen in PBST entfernt. Die Detektion der mit den AK gekoppelten Proteine erfolgte mit Hilfe der ECL (*enhanced chemoluminescence*) Technik nach Angaben des Herstellers. Zum Nachweis schwacher Signale wurde der sensitive ECL plus Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences) verwendet. Die Chemilumineszenzsignale wurden mit Kodak-X-Omat DS Röntgenfilmen detektiert.

2.5.3.3 „Strippen“ von Western Blot Membranen

„Stripping“-Puffer:

5 ml 20 % (w/v) SDS in PBST (vgl. 2.5.3.2)

Um eine Membran nacheinander mit verschiedenen Antikörpern analysieren zu können, wurden die nicht denaturierten Proteine nach dem ersten Proteinnachweis durch 30 min Inkubation der Membran in „Stripping“-Puffer entfernt. Anschließend wurde die Membran 2 x mal je 15 min in PBST-Puffer gewaschen und erneut zum immunchemischen Nachweis der Proteine (vgl. 2.5.3.2) verwendet.

2.5.3.4 TCA Fällung

50 % Trichloressigsäure (TCA)

Aceton

Die Proben wurden mit 1/10 Volumen 50 % TCA-Lösung 10 Minuten auf Eis gefällt und anschließend zentrifugiert (10 min / 13000 UpM / 4°C). Das Pellet wurde 2 x mit Aceton gewaschen, an der Luft getrocknet und in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen.

2.5.3.5 Immunopräzipitation

Protein-A-Sepharose Suspension (PAS):

100 mg/ml Protein A gebunden an Sepharose CL-4B und 2 mg/ml BSA in dH₂O

Laemmli-Probenpuffer (2 x):

vgl. 2.5.3.1

IP-Waschpuffer:

0,5% Triton X-100, 0,5% DOC, 0,5 % Sarkosyl, PI-Mix 1:200 in PBS^{-/-}

Gesamtproteinlysate (vgl. 2.5.1) wurden nach der Abzentrifugation unlöslicher Bestandteile zur Vorreinigung mit 25 µl Protein-A Sepharose (PAS) versetzt und 30 min bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Die PAS und unspezifisch gebundene Bestandteile wurden durch Zentrifugation abgetrennt (4000 g / 20 min / 4°C). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit Sarkosyl und Protein-Inhibitor-Mix (PI-Mix) in Endkonzentrationen von 0,5 % bzw. 1:200 versetzt. Anschließend wurden die Ansätze mit dem entsprechenden AK in der unter 2.2.5 angegebenen Konzentration und 25 µl PAS für 3-4 h oder über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Konditionierte Medien wurden nicht vorgereinigt, sondern direkt mit AK und PAS inkubiert. Das Immunopräzipitat wurde durch Zentrifugation (4000 g / 5 min / 4°C) sedimentiert, und der Überstand wurde dekantiert. Die Protein/Antikörper-Komplexe wurden 3 x mit IP-Waschpuffer gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde, wie oben beschrieben, zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die Pellets wurden anschließend mit 50 µl 2-fach Laemmli-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 100 °C gekocht. Je 30 µl der Probe wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen, für Quantifizierungen wurde der gesamte Ansatz verwendet. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE (vgl. 2.5.3.1) und Western Blot (vgl. 2.5.3.2).

2.5.3.72.5.3.6 Quantifizierung von Proteinen

Zu quantifizierende Proteine wurden nach Auftrennung in der SDS-Page (vgl. 2.5.3.1) und immunchemischem Nachweis durch Western Blot (vgl. 2.5.3.2) mit Hilfe der AIDA 3.26 Image Software (Raytest) quantifiziert. Die Gesamt-Proteinmenge, die auf / in der apikalen und basolateralen Seite / Medium gefunden werden konnte, wurde als 100 % festgelegt. Hiervon ausgehend wurde der prozentuale Anteil der auf den jeweiligen Seiten befindlichen Proteine errechnet. Für alle Quantifizierungen wurde der Mittelwert, der aus Minimum 4 unabhängig voneinander durchgeführten Bestimmungen errechnet wurde, mit Standardabweichung angegeben.

2.5.4 Biochemische Untersuchung von Proteinen

2.5.4.1 Analyse des Glykosylierungsstatus

Endoglykosidase H Verdau

Um Proteine auf Asparagin-gekoppelte Glykosylierung zu testen, wurde ein enzymatischer Verdau mit Endoglykosidase H nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Dazu wurde je ein Aliquot des Überstandes (vgl. 2.5.1) mit Denaturierungspuffer versetzt, 10 min gekocht, auf Eis gekühlt und Reaktionspuffer zugegeben. Zu je einem Ansatz wurde 1 µl Endoglykosidase H hinzugefügt und alle Proben eine Stunde bei 37°C auf dem Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Laemmli-Probenpuffer gestoppt und die Proteine, wie unter 2.5.3.1, beschrieben analysiert.

N-Glykosidase F Verdau

Um Proteine auf komplexe Glykosylierung zu testen, wurde ein enzymatischer Verdau mit N-Glykosidase F nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

Zu dem Zellpellet (vgl. 2.4.1.3) wurde 100 µl SDS 1% gegeben und 10 min bei 100 °C inkubiert. Die Ansätze wurden mit 900 µl Triton X-100 1% auf eine Endkonzentration von 0,1 % SDS und 0,9 % Triton X-100 verdünnt. Die Proben wurden durch 10-maliges Aufziehen der Suspension mit einer 1 ml-Einwegspritze mit 26G-Kanüle homogenisiert und unlösliches Material durch Zentrifugation (10 min / 13000 UpM / 4°C) abgetrennt. Zu je einem Ansatz wurde 1 µl PNGase F hinzugefügt, und alle Proben wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Proteine wurden durch TCA Fällung (vgl. 2.5.3.4) aus den Ansätzen gefällt und mittels SDS-Page (vgl. 2.5.3.1) analysiert.

2.5.4.2 Nachweis von Oberflächenproteinen

Um zu bestimmen, ob das Protein an der Plasmamembran lokalisiert ist, wurde eine Inkubation mit Trypsin durchgeführt. Hierfür wurde auf eine mit PBS^{-/-} gewaschene Zellschale 500 µl Trypsin gegeben. Sobald sich die Zellen lösten, wurden die Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt, die Schale mit 500 µl Trypsin-Inhibitor gewaschen und diese Waschlösung mit den Zellen vereinigt. Nach 5 min Inkubation wurden die Zellen durch Abschaben mittels eines Zellschabers geerntet, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Schale mit 1 ml Trypsin-Inhibitor nachgewaschen. Gleichzeitig wurden als Kontrolle die Zellen einer nicht mit Trypsin behandelten Schale geerntet (vgl. 2.4.1.3). Die Proben wurden für 20 Sekunden bei 13000 UpM zentrifugiert und das Zellpellet mit Trypsin-

Inhibitor gewaschen. Das Zellpellet wurde in Lysepuffer resuspendiert und, wie unter 2.5.1 beschrieben, weiterverarbeitet.

2.5.4.3 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 2 x mit PBS gewaschen und mit 0,5 units / ml PIPLC in PBS^{-/-} versetzt. Die Zellschalen wurden 4 Stunden lang bei 4°C geschwenkt. Der Überstand wurde abgenommen und die Proteine mittels einer TCA-Fällung gefällt (vgl. 2.5.3.4). Die Zellen wurden 2 x mit PBS^{-/-} gewaschen, geerntet (vgl. 2.4.1.3) und, wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben, analysiert. Der Überstand als auch das Pellet wurden in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und die Proben auf einem SDS-Gel analysiert (vgl. 2.5.3.1).

2.5.4.4 Nachweis der Sekretion

Um festzustellen, ob das Protein in den Zellkulturüberstand sekretiert wird, wurden die Zellen 2 x mit MEM gewaschen und anschließend mit 1 ml MEM für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde abgenommen, die vorhandenen Proteine mit TCA (vgl. 2.5.3.4) gefällt oder durch eine Immunpräzipitation (vgl. 2.5.3.5) isoliert und mittels SDS-Page analysiert (vgl. 2.5.3.1).

2.5.5 Biotinylierung von apikalen und basolateralen Oberflächenproteinen polarisierter MDCK-Zellen

PBS-Puffer:

vgl. 2.4.1

PBS/Ca/Mg-Puffer (PBS^{+/+}):

1 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂ in PBS-Puffer

Biotin-Lösung:

1 mg/ml sulfo-NHS-LC-biotin in PBS^{+/+}

BSA-Lösung:

1 % (w/v) BSA in PBS^{+/+}

Glycin/BSA-Lösung:

10 mM Glycin, 1 % (w/v) BSA in PBS^{+/+}

Die entsprechenden MDCK-Zelllinien wurden in Filterkammern mit 24 mm Durchmesser polarisiert, das Kulturmedium zur Biotinylierung entfernt und der Zellmonolayer apikal und basolateral 3 x mit eiskaltem PBS^{+/+}-Puffer gewaschen. Der Zellmonolayer wurde anschließend entweder apikal mit 1,5 ml oder basolateral mit 2,6 ml frisch hergestellter Biotin-Lösung 1 h auf Eis inkubiert. Auf die jeweils nicht zu biotinylierende Seite wurde BSA-Lösung gegeben. Nach der Inkubation wurde der Zellmonolayer apikal und basolateral 3 x mit eiskaltem PBS^{+/+}-Puffer gewaschen und dann, zur Absättigung vom ungebundenen Biotin, 30 min mit Glycin/BSA-Lösung inkubiert. Nach zwei weiteren Waschzyklen mit PBS^{+/+}-Puffer wurden die Zellen in 1 ml PBS^{+/+}-Puffer mechanisch vom Filter abgelöst, pelletiert (10000 g / 5 min) und mit Detergenzpuffer-Puffer lysiert (vgl. 2.5.1). Zur Isolierung der biotinylierten Proteine wurde das Zelllysat mit 25 µl Streptavidin-Sepharose über Nacht bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Das Streptavidin-Sepharose Präzipitat wurde durch Zentrifugation (4000 g, 5 min, 4°C) abgetrennt und, wie unter 2.5.5.6 beschrieben, mit dem IP-Waschpuffer gewaschen. Die so erhaltenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE (vgl. 2.5.3.1) getrennt und im Western Blot mit den entsprechenden Antikörpern analysiert (vgl. 2.2.5). Für die Isolierung der biotinylierten Proteine bei der Koexpression wurde aus dem Lysat über Nacht eine IP (vgl. 2.5.3.5) mit dem jeweiligen AK (vgl. 2.2.5) durchgeführt. Die IP-Präzipitate wurden durch Zentrifugation (4000 g, 5 min, 4°C) abgetrennt und, wie unter 2.5.5.6 beschrieben, mit dem IP-Waschpuffer gewaschen. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE (vgl. 2.5.3.1) getrennt und die Proteine im Western Blot mit Streptavidin-HRP detektiert.

3 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung des polarisierten Transportes des Prion-Proteins und dessen homologen Proteins Doppel (Dpl) in *Mardin-Darby Canine Kidney* (MDCK) Zellen.

3.1 Expression, Nachweis und polarisierter Transport von PrP

3.1.1 Spezifität des 3F4 Antikörpers

Für murine Neuroblastomzellen (N2a-Zellen) ist bekannt, dass endogen PrP exprimiert wird. Eine Unterscheidung von endogener und exogener PrP Expression ist durch die Verwendung des monoklonalen Antikörpers (AK) 3F4 möglich (Serban et al., 1990). Dieser erkennt spezifisch die in die Aminosäuresequenz der Maus eingefügten Mutationen L108M und V111M (vgl. Abbildung 16 (A), PrP/3F4). Maus-PrP, in das diese Mutationen eingeführt wurden, wird als PrP/3F4 bezeichnet. Diese Mutationen entsprechen den Aminosäuren des menschlichen PrP (vgl. Abbildung 16 (A), Mensch), so dass ein Nachweis von exogen exprimiertem Maus-PrP möglich ist.

Für MDCK-Zellen, die eine epitheliale Hunde-Zelllinie darstellen, war zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt, ob endogen PrP exprimiert wird. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz von Mensch und Hund zeigt, dass das von dem 3F4 AK erkannte menschliche Aminosäure-Epitop 108/111 sich in den beiden Spezies nur an einer der beiden Stellen unterscheidet (vgl. Abbildung 16 (A), Mensch und Hund). Eine Detektion von endogen vorliegendem Hund-PrP durch den 3F4 AK wäre also möglich. Angaben hierzu gibt es in der Literatur nicht. Um auszuschließen, dass der 3F4 AK mit in MDCK-Zellen endogen exprimiertem Hund-PrP kreuzreagiert, wurden Gesamtproteinlysate aus untransfizierten MDCK-Zellen hergestellt. Die Proben wurden auf einem 12 % SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit dem 3F4 AK analysiert. Als Kontrolle wurden transient mit PrP/3F4 transfizierte N2a-Zellen verwendet.

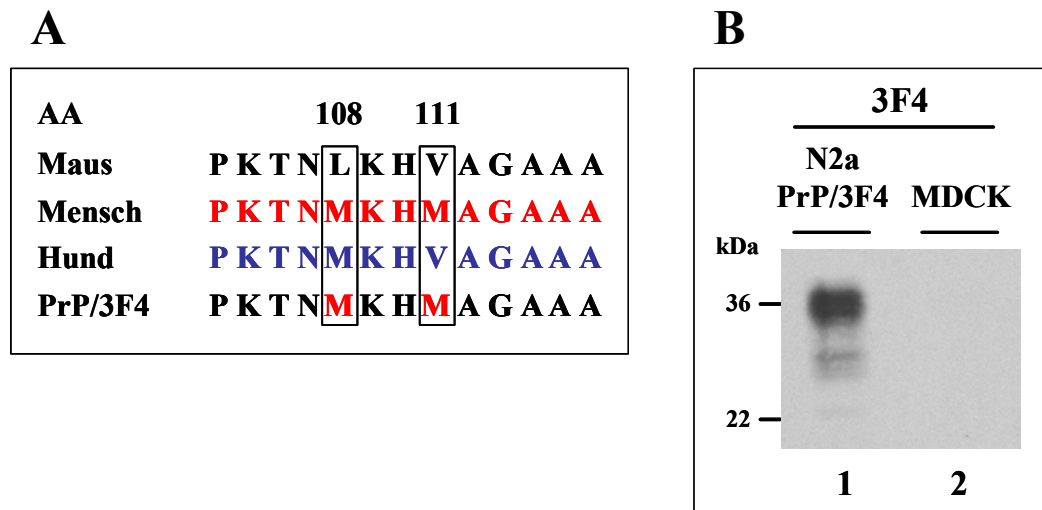


Abbildung 16: Spezifität des verwendeten 3F4 Antikörpers.

(A) Dargestellt ist die Aminosäuresequenz des PrP von Maus (schwarz), Mensch (rot), Hund (blau) und durch Einführung der Mutationen entstandenen Maus-PrP/3F4. Der AK 3F4 erkennt spezifisch die Aminosäuren von Mensch an den Positionen 108 und 111. (B) Gesamtproteinlysate von transient mit PrP/3F4 transfizierten N2a-Zellen und untransfizierten MDCK-Zellen wurden mittels 12 % SDS-PAGE getrennt und mit dem 3F4 AK detektiert. Von der Gesamtproteinmenge beider Lysate wurden jeweils 30µg auf das Gel aufgetragen.

Wie zu erwarten, erkennt der 3F4 AK das in N2a-Zellen exogen transient exprimierte PrP/3F4. Im Proteinlysat sind die für PrP spezifischen Banden bei ca. 25, 29-30 und 33-38 kDa zu erkennen (vgl. Abbildung 16 (B), Spur 1). Diese repräsentieren unglykosyliertes, mono- und diglykosyliertes und komplex glykosyliertes PrP (Hope et al., 1986; Somerville et al., 1989). Eine Detektion von PrP in untransfizierten MDCK-Zellen ist dagegen nicht möglich (vgl. Abbildung 16 (B), Spur 2).

Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass MDCK-Zellen entweder endogen kein PrP exprimieren oder aber vorliegendes Hund-PrP durch den 3F4 AK nicht erkannt wird. Die Effekte, die bei Verwendung dieses AK in MDCK-Zellen detektiert werden, sind also ausschließlich auf exogen exprimiertes Protein zurückzuführen.

3.1.2 Stabile exogene Expression von PrP/3F4

Für eine Untersuchung des polarisierten Transportes exogen exprimierter Proteine muss die entsprechende DNA in die Zellen transfiziert werden. Eine Möglichkeit stellt die transiente Transfektion dar, bei der man schnell eine starke Expression der Proteine erhält. Die Zellen beinhalten eine Vielzahl der transfizierten Plasmid-DNA, eine Integration in das zelleigene Genom findet aber nicht statt. Eine Expression der transfizierten Proteine ist deshalb nur über einen Zeitraum von ca. 24-72 h möglich (Kosovsky, 2000). In dem für die

Untersuchung des polarisierten Transportes verwendeten Modellsystem werden MDCK-Zellen aber über einen Zeitraum von bis zu 5 Tagen auf den Filtern kultiviert. Die Zellen müssen daher mit der DNA des zu untersuchenden Proteins stabil transfiziert werden. Bei dieser Methode wird die transfizierte DNA in das zelleigene Genom integriert (Kosovsky, 2000). Einzelzellklone, die das Protein exprimieren, werden mit Hilfe eines Antibiotikums positiv selektiert. Zellen ohne Expression oder mit toxischer Überexpression des Proteins werden negativ selektiert. Ein weiterer Vorteil stabiler Transfektionen ist die Transfektionseffizienz. Bei einer transienten Transfektion weisen eine Vielzahl von Zellen keine Expression auf. Eine Quantifizierung der auf den beiden Plasmamembranen exprimierten Proteine für einen Vergleich ist kaum möglich. Stabile Transfektionen ermöglichen daher die Herstellung von Zelllinien, bei denen Einzelzellklone das zu untersuchende Protein konstitutiv und mit gleich bleibender Expression synthetisieren. Für die Herstellung stabil exprimierender PrP/3F4 MDCK-Zellen wurden nach der Transfektion Einzelzellklone mit dem Antibiotikum Zeocin positiv selektiert. Aliquots der Klone wurden lysiert und die Proben im Western Blot auf eine Expression des Proteins überprüft.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Expressionsstärke exogen exprimierter Proteine einen Einfluss auf die Effektivität der Sortierung im *Trans*-Golgi-Netzwerk (TGN), der primären Sortierungsstation der Zelle, nehmen kann (Marmorstein et al., 2000; Gokay et al., 2001). Im TGN werden Proteine in unterschiedliche Transportvesikel verpackt und zur apikalen oder basolateralen Plasmamembran transportiert (Griffiths and Simons 1986; Salamero et al., 1990; Simons, 1995). Eine übermäßig starke exogene Expression von Proteinen kann zu einer Absättigung der Sortierungsmaschinerie führen (Marmorstein et al., 2000). Die Effizienz für eine strikte Trennung der *Cargo*-Proteine in ihre Vesikel wird dadurch verringert. Ein fehlerhafter polarisierter Transport kann die Folge sein (Marmorstein et al., 2000). Durch das Auswählen und Untersuchen verschieden stark exogen exprimierender Einzelklone (vgl. Abbildung 17) sollte eine artifizielle Fehlsortierung verhindert werden. Von den exogen stabil exprimierenden MDCK-PrP/3F4 Klonen wurden deshalb Einzelzellklone ausgewählt, die verschiedene Expressionsstärken aufwiesen (vgl. Abbildung 17).

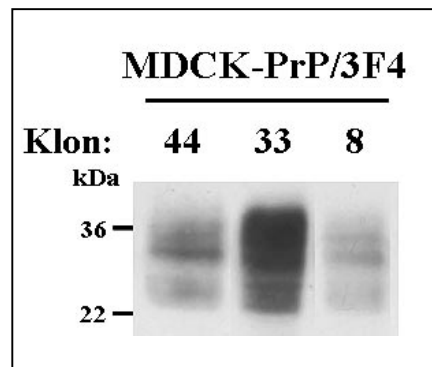


Abbildung 17: Expressionsstärke verschieden stabil transfizierter MDCK-PrP/3F4 Klone.

Gesamtproteinlysate von MDCK-Zellen mit exogener PrP/3F4 Expression wurden mittels 12 % SDS-PAGE getrennt und mit dem 3F4 AK detektiert. Um die Expressionsstärken der Klone miteinander vergleichen zu können, wurden von der Gesamtproteinmenge der Lysate jeweils 30µg Protein auf das Gel aufgetragen.

3.1.3 Biochemische Charakterisierung von PrP/3F4

Die Umwandlung des zellulären PrP (PrP^c) zu einem fehlgefalteten, potentiell infektiösen PrP (PrP^{Sc}) stellt einen essentiellen Schritt in der Ausbildung der Prion-Erkrankungen dar (Prusiner et al., 1998). PrP^c ist ein komplex glykosyliertes, mit einem Glykosylphosphatidylinositol (GPI) -Anker an der Zelloberfläche exprimiertes Protein (Stahl et al., 1987; Haraguchi et al., 1989; Stahl et al., 1990; Stimson et al., 1999). Dies konnte im Zellsystem mit z.B. Neuroblastomzellen (N2a-Zellen) gezeigt werden (Caughey et al., 1989). Ausschlaggebend für eine korrekte Faltung und Transport von PrP im sekretorischen Weg sind post-translationale Modifikationen, wie z.B. komplexe N-Glykosylierung oder Membranverankerung. PrP ohne eine C-terminale GPI-Signalsequenz (PrPΔGPI) bleibt gänzlich unglykosyliert (Winklhofer et al., 2003b). Für die Übertragung Mannose-reicher Glykane im Endoplasmatischen Retikulum (ER) ist ein nicht funktionaler Membrananker ausreichend. Die *Core*-Glykane werden allerdings nur in komplexe N-Glykosylierungen modifiziert, wenn PrP während der Synthese einen funktionalen Membrananker erhält (Winklhofer et al., 2003b). Die komplexe Glykosylierung ist dabei unabhängig von einer spezifischen GPI-Verankerung (Rudd et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass PrP ohne komplexe oder gänzlich fehlende Glykosylierung nicht korrekt gefaltet wird. Dieses fehlgefaltete PrP kann entweder intrazellulär akkumulieren (Rogers et al., 1990) oder ohne eine Membranverankerung ins Zellkulturmedium sekretiert werden (Winklhofer et al., 2003b). Die Fehlfaltung von PrP durch fehlende oder unvollständige post-translationale Modifikationen kann einen Einfluss auf die Konformationsänderung von PrP^c zu PrP^{Sc} nehmen (Lehmann and Harris, 1997; Winklhofer et al., 2003a). Aufgrund dieser möglichen Einflussnahme post-translationaler

Modifikationen auf die korrekte Faltung von PrP müssen exogen exprimierte PrP-Konstrukte auf Glykosylierung und Membranverankerung überprüft werden. Im Gegensatz zu in N2a-Zellen exogen exprimierten PrP/3F4 war nicht bekannt, ob das Protein für MDCK-Zellen ebenfalls komplex glykosyliert und mit einem GPI-Anker an der Zelloberfläche exprimiert wird. Es wurden deshalb der Glykosylierungsstatus und die Membranverankerung von in MDCK-Zellen exogen exprimierten PrP/3F und allen in dieser Arbeit untersuchten Proteine analysiert.

Expression und Löslichkeit von PrP

Für PrP war aus vorausgegangenen Untersuchungen bekannt, dass das Protein bei korrekter Faltung und Maturierung in dem Detergenzpuffer Triton X-100/DOC löslich ist und fast ausschließlich in der Fraktion des Überstandes nachweisbar ist. Bei Fehlfaltung ist das Protein unlöslich und hauptsächlich im Pellet des Zelllysates detektierbar (Tatzelt et al., 1996). Zunächst wurde daher die Expression von PrP und dessen Löslichkeit in dem Detergenzpuffer untersucht. Ein Aliquot des Einzelzellklons MDCK-PrP/3F4 44 (vgl. Abbildung 17) wurde lysiert. Anschließend wurden das Lysat und das Pellet im 12 % SDS-Gel Lysat aufgetrennt und im Western Blot mit dem 3F4 AK detektiert. Als Kontrolle wurden transient mit PrP/3F4 transfizierte N2a-Zellen verwendet.

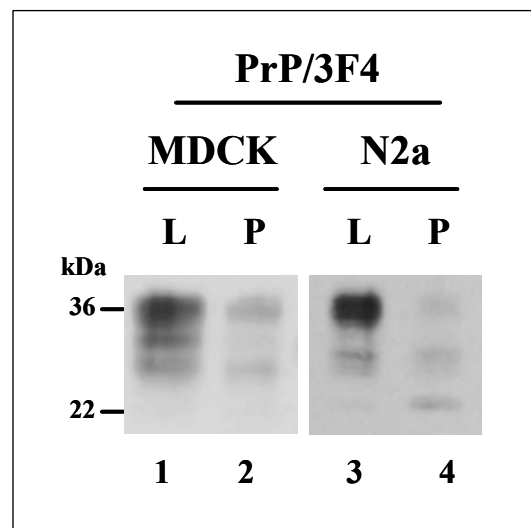


Abbildung 18: Expression und Löslichkeit von PrP in MDCK-Zellen.

PrP/3F4 wurde exogen stabil in MDCK-Zellen oder transient in N2a-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden geerntet und lysiert. Nach Zentrifugation wurden das Lysat (L) und das Pellet (P) getrennt auf ein 12 % SDS-PAGE Gel aufgetragen und im Western Blot mit dem 3F4 AK detektiert.

In Abbildung 18 ist zu erkennen, dass PrP in MDCK-Zellen, ähnlich wie in N2a-Zellen, in dem Detergenzpuffer löslich und daher vor allem in dem Überstand des Lysats nachweisbar war (vgl. Abbildung 18, Spur 1 und 3). Im Pellet sind die Proteine dagegen kaum nachweisbar (vgl. Abbildung 18, Spur 2 und 4). Dies ist ein Hinweis darauf, dass PrP im sekretorischen Weg richtig gefaltet wurde. Die für PrP detektierten Proteinbanden unterscheiden sich allerdings in den beiden Zelllinien MDCK und N2a. Dies ist wahrscheinlich auf eine unterschiedliche Modifikation der N-Glykane (Kornfeld and Kornfeld, 1985) zurückzuführen. Diese kann durch z.B. unterschiedliche Aktivität der an der Glykosylierung involvierten Enzyme entstehen und ist sowohl Protein- als auch Zelltyp-spezifisch (Parodi, 2000; Helenius and Aebi, 2001).

Glykosylierungsstatus und Oberflächenexpression von PrP

Im ER synthetisierte Proteine werden meist durch kovalente Bindung von Zuckern glykosyliert (Kornfeld and Kornfeld, 1985). Die Übertragung der Zucker im ER erfolgt unmittelbar während der Peptidsynthese durch eine membrangebundene Glykosyltransferase. Als Akzeptor-Stelle für eine N-Glykosylierung kann jedes Asparagin in einem Protein mit einer Konsensus-Sequenz Asn-X-Ser oder Asn-X-Thr dienen, wobei X jede beliebige AS außer Prolin sein kann. Eine Unterscheidung zwischen der im ER generierten Mannose-reichen Glykosylierung und der komplexen Glykosylierung im Golgi-Apparat ist mit Hilfe verschiedener Glykosidasen möglich. Endoglykosidase H (Endo H) spaltet selektiv die im ER angefügten nicht komplexierten Mannose-reichen Zuckerreste ab (Tarentino et al., 1974; Robbins et al., 1984). Durch Modifikation der Zuckerreste im Golgi-Apparat entstehen an den Asparagin-Resten komplexe Zuckerketten, die nicht durch Endo H abgespalten werden können, aber sensitiv gegen N-Glykosidase F (PNGase F) sind (Tarentino et al., 1985). Oligosaccharide können aber nicht nur kovalent an Asparagin, sondern auch an Serin- und Threoninreste gebunden sein. Diese als O-glykosidisch bezeichnete Verzuckerung von Proteinen findet ausschließlich im Golgi-Apparat statt und ist resistent gegen eine Behandlung mit PNGase F (Tarentino et al., 1985).

Für PrP ist bekannt, dass es zwei komplexe N-Glykosylierungen im Molekül an den Aminosäuren Asn180 und Asn196 (Maus-PrP) besitzt (Haraguchi et al., 1989; Stimson et al., 1999). Um auf Mannose-reiche Glykane im ER und deren Modifikation im Golgi-Apparat zu untersuchen, wurde ein stabil exogen exprimierender MDCK-PrP/3F4

Einzelzellklon mit Endo H bzw. PNGaseF inkubiert. Als Kontrolle wurden transient mit PrP/3F4 transfizierte N2a-Zellen verwendet.

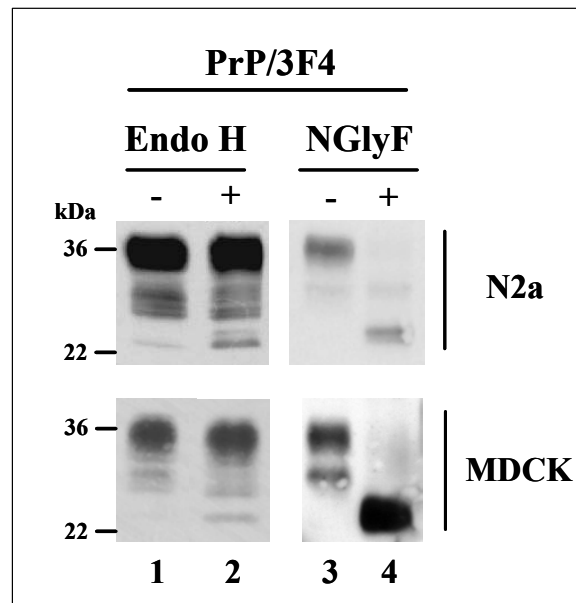


Abbildung 19: PrP/3F4 wird in MDCK-Zellen komplex glykosyliert.

PrP/3F4 wurde exogen stabil in MDCK-Zellen oder transient in N2a-Zellen exprimiert. Zelllysate wurden mit Endo H bzw. NGlyF inkubiert (EndoH + / NGlyF +) oder unbehandelt gelassen (EndoH - / NGlyF -). Die Proben wurden im Western Blot mit dem 3F4 AK detektiert.

Die unbehandelten Lysate zeigten das für PrP typische Bandenmuster sowohl in N2a- als auch in MDCK-Zellen (vgl. Abbildung 19, Spuren 1 und 3). Nach einer Inkubation mit Endo H blieben diese unverändert (vgl. Abbildung 19, Spur 2). Inkubation mit NGlyF zeigte dagegen durch eine erhöhte elektrophoretische Mobilität der Proteinbanden (vgl. Abbildung 19, Spur 4), dass hier das Enzym die komplexen Zucker abspalten konnte. Diese Ergebnisse zeigen, dass PrP auch in MDCK-Zellen als komplex glykosyliertes Protein vorliegt.

PrP ist mit einem GPI-Anker an der Plasmamembran verankert. Dieser Lipidanker wird während der Prozessierung im ER an das Protein nach Abspaltung einer C-terminalen GPI-Signalsequenz angehängt (Stahl et al., 1992). In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Glykosylierung von PrP unter anderem von der C-terminalen Signalsequenz und der Membranverankerung bestimmt wird. PrP ohne eine C-terminale GPI-Signalsequenz bleibt gänzlich unglykosyliert (PrPΔGPI) (Rogers et al., 1993; Kocisko et al., 1994). Für eine *Core*-Glykosylierung von PrP ist das Vorhandensein eines nicht funktionalen Membranankers ausreichend (vgl. 3.3.2 und 3.3.3) (Winklhofer et al., 2003b). Diese

Mannose-reichen Glykane werden aber nur in komplexe Glykane überführt, wenn eine funktionale Membranverankerung, sei es durch einen GPI-Anker oder durch einen anderen funktionalen Anker (vgl. 3.3.1), vorliegt (Winklhofer et al., 2003b). Die Ergebnisse der Untersuchung des Glykosylierungsstatus zeigten, dass PrP in MDCK-Zellen komplex glykosyliert ist. Eine Membranverankerung war daher wahrscheinlich, eine spezifische GPI-Verankerung konnte aber aus diesen Ergebnissen noch nicht geschlossen werden. Um zunächst eine Expression von PrP an der Plasmamembran zu untersuchen, wurde eine Inkubation mit Trypsin durchgeführt. Dieses Enzym entfernt Oberflächenproteine unspezifisch durch Hydrolyse. Nach Lyse der Zellen sind diese im Western Blot nicht mehr oder nur noch schwer detektierbar. Eine spezifische GPI-Verankerung von PrP auf der Zelloberfläche wurde durch eine extrazelluläre Inkubation mit Phosphatidylinositol-Phospholipase C (PIPLC) analysiert. Das Enzym Phospholipase C spaltet selektiv den GPI-Anker. Mit einem GPI-Anker an der Plasmamembran verankerte Proteine werden deshalb bei einer Behandlung mit PIPLC in den Überstand freigesetzt und sind anschließend aus diesem als lösliche Proteine nachweisbar.

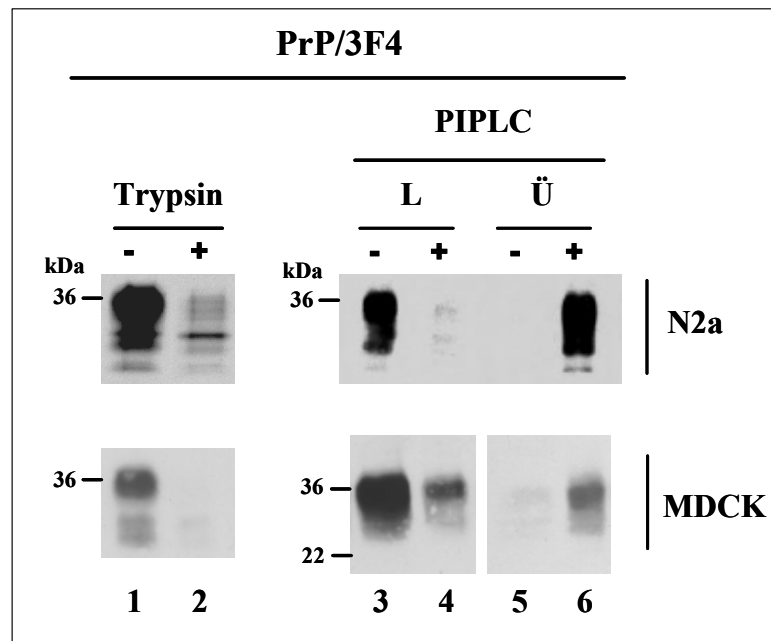


Abbildung 20: PrP/3F4 wird in MDCK-Zellen als GPI-verankertes Protein auf der Zelloberfläche exprimiert.

Exogen stabil exprimierende MDCK-PrP/3F4 Zellen oder transient mit PrP/3F4 transfizierte N2a-Zellen wurden, um auf an der Zelloberfläche exprimiertes PrP zu untersuchen, mit Trypsin inkubiert (Trypsin +) oder zur Kontrolle unbehandelt gelassen (Trypsin -). Das nach Zellyse verbleibende PrP wurde im Western Blot mit dem AK 3F4 analysiert. Eine spezifische GPI-Verankerung wurde nachgewiesen, indem exogen stabil exprimierende MDCK-PrP/3F4 Einzelzellklone oder transient mit PrP/3F4 transfizierte N2a-Zellen bei 4°C mit PIPLC inkubiert (PIPLC +) oder zur Kontrolle unbehandelt gelassen (PIPLC -) wurden. Anschließend wurden die Zellysate (L) und die Überstände (Ü) in einem Western Blot mit dem 3F4 AK auf PrP untersucht.

Nach extrazellulärer Inkubation mit Trypsin war zu erkennen, dass der größte Anteil von PrP von der Plasmamembran entfernt wurde und nicht mehr auf dem Blot detektierbar war (vgl. Abbildung 20 (A), Spur 2). PrP ist daher auch in MDCK-Zellen zu einem großen Teil auf der Oberfläche exprimiert. In mit Triton X-100 permeabilisierten N2a-Zellen konnte allerdings in früheren Untersuchungen gezeigt werden, dass PrP auch in allen Kompartimenten des sekretorischen Wegs detektiert werden kann. Es ist dort vor allem im Golgi-Apparat lokalisiert, in dem die Modifizierung der komplexen N-Glykane stattfindet (Ivanova et al., 2001). Das in Abbildung 20 (A), Spur 2 noch detektierbare PrP ist daher wahrscheinlich auf eine intrazelluläre Lokalisation zurückzuführen.

Eine spezifische GPI-Verankerung von PrP auf der Zellmembran wurde durch eine Behandlung mit PIPLC analysiert. In den ohne PIPLC behandelten Proben war PrP im Lysat detektierbar (Abbildung 20 (B), Spur 3), ein Nachweis aus dem Überstand war kaum möglich (Abbildung 20 (B), Spur 5). Inkubation mit PIPLC führte zu einer Spaltung des GPI-Ankers und zu einer Freisetzung des Proteins in den Überstand. Das Protein war daher

nach der PIPLC Behandlung hauptsächlich im Überstand als lösliches Protein nachweisbar (Abbildung 20 (B), Spur 6), die Menge des in dem Lysat detektierbaren Proteins war dagegen deutlich vermindert (Abbildung 20 (B), Spur 4) (Abbildung der PIPLC Behandlung von N2a-Zellen aus (Winklhofer et al. 2003b)).

Zusammenfassend kann man feststellen: In MDCK-Zellen, die als Modellsystem für die Untersuchung des polarisierten Transportes von PrP in dieser Arbeit verwendet wurden, liegt PrP als komplex glykosyliertes, mit einem GPI-Anker an der Plasmamembran verankertes Protein vor.

3.1.4 Basolateraler Transport von PrP

Um eine Aussage über das Vorliegen eines polarisierten Transports machen zu können, müssen die zur apikalen bzw. basolateralen Zelloberfläche sortierten Proteine selektiv nachgewiesen werden. Eine sensitive biochemische Methode zum Nachweis und zur Quantifizierung von Oberflächenproteinen ist die Biotinylierung (Diamandis and Christopoulos, 1991; Dunn, 1994). Ein nicht zellgängiges Biotinderivat wird dabei mittels einer N-hydroxysulfosuccinimidester-Gruppe kovalent an die Aminosäuren der Oberflächenproteine gebunden (Green et al., 1971). Durch Präzipitation mit Streptavidin konjugierter Sepharose können die biotinmarkierten Proteine selektiv isoliert werden (Chalet and Wolf, 1964; Wilcheck and Bayer, 1990). Nach Auftrennung der Proben im 12 % SDS-Gel können die Proteine im Western Blot nachgewiesen und die detektierten Banden quantifiziert werden.

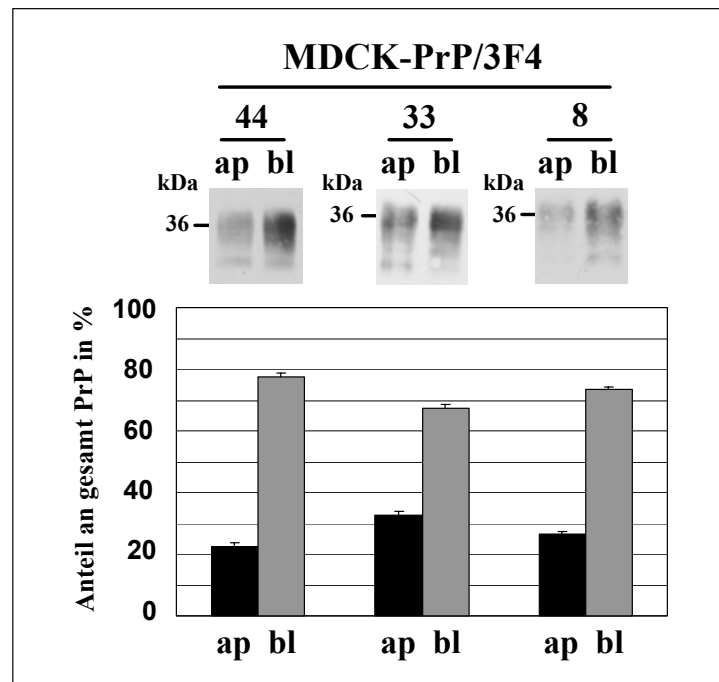


Abbildung 21: Quantitative Analyse des polarisierten Transports von PrP/3F4 in MDCK-Zellen.

MDCK-Zellen mit verschiedener exogener Expression von PrP/3F4 (vgl. Abbildung 17) wurden 5 Tage auf Filtern mit 24 mm Durchmesser kultiviert. An der Zelloberfläche exprimiertes PrP/3F4 wurde selektiv entweder von der apikalen (ap=apikal) oder von der basolateralen (bl=basolateral) Seite mit EZ-linkTM Sulfo-NHS-Biotin markiert. Die Zellen wurden lysiert und die biotinylierten Proteine mit Streptavidin konjugierter Sepharose isoliert. Die immunpräzipitierten Proteine wurden mittels 12 % SDS-PAGE getrennt und im Western Blot mit dem AK 3F4 nachgewiesen. Für die drei Einzelzellklone sind jeweils die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung angegeben. Die Gesamt-Proteinmenge an PrP/3F4, die auf der apikalen und basolateralen Seite gefunden werden konnte, wurde als 100 % festgelegt. Davon ausgehend wurde der prozentuale Anteil der auf den jeweiligen Seiten befindlichen Proteine errechnet.

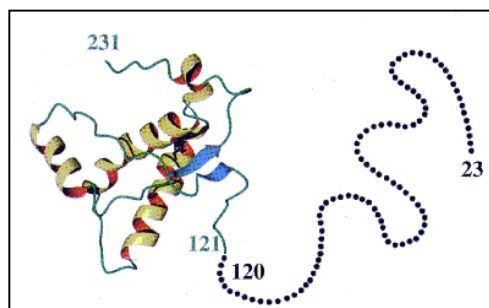
Die Detektion im Western Blot gab Grund zu der Annahme, dass PrP/3F4 einem basolateralen Transport unterliegt. Die Proteinbanden der von der basolateralen Plasmamembran biotinylierten Einzelzellklone wiesen eine starke Bandenintensität auf. Im Gegensatz dazu war die Detektion der von der apikalen Zellmembran biotinylierten Klone schwächer. Die Quantifizierung ergab einen polarisierten Transport zur basolateralen Zellmembran mit einem Verteilungsverhältnis zwischen apikaler und basolateraler Seite von ca. 25:75. Die prozentualen Ergebnisse variieren allerdings in den drei Einzelzellklonen. Der Einzelzellklon 44 ist charakterisiert durch eine basolaterale Lokalisation von PrP/3F4 von bis zu 80%. Die Quantifizierung des Klons 33 zeigt dagegen nur eine basolaterale Verteilung von 65%. Diese Unterschiede sind vermutlich bedingt durch die Variabilität der exogenen Expression des Proteins in den Einzelzellklonen, die die Effizienz des polarisierten Transportes beeinträchtigen kann (vgl. 3.1.2).

In bisherigen Untersuchungen waren GPI-verankerte Proteine an der apikalen Plasmamembran lokalisiert (Lisanti, 1989; Lisanti and Rodriguez-Boulan, 1990; Fullekrug and Simons, 2004), und auch komplexe Glykosylierungen wurden eher mit einem apikalen Transport in Verbindung gebracht (Wilson, 1990; Scheiffele et al., 1995). Das Prion-Protein ist somit das erste GPI-verankerte und komplex glykosylierte Protein, für das eine vornehmlich basolaterale Lokalisation in MDCK-Zellen nachgewiesen werden kann.

3.2 Potentielle zelluläre Sortierungssignale von PrP

Klassische basolaterale Sortierungssignale, wie z.B. auf Tyrosin oder Dileucin basierende Aminosäuremotive (vgl. 1.4.3.1), wurden bisher nur in zytoplasmatischen Teilen von Proteinen gefunden. Als GPI-verankertes Protein (vgl. Abbildung 22 (B)) besitzt PrP allerdings keinen solchen zytoplasmatischen Proteinanteil. Das Protein wird aber dennoch in polarisierten MDCK-Zellen basolateral transportiert. Es müssen daher in PrP Aminosäure-Sequenzen oder Domänen vorhanden sein, die den bisher identifizierten klassischen basolateralen Sortierungssignalen nicht zugeordnet werden können.

(A)



(B)

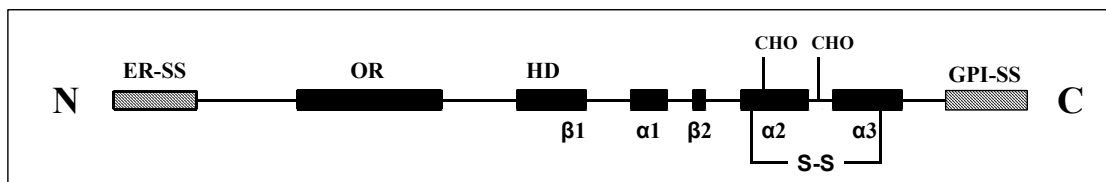


Abbildung 22: Dreidimensionale Struktur und Domänen in PrP.

(A) Dreidimensionale Struktur von Maus-PrP. In der farbig dargestellten C-terminalen Domäne sind α -Helices mit gelb-roter Farbe, antiparallele β -Faltblätter mit blauer Farbe und die Bereiche mit nicht-regelmäßiger Sekundärstruktur in grüner Farbe angegeben. Die Aminosäuren der unstrukturierten N-terminalen Domäne werden durch schwarze Punkte dargestellt (Abbildung aus (Hörnlimann et al. 2001)). (B) Schematische Darstellung von PrP. ER-SS: ER-Signalsequenz; OR: Oktarepeat Region; HD: Hydrophobe Domäne; β 1,2: β -Faltblätter 1,2; α 1-3: α -Helices 1-3; CHO: Glykosylierungsstelle; S-S: Disulfidbrücke; GPI-SS: GPI-Anker Signalsequenz.

Wie in Abbildung 22 (A) zu sehen, besteht das mature PrP Molekül (AS 23-231) aus einer langen unstrukturierten N-terminalen (AS 23-120) und einer strukturierten, globulären C-terminalen Domäne (AS 121-231). Die N-terminale Domäne beinhaltet Strukturen, wie z.B. die Oktarepeatregion und die Hydrophobe Domäne (HD) (Abbildung 22 (B)). Die strukturierte C-terminale Domäne ist dagegen gekennzeichnet durch zwei N-Glykosylierungen, eine Disulfidbrücke und eine GPI-Verankerung (Abbildung 22 (B)). Um die für den basolateralen Transport von PrP verantwortliche Domäne identifizieren zu können, musste ein möglicher Einfluss der verschiedenen Domänen auf die basolaterale Lokalisation von PrP untersucht werden.

3.3 Einfluss der Membranverankerung und der komplexen Glykosylierung auf den polarisierten Transport von PrP

Aufbauend auf die in Kapitel 3.2 angestellten Überlegungen stellte sich die Frage, ob die klassischen apikalen Sortierungssignale GPI- bzw. eine Membranverankerung und komplexe Glykosylierung einen Einfluss auf die basolaterale Verteilung von PrP haben. Um die Frage auf den Einfluss dieser Domänen auf das Sortierungsverhalten von PrP beantworten zu können, wurden drei PrP Mutanten ausgesucht: PrP-CD4, PrP-M204S und PrPmtGPI. Die Konstrukte wurden in anderen Untersuchungen schon biochemisch charakterisiert und werden daher hier nur kurz beschrieben (Taraboulos et al., 1995; Winklhofer et al., 2003b).

3.3.1 Beschreibung der biochemischen Eigenschaften von PrP-CD4

In dem Konstrukt PrP-CD4 ist der GPI-Anker ausgetauscht gegen den C-terminalen Membrananker des CD4 T-Zell-Oberflächenproteins der Maus (vgl. Abbildung 23). Das Protein besitzt daher keine GPI-Verankerung, sondern ist mittels der hydrophoben Transmembrandomäne in der Membran verankert.

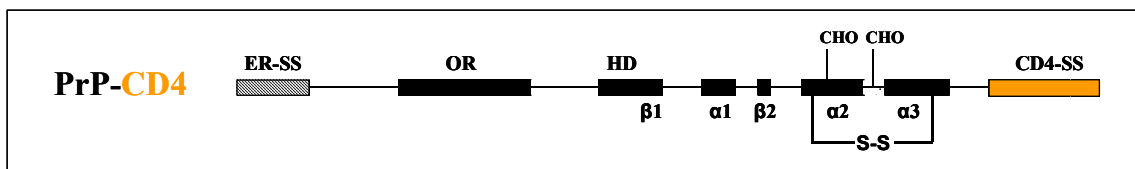


Abbildung 23: Schematische Darstellung von PrP-CD4.

Schematische Darstellung von PrP-CD4. ER-SS: ER-Signalsequenz; OR: Oktarepeat Region; HD: Hydrophobe Domäne, α 1-3: α -Helices, β 1,2: β -Faltblätter, CHO: Glykosylierungsstelle; S-S: Disulfidbrücke; CD4-Domäne ist gelb gekennzeichnet.

In vorausgegangenen Studien wurde das PrP-CD4 Konstrukt verwendet, um den Einfluss des GPI-Ankers auf post-translationale Modifikationen und intrazelluläre Lokalisation von PrP zu untersuchen. Es sollte dadurch unter anderem gezeigt werden, ob eine PrP^c/PrP^{Sc} Konversion abhängig ist von einer spezifischen GPI-Verankerung oder ob für die Umfaltung eine Membranverankerung ausreicht (Taraboulos et al., 1995; Kaneko et al., 1997; Winklhofer et al., 2003b). Aus diesen Untersuchungen ist bekannt, dass sich PrP-CD4 resistent gegenüber einer Inkubation mit Endo H und sensitiv gegenüber PNGaseF verhält. Mit Trypsin kann es von der Zelloberfläche entfernt werden (Taraboulos et al.,

1995; Kaneko et al., 1997; Winklhofer et al., 2003b). PrP-CD4 wird als komplex glykosyliertes Protein an der Zelloberfläche exprimiert. Biochemisch verhält sich PrP mit einem heterologen Membrananker (CD4) daher ähnlich wie PrP, das mit einem GPI-Anker auf der Membran verankert ist. Durch Charakterisierung des polarisierten Transportes dieses Proteins sollten erste Erkenntnisse darüber gewonnen werden, ob sich das Sortierungsverhalten eines nicht mehr GPI-verankerten, aber immer noch membrangebundenen PrP verändert.

3.3.2 Beschreibung der biochemischen Eigenschaften von PrP-M204S

Aus der NMR-Struktur von Maus-PrP wurde abgeleitet, dass in Helix 3 die hydrophobe Seitenkette an Position 204 eine wichtige Stabilisierung von Helix 1 darstellt. Diese Position ist bei allen Säugetieren konserviert (Wopfner et al., 1999). In dem Konstrukt PrP-M204S ist diese unpolare Aminosäure Methionin durch die ungeladene polare Aminosäure Serin ersetzt worden (vgl. Abbildung 24).

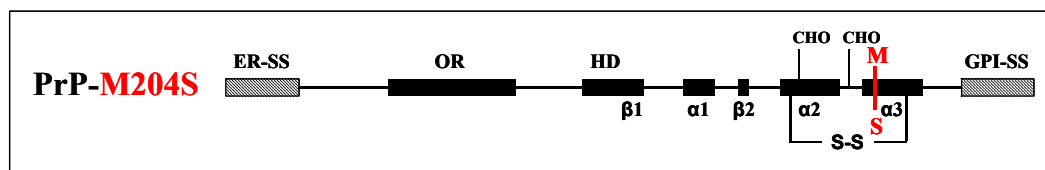


Abbildung 24: Schematische Darstellung von PrP-M204S.

Schematische Darstellung von PrP-M204S. ER-SS: ER-Signalsequenz; OR: Oktarepeat Region; HD: Hydrophobe Domäne, α 1-3: α -Helices, β 1,2: β -Faltblätter, CHO: Glykosylierungsstelle; S-S: Disulfidbrücke; GPI-SS: GPI-Anker Signalsequenz. Die eingeführte Mutation ist rot gekennzeichnet.

Es konnte gezeigt werden, dass durch den Austausch M/S an der Aminosäure (AS) 204 die Interaktion von Helix 3 mit Helix 1 verhindert und diese destabilisiert wird (Winklhofer et al., 2003b). Die Zerstörung der Integrität von Helix 1 verhindert die Übertragung des GPI-Ankers auf das Protein. Durch den fehlenden funktionalen Membrananker wird PrP-M204S nicht an der Plasmamembran verankert, sondern als lösliches Protein in das Zellkulturmedium sekretiert. Eine Hydrolyse mit Trypsin ist daher nicht möglich. Das Vorliegen der C-terminalen GPI-Anker Signalsequenz reicht aber aus, dass das Protein eine *Core*-Glykosylierung im ER erhält. Der fehlende funktionale Membrananker nimmt dagegen Einfluss auf deren Modifizierung und dadurch auch auf die Proteinfaltung. Eine Umwandlung der Mannose-reichen Glykane in komplexe Glykane findet nicht statt und bewirkt eine Fehlfaltung des Proteins (vgl. 3.1.3). Das Konstrukt ist daher sensitiv

gegenüber einer Inkubation mit Endo H. PrP-M204S wird als Mannose-reich glykosyliertes Protein in das Zellkulturmedium sekretiert (Winklhofer et al., 2003b).

3.3.3 Beschreibung der biochemischen Eigenschaften von PrPmtGPI

In dem Konstrukt PrPmtGPI ist die GPI-Anker-/Anheftungsstelle (ω -Site) der GPI-Anker-Signalsequenz mutiert (vgl. Abbildung 25). Durch den Austausch der Serine an den Positionen 230-232 durch Threonine wurde die ω -site so verändert, dass diese nicht mehr funktionsfähig ist und die GPI-Anker Signalsequenz nicht mehr erkannt wird (Nuoffer et al., 1993). Auf diese Weise bleibt die ursprüngliche Länge der PrP-Polypeptidkette (AS 1-254) erhalten, eine GPI-Verankerung findet aber nicht statt.

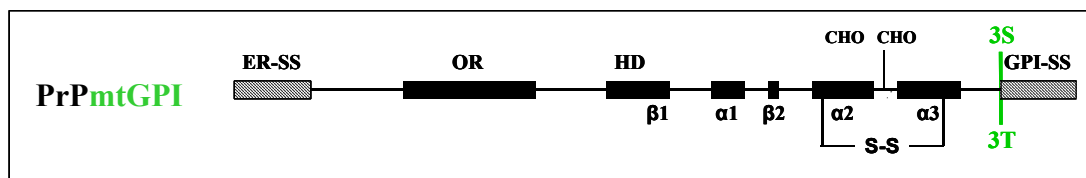


Abbildung 25: Schematische Darstellung von PrPmtGPI.

Schematische Darstellung von PrPmtGPI. ER-SS: ER-Signalsequenz; OR: Oktarepeat Region; HD: Hydrophobe Domäne, α 1-3: α -Helices, β 1,2: β -Faltblätter, CHO: Glykosylierungsstelle; S-S: Disulfidbrücke; GPI-SS: GPI-Anker Signalsequenz. Die eingeführten Mutationen sind grün gekennzeichnet.

Die vorhandene C-terminale GPI-Signalsequenz ist, ähnlich PrP-M204S, ausreichend für eine *Core*-Glykosylierung des Proteins im ER. Die Anheftung eines funktionalen GPI-Ankers ist allerdings durch die Mutation der ω -site verhindert, so dass das PrPmtGPI als lösliches Protein in das Zellkulturmedium sekretiert wird. Da ein funktionaler Membrananker Voraussetzung für die Umwandlung der Mannose-reichen Glykane ist, findet deren Modifizierung zu komplexen Glykanen nicht statt (Winklhofer et al., 2003b). Es konnte biochemisch gezeigt werden, dass das Protein wie PrP-M204S als nicht komplex glykosyliertes, Mannose-reiches Protein in das Zellkulturmedium sekretiert wird (Winklhofer et al., 2003b).

Beide Konstrukte, PrPmtGPI und PrP-M204S, weisen keine funktionale Membranverankerung auf, sind fehlgefaltet, tragen Mannose-reiche Glykosylierungen und werden in das Zellkulturmedium sekretiert (Winklhofer et al., 2003b). Die Untersuchung des Sortierungsverhaltens dieser beiden Proteine in polarisierten MDCK-Zellen sollte zeigen, ob die basolaterale Lokalisation des PrP abhängig ist von einer spezifischen GPI-

Verankerung bzw. einer Membranverankerung oder beeinflusst wird von dem Vorliegen komplexer Glykosylierungen.

3.3.4 Austausch des GPI-Ankers gegen die CD4-Transmembrandomäne ohne Einfluss auf den basolateralen Transport von PrP

3.3.4.1 Stabile exogene Expression von PrP-CD4

PrP-CD4 wurde in MDCK-Zellen transfiziert und Einzelzellklone positiv selektiert. Die Klone wurden lysiert und im Western Blot auf eine Expression überprüft. Für die Untersuchung des polarisierten Transportes wurden zwei verschieden stabil exogen exprimierende Einzelzellklone ausgewählt (vgl. Abbildung 26).

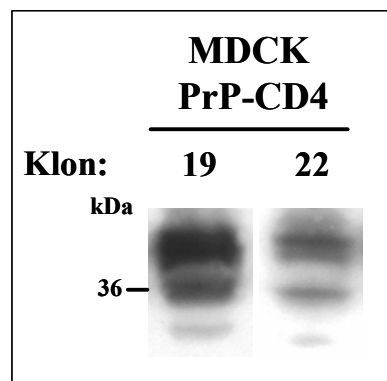


Abbildung 26: Expressionsstärke zweier stabil transfizierter PrP-CD4 MDCK-Einzelzellklone.

Gesamtproteinlysate von MDCK-Zellen mit stabiler exogener PrP-CD4 Expression wurden mittels 12 % SDS-PAGE getrennt und mit dem 3F4 AK detektiert. Um die Expressionsstärken der Klone miteinander vergleichen zu können, wurden von der Gesamtproteinmenge der Lysate jeweils 30µg Protein auf das Gel aufgetragen.

Die Detektion der Proteinbanden im Western Blot zeigt ein Molekulargewicht für PrP-CD4 von ca. 40-42 kDa. Dieser Unterschied zu PrP/3F4 ist durch den wesentlich größeren CD4-Transmembran-Anker, im Gegensatz zum GPI-Anker, zu erklären.

3.3.4.2 Basolateraler Transport von PrP mit heterologer Membranverankerung

Die Untersuchung des polarisierten Transportes von PrP-CD4 sollte zeigen, ob PrP mit einem heterologen Membrananker, aber ohne GPI-Verankerung, trotzdem basolateral transportiert wird.

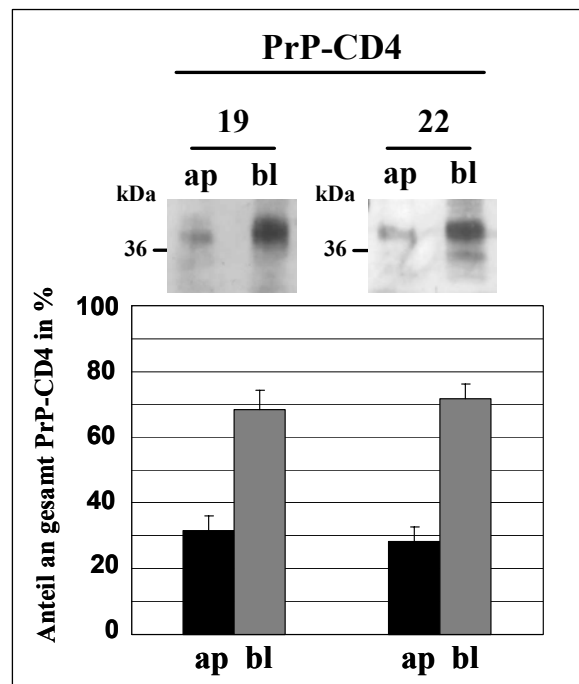


Abbildung 27: Quantitative Analyse des polarisierten Transports von PrP-CD4 in MDCK-Zellen.

MDCK-Zellen mit verschieden stabiler exogener Expression von PrP-CD4 (vgl. Abbildung 26) wurden 5 Tage auf Filtern mit 24 mm Durchmesser kultiviert und, wie in Abbildung 21 beschrieben, analysiert.

Die Auftrennung der biotinylierten Proteine im Western Blot ergab einen ähnlichen Intensitätsunterschied von apikalen und basolateralen Proteinbanden, wie er für PrP/3F4 zu erkennen war. Die Quantifizierung der detektierten Banden ergab einen Transport von PrP-CD4 zur basolateralen Plasmamembran in einem prozentualen Verhältnis von ca. 25:75. Dies war ein erster Anhaltspunkt dafür, dass die basolaterale Sortierung von PrP unabhängig ist von dessen GPI-Verankerung. Die Notwendigkeit einer Membranverankerung *per se* konnte allerdings durch dieses Ergebnis nicht ausgeschlossen werden. Da außerdem für die CD4-Transmembrandomäne nicht bekannt war, ob diese nicht selbst ein verdecktes basolaterales Sortierungssignal beinhaltet, musste die Unabhängigkeit von Membran- bzw. GPI-Verankerung für die basolaterale Sortierung von PrP verifiziert werden.

3.3.5 Komplexe Glykosylierung und Membranverankerung ohne Einfluss auf den basolaterale Transport von PrP

In verschiedenen früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass lösliche Proteine in polarisierten Zellen auch einem gerichteten Transport zu einer der beiden Zellmembranen unterliegen können und dort selektiv ins Zellkulturmedium sekretiert werden (Gottlieb et al., 1986; Haass et al., 1994; De Strooper et al., 1995).

Für das PrP-CD4 Konstrukt konnte zwar, wie für PrP/3F4, eine vornehmlich basolaterale Lokalisation nachgewiesen werden; dieses Ergebnis ließ aber aus den in Kap. 3.3.4.2 genannten Gründen nicht zwangsläufig den Schluss zu, dass die Membranverankerung und vor allem der GPI-Anker auf die basolaterale Lokalisation von PrP keinen Einfluss nimmt. Um die Unabhängigkeit des basolateralen Transportes von einer Membranverankerung zu untersuchen, wurde der polarisierte Transport der Mutanten PrPmtGPI und PrP-M204S analysiert (vgl. 3.3.2 und 3.3.3).

3.3.5.1 Stabile exogene Expression von mtGPI und M204S

Um die polarisierte Sekretion in das Kulturmedium zu untersuchen, wurden die beiden Konstrukte in MDCK-Zellen transfiziert und Einzelzellklone positiv selektiert. Die Einzelzellklone wurden lysiert, Gesamtproteinlysate angefertigt und die Proben in einem 12 % SDS-Gel aufgetrennt. Im Western Blot wurden die Klone auf eine Expression der Proteine ausgesucht (Abbildung 28, Lysate). Es wurden jeweils zwei verschieden stabil exogen exprimierende Klone ausgewählt, bei denen auf eine Sekretion der Proteine in das Zellkulturmedium getestet wurde (Abbildung 28, Medium).

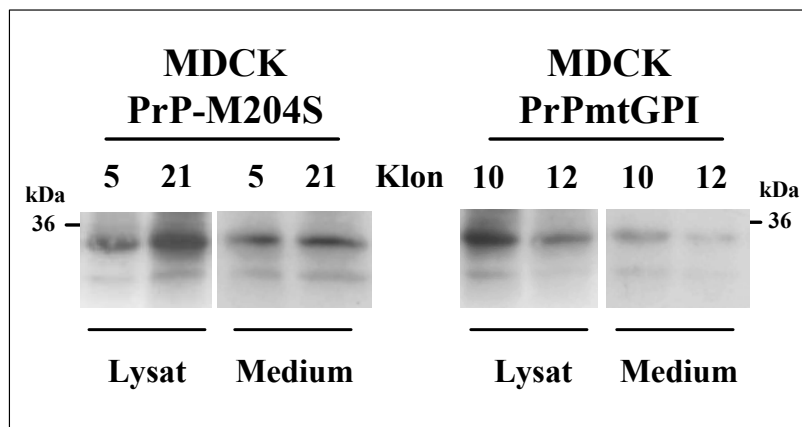


Abbildung 28: Expressionsstärke zweier stabil transfizierter PrP-mtGPI bzw. PrP-M204S MDCK-Einzelzellklone.

Gesamtproteinlysate von MDCK-Zellen mit exogener PrPmtGPI oder PrP-M204S Expression wurden mittels 12 % SDS-PAGE getrennt und im Western Blot mit dem 3F4 AK detektiert (Lysat). Um die Expressionsstärken der Klone miteinander vergleichen zu können, wurden von der Gesamtproteinmenge der Lysate jeweils 30µg Protein auf das Gel aufgetragen. Um sekretorische Proteine nachzuweisen, wurden MDCK-Zellen mit stabiler exogener PrPmtGPI oder PrP-M204S Expression 3 h bei 37°C in MEM inkubiert. Die Proteine wurden anschließend aus dem Überstand mit TCA gefällt (Medium) und im Western Blot mit dem 3F4 AK analysiert.

3.3.5.2 Basolaterale Sekretion von PrP-M204S und PrPmtGPI

Die ausgewählten Einzelzellklone wurden für den Nachweis einer polarisierten Sekretion auf Filtern kultiviert. Das Medium aus den apikalen und basolateralen Kammern der Filter wurde getrennt gesammelt, die Proteine aus dem Überstand präzipitiert und im Western Blot analysiert.

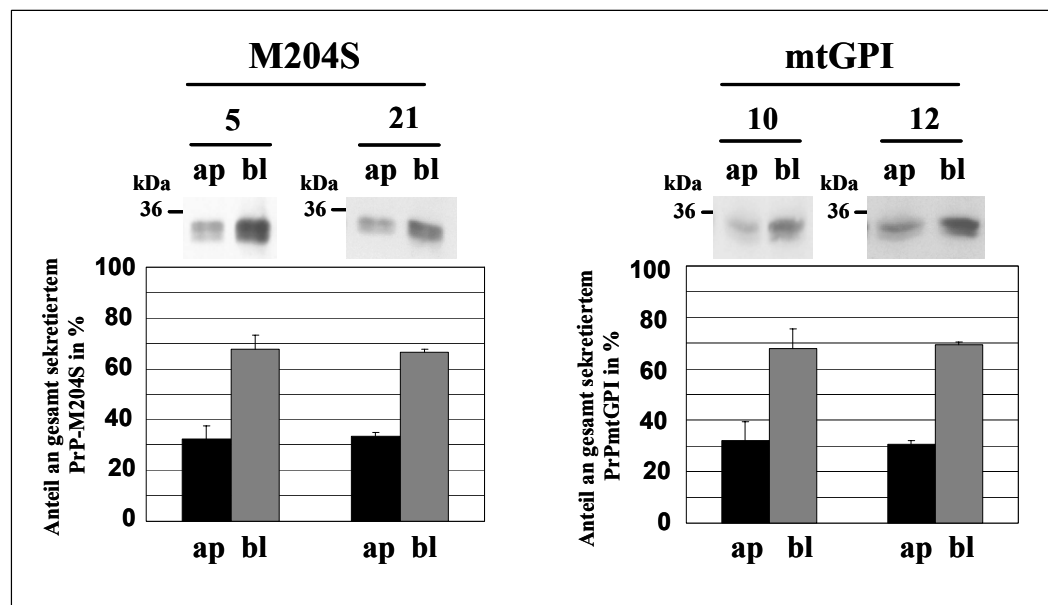


Abbildung 29: Quantitative Analyse der polarisierten Sekretion von MDCK PrPmtGPI und PrP-M204S.

MDCK-Zellen mit verschiedener stabiler exogener Expression von PrPmtGPI und PrP-M204S (vgl. Abbildung 28) wurden 5 Tage auf Filtern mit 24 mm Durchmesser kultiviert. Das in den apikalen (ap=apikal) bzw. basolateralen (bl=basolateral) Kammern der Filter befindliche Medium wurde getrennt abgenommen und die sekretierten Proteine aus diesem Überstand mit dem 3F4 AK immunpräzipitiert. Die immunpräzipitierten Proteine wurden mittels 12 % SDS-PAGE getrennt und im Western Blot mit AK 3F4 nachgewiesen. Es sind für alle Einzelzellklone die Mittelwerte aus sechs unabhängigen Experimenten angegeben mit Standardabweichung. Die Gesamt-Proteinmenge an PrPmtGPI bzw. PrP-M204S, die jeweils aus den apikalen und basolateralen Überständen eines Filters immunpräzipitiert werden konnte, wurde als 100 % festgelegt. Davon ausgehend wurde der prozentuale Anteil der in die jeweiligen Medien sekretierten Proteine errechnet.

Bei beiden PrP-Mutanten konnte anhand der Intensität der Proteinbanden im Western Blot vermutet werden, dass sie hauptsächlich von der basolateralen Plasmamembran in das Zellkulturmedium sekretiert werden. Diese Beobachtung bestätigte die anschließende Quantifizierung. PrP-M204S und PrPmtGPI wurden mit einem Verteilungsverhältnis von ca. 30:70 in das basolaterale Medium sekretiert. Weder PrPmtGPI noch PrP-M204S besitzen eine komplexe Glykosylierung oder einen funktionalen GPI-Anker, unterliegen aber trotzdem einem basolateralen Sortierungsmechanismus in der Zelle.

Zusammenfassend kann daher festgestellt werden: Die Untersuchung dieser Mannose-reich glykosylierten, ohne funktionalen Membrananker sekretierten PrP-Mutanten ergibt in Kombination mit den Ergebnissen aus 3.3.4.2, dass für den basolateralen Transport von PrP weder eine komplexe Glykosylierung noch eine GPI- bzw. Membranverankerung nötig ist.

3.4 Expression, Nachweis und polarisierter Transport von Doppel

3.4.1 Schematischer Vergleich der homologen Proteine PrP und Dpl

Wie in Kapitel 3.1.4 dargestellt, werden in der Literatur GPI-Verankerung und komplexe Glykosylierung als apikale Sortierungssignale diskutiert. Aus den bisher gezeigten Ergebnissen kann aber geschlossen werden, dass diese post-translationalen Modifikationen für das Sortierungsverhalten von PrP entweder keine Rolle spielen oder durch ein dominantes basolaterales Sortierungssignal überdeckt werden und somit keinen Einfluss auf den polarisierten Transport von PrP nehmen. Ein weiteres GPI-verankertes und komplex glykosyliertes Protein ist das PrP-homologe Protein Doppel (Dpl).

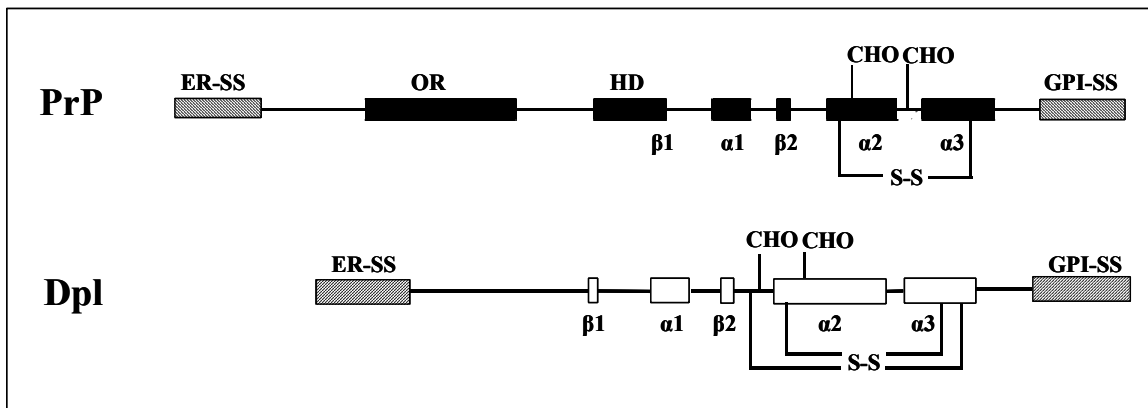


Abbildung 30: Schematischer Vergleich von PrP und Dpl.

ER-SS: ER-Signalsequenz, GPI-SS: GPI-Anker Signalsequenz, OR: Oktarepeat Region; HD: Hydrophobe Domäne, α 1-3: α -Helices, β 1,2: β -Faltblätter, CHO: Glykosylierungsstelle, S-S: Disulfidbrücken. PrP-Domänen sind schwarz, Dpl Domänen sind weiß gekennzeichnet.

Ein Vergleich der beiden Schemata zeigt, dass beide Proteine eine ähnlich strukturierte C-terminale Domäne besitzen. Beide beinhalten in diesem Bereich eine GPI-Anker Signalsequenz, zwei komplexe Glykosylierungen, drei α -helikale Strukturen, zwei β -Faltblattstrukturen und auch Disulfidbrücken. Die N-terminale Domäne der beiden

Proteine unterscheidet sich dagegen stark. Während PrP eine Oktarepeat-Region (OR) und eine Hydrophobe Domäne (HD) enthält, ist die N-terminale Domäne in Dpl wesentlich kürzer und weist keine vergleichbaren Domänen auf. Dpl wird deshalb auch als „N-Terminal verkürztes PrP“ bezeichnet (Tuzi et al., 2002; Behrens, 2003).

Fraglich war nun, ob das PrP-homologe Protein Dpl in polarisierten MDCK-Zellen ebenfalls einem polarisierten Transport unterliegt. Ist die basolaterale Lokalisation von PrP zurückzuführen auf einen Bereich innerhalb der C-terminalen Domäne, könnte Dpl, aufgrund der Homologie zu PrP in diesem Bereich, eine ähnliche polarisierte Verteilung aufweisen. Unterscheidet sich der polarisierte Transport der beiden Proteine, könnte die nicht homologe N-terminale Domäne Grund dafür sein.

3.4.2 Biochemische Charakterisierung von Dpl

In der Literatur wird Dpl als komplex glykosyliertes, an der Zelloberfläche lokalisiertes Protein beschrieben (Silverman et al., 2000). Um diese biochemischen Eigenschaften zu bestätigen, wurden N2a-Zellen transient mit Dpl transfiziert. Für die Detektion stand der polyklonale AK 2234 zur Verfügung, der gegen rekombinantes Dpl hergestellt wurde (Rossi et al., 2001) und auch endogen exprimiertes Dpl erkennt. Da Dpl in neuronalen Zellen allerdings kaum exprimiert wird, ist eine Unterscheidung zwischen endogener und exogener Expression des Proteins nicht nötig (Moore et al., 1999; Silverman et al., 2000). Wie unter Kap. 3.1.2 beschrieben, stellen transiente Transfektionen eine Möglichkeit dar, um innerhalb eines kurzen Zeitraumes eine starke Expression von Proteinen in Zellen zu bekommen. Im Gegensatz zu MDCK-Zellen stellen diese Zellen ein leicht zu transfizierendes System dar. Wie für PrP beschrieben, hängen Faltung und Membranverankerung eng mit der Glykosylierung zusammen. Vor Untersuchung des polarisierten Transportes müssen die verwendeten Konstrukte daher biochemisch untersucht werden, um den möglichen Einfluss einer Fehlfaltung auf den polarisierten Transport zu analysieren. Da die Generierung stabiler Zelllinien einige Zeit in Anspruch nimmt, können mit Hilfe der transienten Transfektion Ergebnisse über die biochemischen Charakterisierungen der Konstrukte schneller erzielt werden. In Kap. 3.1.3 konnte außerdem gezeigt werden, dass für PrP die Maturierung in N2a-Zellen und MDCK-Zellen vergleichbar ist. Für die biochemische Charakterisierung von Dpl wurden transient mit Dpl transfizierte N2a-Zellen mit Endo H inkubiert, um auf das Vorliegen Mannose-reicher Glykosylierungen zu untersuchen. Eine Behandlung mit PNGaseF sollte Aufschluss über komplexe Glykosylierungen geben. Die Lokalisation von Dpl an der Zelloberfläche wurde

untersucht, indem Dpl-exprimierende Zellen extrazellulär mit Trypsin behandelt wurden. Eine spezifische GPI-Verankerung wurde durch Inkubation mit PIPLC analysiert.

Expression und Löslichkeit von Dpl

Für PrP ist bekannt, dass es bei richtiger Faltung in dem Detergenzpuffer Triton X-100/DOC löslich ist. Bei einem höheren β -Faltblattanteil ist das Protein fehlgefaltet und wird in dem Lysepuffer unlöslich. Da Dpl ein PrP-homologes Protein ist, sollte zunächst untersucht werden, ob das Protein bei richtiger Faltung ebenfalls in dem Detergenzpuffer löslich ist. Transient mit Dpl transfizierte N2a-Zellen wurden dazu lysiert, die Proben im 12 % SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot nachgewiesen.

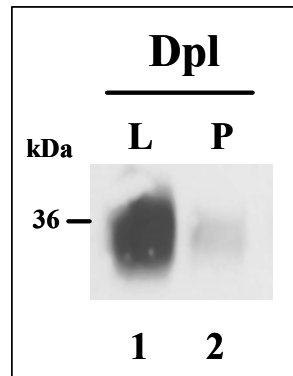


Abbildung 31: Expression und Löslichkeit von Dpl.

Dpl wurde transient in N2a-Zellen exprimiert. Die Zellen wurden geerntet und lysiert. Nach Zentrifugation wurde der Lysat (L) und das Pellet (P) getrennt auf ein 12 % SDS-PAGE Gel aufgetragen und im Western Blot mit dem AK 2234 detektiert.

In Abbildung 31 (vgl. Spur 1) ist zu erkennen, dass nach Herstellung des Gesamtproteinlysates Dpl hauptsächlich im Lysat nachgewiesen werden konnte. Es konnte eine heterogene Proteinbande von ca. 32-40 kDa detektiert werden. Das Protein war in dem Detergenzpuffer Triton X-100/DOC fast vollständig löslich. Im Pellet dagegen war das Protein kaum detektierbar (vgl. Abbildung 31, Spur 2). Dies lässt vermuten, dass die Löslichkeit von Dpl in diesem Detergenz, ähnlich wie für PrP, einen Anhaltspunkt für eine richtige Faltung des Proteins gibt (Lu et al., 2000; Silverman et al., 2000).

Glykosylierungsstatus und Oberflächenexpression von Dpl

Dpl wird in der Literatur als komplex glykosyliertes, GPI-verankertes Protein beschrieben. Um die Glykosylierung nachzuweisen, wurden transient mit Dpl transfizierte N2a-Zellen lysiert und entweder mit Endo H oder NGlyF behandelt.

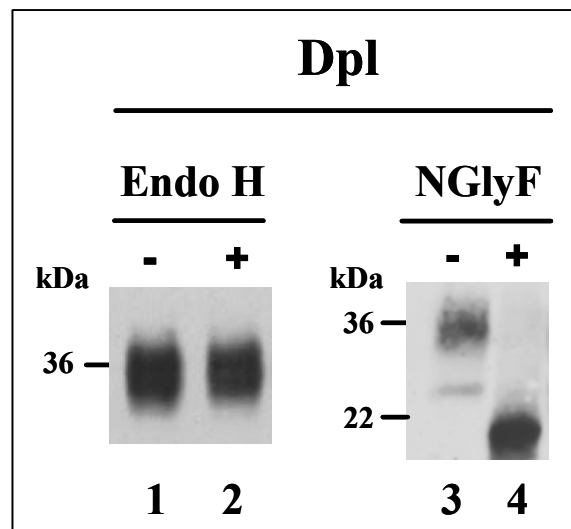


Abbildung 32: Dpl ist ein komplex glykosyliertes Protein.

Transient mit Dpl transfizierte N2a-Zellen wurden mit Endo H (+) oder NGlyF (+/-) inkubiert oder als Kontrolle unbehandelt gelassen (Endo H -; NGlyF -). Nach Auftrennung der Proteine durch 12 % SDS-PAGE wurden diese mit dem 2234 AK im Western Blot detektiert.

Wie in Abbildung 32 zu erkennen, ist Dpl resistent gegenüber einer Behandlung mit Endo H. Die elektrophoretische Mobilität der detektierten Proteinbande veränderte sich durch eine Inkubation mit dem Enzym nicht. Daraus kann man schließen, dass keine Mannose-reichen Glykosylierungen in dem Protein vorliegen (vgl. Abbildung 32, Spur 2). Nach Inkubation mit NGlyF konnte eine Proteinbande von ca. 18-20 kDa detektiert werden (vgl. Abbildung 32, Spur 4). Dies zeigt, dass hier das Enzym komplexe Zucker abspalten konnte. Die in Abbildung 32, Spur 3 detektierte Bande bei ca. 25 kDa ist wahrscheinlich auf monoglykosyliertes Dpl zurückzuführen, die aber ebenfalls durch Behandlung mit NGlyF vollständig deglykosyliert werden konnte. Diese Ergebnisse bestätigen die in der Literatur beschriebene komplexe Glykosylierung von Dpl.

Um die Expression von Dpl an der Zelloberfläche nachzuweisen, wurden transient mit Dpl transfizierte N2a-Zellen extrazellulär mit Trypsin behandelt. Eine spezifische GPI-Verankerung sollte durch eine Inkubation mit PIPLC analysiert werden.

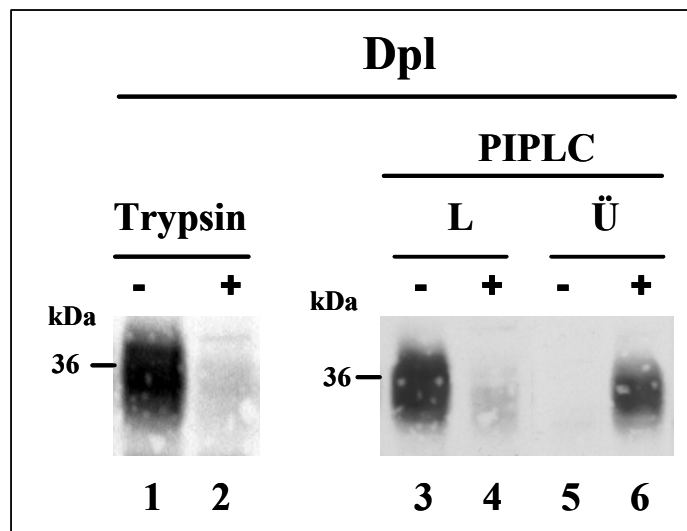


Abbildung 33: Dpl wird als GPI-verankertes Protein auf der Zelloberfläche exprimiert.

Transient mit Dpl transfizierte N2a-Zellen wurden mit Trypsin inkubiert (Trypsin +) oder zur Kontrolle unbehandelt gelassen (Trypsin -). Die nach Zellyse verbleibenden Proteine wurden mittels Western Blot mit dem 2234 AK nachgewiesen. Eine spezifische GPI-Verankerung wurde nachgewiesen, indem transient mit Dpl transfizierte N2a-Zellen bei 4°C mit PIPLC inkubiert (PIPLC +) oder zur Kontrolle unbehandelt gelassen (PIPLC -) wurden. Anschließend wurden die Zellysate (L) und die Überstände (Ü) in einem Western Blot mit dem 2234 AK auf Dpl untersucht.

Durch Trypsin konnte das Protein auf der Zelloberfläche hydrolysiert werden und war deshalb im Western Blot kaum noch nachzuweisen (vgl. Abbildung 33, Spur 2). Eine spezifische GPI-Verankerung von Dpl auf der Zellmembran wurde durch eine Behandlung mit PIPLC analysiert. In den ohne PIPLC behandelten Proben war Dpl im Lysat detektierbar (vgl. Abbildung 33, Spur 3). Inkubation mit PIPLC führte dagegen zur Spaltung des GPI-Ankers, und das Protein war deshalb nicht mehr im Lysat (vgl. Abbildung 33, Spur 4), sondern im Überstand detektierbar (vgl. Abbildung 33, Spur 6).

Diese Ergebnisse bestätigen, dass Dpl als komplex glykosyliertes Protein mit einem GPI-Anker auf der Zelloberfläche lokalisiert ist.

3.4.3 Stabile exogene Expression und Spezifität des 2234 Antikörpers

Für die Charakterisierung des polarisierten Transportes wurden exogen stabil exprimierende Einzelzellklone hergestellt. Eine Dpl-Expression der Einzelzellklone wurde durch Herstellung von Gesamtzelllysaten nachgewiesen (vgl. Abbildung 34, (A)). Für die Untersuchung von Dpl stand der polyklonale AK 2234 zur Verfügung, der gegen rekombinantes Dpl hergestellt wurde (Rossi et al., 2001). Wie für PrP war auch für Dpl nicht bekannt, ob das Protein in MDCK-Zellen endogen exprimiert wird bzw. ob der 2234

AK dieses erkennt oder eventuell mit anderen homologen Proteinen kreuzreagiert. Um dies zu untersuchen, wurden Gesamtproteinlysate aus untransfizierten MDCK-Zellen und MDCK-Zellen mit stabiler exogener Dpl Expression hergestellt (vgl. Abbildung 34, (A), Klon 11).

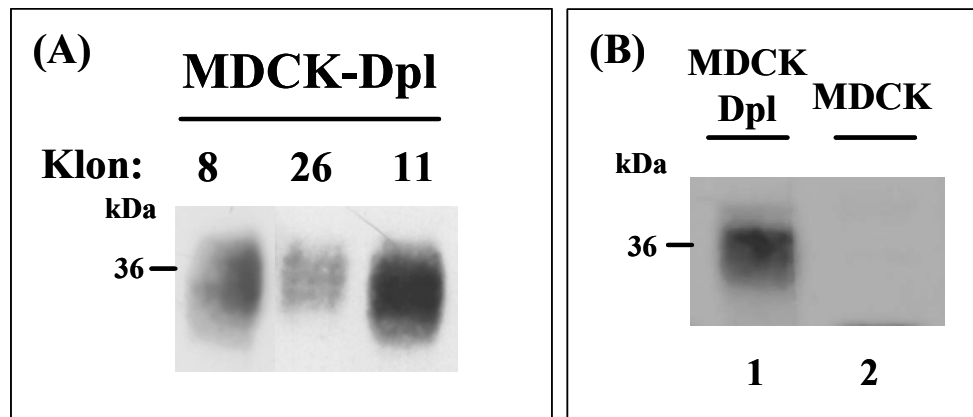


Abbildung 34: Expressionsstärke verschieden stabil exogen Dpl exprimierender MDCK-Einzelzellklone und Spezifität des 2234 AK.

(A) Gesamtproteinlysate von MDCK-Zellen mit stabiler exogener Dpl Expression wurden mittels 12 % SDS-PAGE getrennt und mit dem 2234 AK detektiert. Um die Expressionsstärken der Klone miteinander vergleichen zu können, wurden von der Gesamtproteinmenge der Lysate jeweils 30 µg Protein auf das Gel aufgetragen. (B) Gesamtproteinlysate von untransfizierten MDCK-Zellen und stabil exogen Dpl exprimierende MDCK-Zellen. Die Proben wurden mittels 12 % SDS-PAGE getrennt und im Western Blot mit dem AK 2234 detektiert. Um die Expressionsstärken miteinander vergleichen zu können, wurden jeweils von der Gesamtproteinmenge der Lysate 30 µg Protein auf das Gel aufgetragen.

Wie bei den vorherigen Konstrukten wurden bei der stabilen Expression von Dpl in MDCK-Zellen unterschiedlich exprimierende Einzelzellklone ausgesucht. Die hierbei detektierten Proteinbanden sind spezifisch für die exogen exprimierte Proteine. Dies lässt sich daran erkennen, dass bei den aus untransfizierten MDCK-Zellen hergestellten Lysaten keine Detektion von Dpl mit dem AK 2234 möglich war (vgl. Abbildung 34 (B), Spur 2). Ob Dpl allerdings in MDCK-Zellen endogen exprimiert wird, kann man durch dieses Ergebnis nicht ausschließen. Es ist möglich, dass der 2234 AK dieses nicht erkennt und daher kein Nachweis des Proteins erfolgt.

3.4.4 Unterschiedliche Sortierung von PrP und Dpl in MDCK-Zellen

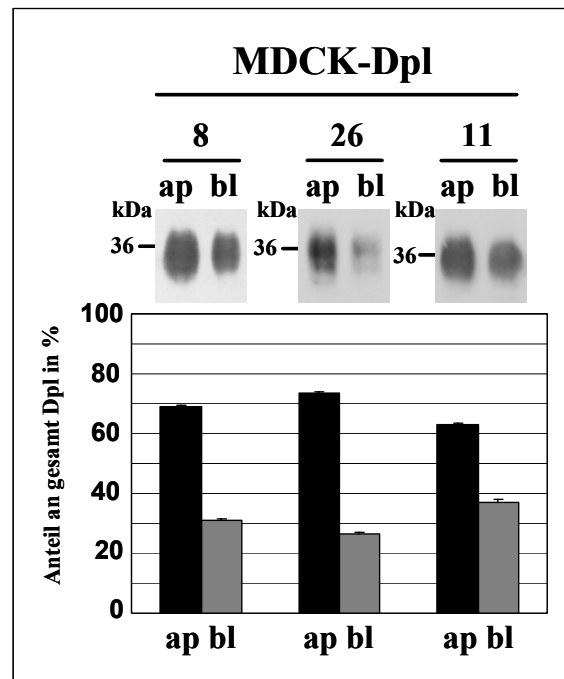


Abbildung 35: Quantitative Analyse des polarisierten Transports von Dpl in MDCK-Zellen.

MDCK-Zellen mit verschieden stabiler exogener Expression von Dpl (vgl. Abbildung 34 (A)) wurden auf Filtern mit 24 mm Durchmesser kultiviert und, wie in Abbildung 21 beschrieben, analysiert. Für die drei Einzelzellklone sind jeweils die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung angegeben.

Die Biotinylierung von Dpl ließ eine Tendenz zu einer apikalen Verteilung des Proteins erkennen. Die Bandenintensität der apikal biotinylierten Proteine war nach Auftrennung und Detektion der Proben im Western Blot stärker als die Banden der basolateral biotinylierten Proteine. Die Quantifizierung dieser Proteinbanden bestätigte einen polarisierten Transport von Dpl vornehmlich zur apikalen Plasmamembran in einem Verhältnis von ca. 70:30. Auch hier ist erkennbar, dass das Ausmaß eines polarisierten Transports unter anderem abhängig ist von der Stärke der exogenen Proteinexpression. Stärker exprimierende Klone zeigen einen prozentual geringeren Unterschied im Verteilungsverhältnis zwischen apikal und basolateral als schwächer exprimierende Einzelzellklone (vgl. Abbildung 34, Klon 11 bzw. Klon 8 und 26). Die Untersuchung der polarisierten Sortierung von Dpl zeigt, dass das Protein nicht wie PrP vornehmlich auf der basolateralen Plasmamembran lokalisiert ist, sondern in polarisierten MDCK-Zellen einem apikalen Transport unterliegt. Es entspricht dem in der Literatur für GPI-verankerte bzw. komplex glykosylierte Proteine beschriebenen Sortierungsverhalten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen: PrP und Dpl sind homologe Proteine aufgrund ähnlicher Strukturen in ihren C-terminalen Domänen. Trotz dieser Homologie weisen die Proteine eine unterschiedliche Verteilung auf den beiden polarisierten Membranseiten auf. Das unterschiedliche Transportverhalten von Dpl zeigt daher, dass die C-terminale Domäne von PrP anscheinend auf dessen basolaterales Sortierungsverhalten keinen Einfluss hat. Das basolaterale Sortierungsverhalten von PrP kann deshalb in der zu Dpl unterschiedlichen N-terminalen Domäne begründet sein.

3.5 Identifizierung des basolateralen Sortierungssignals

Für PrP und sein homologes Protein Dpl konnte gezeigt werden, dass ein unterschiedliches Sortierungsverhalten in MDCK-Zellen vorliegt. Es stellte sich nun die Frage, welche der im PrP vorkommenden Domänen oder post-translationalen Modifikationen für das basolaterale Verteilungsmuster von PrP verantwortlich sind, die bei einem polarisierten Transport von Dpl nicht zum Tragen kommen oder im Molekül nicht vorhanden sind. Die Identifizierung einer Domäne als Sortierungssignal für einen polarisierten Transport kann mit unterschiedlichen Methoden erfolgen. Die Einführung von Punktmutationen in die entsprechende Domäne oder deren Deletion kann zu einer Inaktivierung des Signals führen und dadurch in einer falschen Sortierung des Proteins resultieren (Brewer and Roth, 1991; Le Bivic et al., 1991). Durch Übertragung der Domäne auf ein anderes Protein (*domain swapping*) erhält man allerdings den aussagekräftigsten Beweis für das Vorliegen eines Sortierungssignals. Bei dieser Methode wird der zu untersuchende Bereich in die AS-Sequenz eines anderen Proteins integriert. Dieses Protein wird ohne die entsprechende Domäne normalerweise nicht oder zu der jeweilig anderen Plasmamembranseite polarisierter Zellen sortiert. Wenn der übertragene Bereich ein dominantes Sortierungssignal enthält, wird die Sortierungseigenschaft der hergestellten Chimäre bestimmt durch die artifiziell eingefügte Domäne (Lisanti and Rodriguez-Boulan, 1990; Hunziker et al., 1991).

Bei dem schematischen Vergleich von PrP und Dpl in 3.4.1 war erkennbar, dass nur einige der im PrP vorkommenden Domänen und Modifikationen auch in Dpl vorkommen. Im Gegensatz zu der sehr ähnlichen C-terminalen Domäne der beiden Proteine unterscheiden sich die beiden Proteine in der N-terminalen Domäne stark. Im Gegensatz zu der N-terminalen Domäne von PrP ist die N-terminale Domäne von Dpl sehr viel kürzer. Es fehlen Domänen, die mit der Oktarepeatregion oder der Hydrophoben Domäne von PrP vergleichbar sind. Da die Homologie der C-terminalen Domänen von PrP und Dpl nicht zu

einem ähnlichen Transport führten (vgl. 3.4.4), sollte die für den basolateralen Transport von PrP verantwortliche Domäne in der sich von Dpl unterscheidenden N-terminalen Domäne lokalisiert sein.

3.5.1 Die N-terminale Domäne von PrP beinhaltet ein basolaterales Sortierungssignal

Die homologen Proteine PrP und Dpl unterscheiden sich vor allem in ihrer N-terminalen Domäne. Diese könnte daher auch der Grund für die unterschiedliche Sortierung der beiden Proteine sein. Um dies genauer zu untersuchen, wurden zunächst Chimären hergestellt, bei denen die N-terminale Domäne (AS 1-133, Maus-PrP) einschließlich ER-Signalsequenz, Oktarepeatregion und Hydrophoben Domäne des basolateral sortierten PrP mit der C-terminalen Domäne (AS 54-179, Maus-Dpl) des apikal transportierten Dpl fusioniert wurden (vgl. Abbildung 36). Das Vorliegen eines dominanten basolateralen Sortierungssignals innerhalb der N-terminalen Domäne von PrP sollte dann zu einem Fehltransport von Dpl führen. Da die PrP-N/Dpl Chimäre die AS 1-133 von PrP enthalten, war eine Detektion durch den 3F4 AK (vgl. Kap. 3.1.1) möglich.

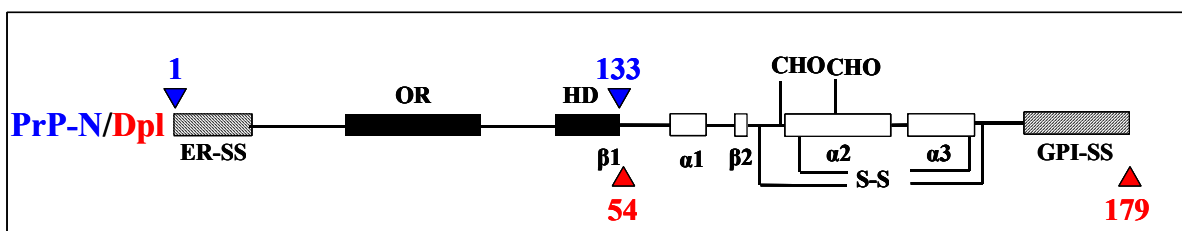


Abbildung 36: Schematische Darstellung der PrP-N/Dpl Chimäre.

ER-SS: ER-Signalsequenz, GPI-SS: GPI-Anker Signalsequenz, OR: Oktarepeat Region; HD: Hydrophobe Domäne, α 1-3: α -Helices, β 1,2: β -Faltblätter, CHO: Glykosylierungsstelle, S-S: Disulfidbrücken. Domänen aus PrP sind schwarz gekennzeichnet, Domänen aus Dpl weiß. Die Nummerierung gibt jeweils die erste und letzte AS der fusionierten PrP N-terminalen bzw. Dpl C-terminalen Domänen (PrP blau; Dpl rot) wieder.

3.5.1.1 Biochemische Charakterisierung von PrP-N/Dpl

Expression und Löslichkeit von PrP-N/Dpl

Für PrP und Dpl war aus den vorausgehenden Untersuchungen bekannt, dass bei korrekter Faltung und Maturierung die Proteine in dem Detergenzpuffer Triton X-100/DOC löslich sind und fast ausschließlich in der Fraktion des Überstandes nachweisbar sind (Abbildung 18 und Abbildung 31). Für PrP ist außerdem bekannt, dass bei Fehlfaltung das Protein unlöslich und hauptsächlich im Pellet des Zellysats detektierbar ist. Zunächst wurde daher

die Expression der Chimäre und deren Löslichkeit in dem Detergenzpuffer untersucht. N2a-Zellen wurden transient mit PrP-N/Dpl transfiziert, die Proteine nach Herstellung eines Gesamtproteinlysats in einem 12 % SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit dem 3F4 AK nachgewiesen.

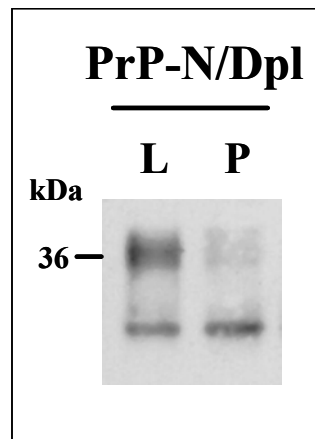


Abbildung 37: Expression von PrP-N/Dpl im Gesamtproteinlysats.

Transient mit PrP-N/Dpl transfizierte N2a-Zellen wurden geerntet und lysiert. Nach Zentrifugation wurden das Lysat (L) und das Pellet (P) getrennt auf ein 12 % SDS-PAGE Gel aufgetragen und im Western Blot mit dem 3F4 AK detektiert.

Abbildung 37 zeigt, dass zwei Proteinbanden im Western Blot detektiert werden konnten. Eine Bande läuft bei ca. 36-38 kDa, die andere bei ca. 30-32 kDa. Der Teil des Proteins, der eine langsamere elektrophoretische Mobilität aufweist, war in dem Detergenzpuffer löslich und zum größten Teil im Überstand nachweisbar. Der andere Teil war dagegen zu einem großen Teil auch im Pellet detektierbar. Das Ergebnis dieses Löslichkeitsassays ließ vermuten, dass die PrP-N/Dpl Chimäre in zwei verschiedenen Formen exprimiert werden, die sich in ihrer Löslichkeit und dadurch in ihrer Proteinfaltung unterscheiden.

Glykosylierungsstatus und Oberflächenexpression von PrP-N/Dpl

Das Löslichkeitsassay gab Grund zur Annahme, dass ein großer Anteil des Proteins im sekretorischen Weg einer korrekten Faltung unterliegt. Um die Chimäre weiter mit PrP und Dpl vergleichen zu können, wurde der Glykosylierungsstatus untersucht und auf eine Lokalisation des Proteins auf der Zelloberfläche überprüft. Hierzu wurden mit PrP-N/Dpl transient transfizierte N2a Zellen entweder mit Endo H, PNGase F oder Trypsin behandelt.

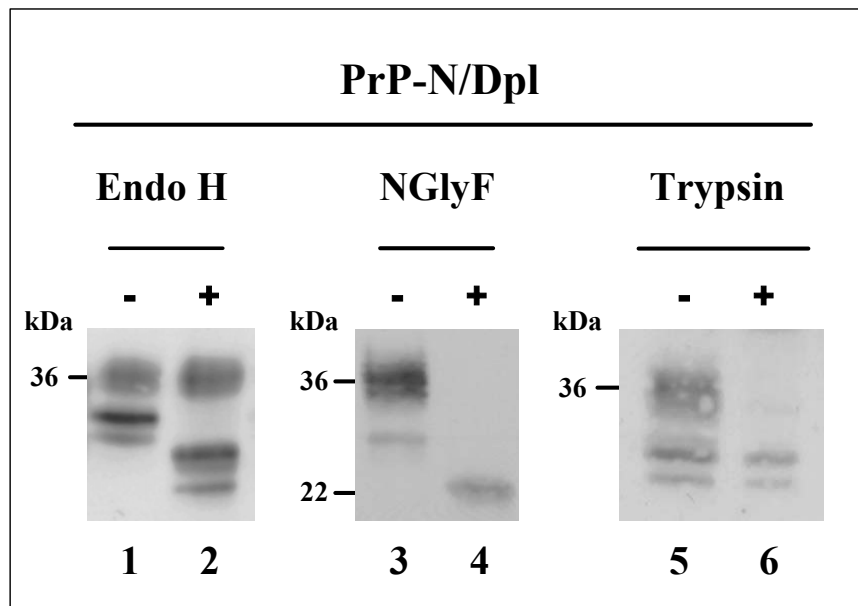


Abbildung 38: PrP-N/Dpl ist zum größten Teil komplex glykosyliert und an der Zelloberfläche lokalisiert.

Für die Untersuchung des Glykosylierungsstatus wurden N2a-Zellen transient mit PrP-N/Dpl transfiziert. Zelllysate wurden mit Endo H bzw. NGlyF (Endo H + / NGlyF +) inkubiert oder unbehandelt gelassen (Endo H - / NGlyF -). Um auf an der Oberfläche exprimiertes PrP-N/Dpl zu untersuchen, wurden transient transfizierte N2a-Zellen mit oder ohne Trypsin behandelt (+/- Trypsin) und ein Gesamtproteinlysate hergestellt. Die Proben wurden mittels 12 % SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit dem 3F4 AK analysiert.

Der im Löslichkeitsassay hauptsächlich im Überstand nachgewiesene Teil der PrP-N/Dpl Chimäre war resistent gegenüber einer Inkubation mit Endo H (Abbildung 38, Spur 1 und 2), liegt also nach seiner Synthese im ER durch Modifizierung der N-Glykosylierung als komplex glykosyliertes Protein vor. Der Proteinanteil, der in Abbildung 37 hauptsächlich im Pellet detektierbar war, wurde dagegen von Endo H gespalten. Es liegen also nicht komplexe, Mannose-reiche Glykane vor. Um zu zeigen, dass die mit Endo H nicht spaltbaren Oligosaccharide im Golgi-Apparat modifiziert wurden, wurde eine Inkubation mit N-GlyF durchgeführt. Nach Behandlung mit diesem Enzym war ausschließlich eine Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 22 kDa nachweisbar, die die deglykosylierte Form des Proteins repräsentiert (Abbildung 38, Spur 4).

Bei der Überprüfung auf eine Oberflächenlokalisierung der PrP-N/Dpl Chimäre ließ sich deutlich erkennen, dass der Endo H resistente Anteil des Proteins durch die extrazelluläre Inkubation mit Trypsin entfernt werden konnte und nicht mehr auf dem Blot detektierbar war (Abbildung 38, Probe 6). Der Endo H sensitive Proteinanteil wurde dagegen durch die Inkubation mit Trypsin nicht beeinflusst. Dieser Teil des Proteins konnte auch nach einer Behandlung mit Trypsin im Western Blot detektiert werden (Abbildung 38, Probe 6). Wie

bei der Untersuchung der Löslichkeit und des Glykosylierungsstatus konnten für das Protein wiederum zwei Formen nachgewiesen werden.

Eine korrekte Faltung von PrP ist abhängig von dem Glykosylierungsstatus und einer Membranverankerung (vgl. 3.1.3). Fehlgefaltetes PrP ist meist unvollständig oder gar nicht glykosyliert. Es ist wahrscheinlich, dass der kleinere PrP-N/Dpl Proteinanteil im ER eine *Core*-Glykosylierung erhält, durch eine fehlerhafte Faltung die Übertragung des GPI-Ankers aber nicht erfolgt und das Protein deshalb nicht komplex glykosyliert wird. Es konnte für nicht komplex glykosylierte Proteine ohne funktionalen Membrananker gezeigt werden, dass diese ins Zellkulturmedium sekretiert werden oder im Zytosol akkumulieren (Rogers et al., 1990; Winklhofer et al., 2003b). Bei der biochemischen Untersuchung der PrP-N/Dpl Chimäre konnte gezeigt werden, dass ein Proteinanteil nicht komplex glykosyliert ist und auch an der Zelloberfläche nicht nachgewiesen werden konnte. Es war daher möglich, dass dieser Teil der PrP-N/Dpl Chimäre in das Zellkulturmedium sekretiert wird. Dies wurde überprüft, indem konditioniertes Medium gesammelt und sekretorische Proteine aus diesem Überstand immunpräzipitiert wurden. Nach Auftrennung der Proben im 12 % SDS-Gel wurde mit dem 3F4 AK auf PrP-N/Dpl untersucht.

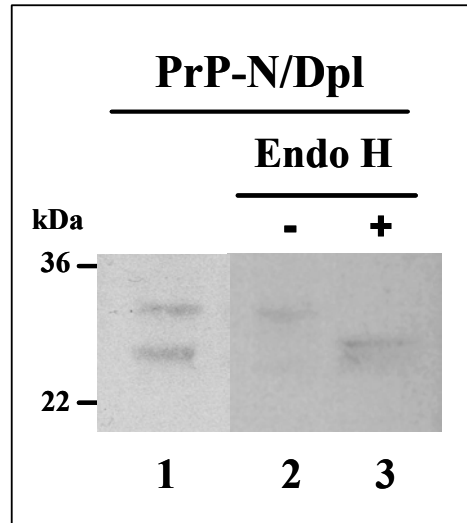


Abbildung 39: PrP-N/Dpl Chimäre mit einer *high-mannose* Glykosylierung werden in das Zellkulturmedium sekretiert.

Um sekretorische Proteine nachzuweisen, wurden transient mit PrP-N/Dpl transfizierte N2a-Zellen 3 Stunden in MEM inkubiert und anschließend mit dem 3B5 AK, gerichtet gegen die Oktarepeatregion, präzipitiert. Für die Untersuchung des Glykosylierungszustandes wurde ein Teil der immunpräzipitierten Proteine mit Endo H behandelt (+), der andere als Kontrolle unbehandelt gelassen (-).

In Abbildung 39, Spur 1 sind zwei Proteinbanden bei ca. 30 und 25 kDa detektierbar, die aus dem Medium immunpräzipitiert werden konnten. Diese waren bei den Inkubationen

mit Endo H und NGlyF zuvor schon erkennbar und waren sensitiv gegenüber einer Inkubation mit Endo H (Abbildung 39, Spur 3). Bei der Synthese im ER liegt ein Teil von PrP-N/Dpl wahrscheinlich fehlgefaltet vor und erhält daher keinen funktionalen GPI-Anker. Dies hat zur Folge, dass die Mannose-reichen Glykane nicht in komplexe Glykane umgewandelt werden. Durch den fehlenden Membrananker wird dieser Proteinanteil daher mit Mannose-reichen Glykanen in das Zellkulturmedium sekretiert.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden: die PrP-N/Dpl Chimäre kommen in zwei Formen vor. Der Proteinanteil mit dem kleineren Molekulargewicht wird mit Mannose-reichen Glykanen ohne funktionalen Membrananker in das Zellkulturmedium sekretiert. Der andere Teil des Proteins wird dagegen komplex glykosyliert und ist an der Zelloberfläche lokalisiert. Da bei der Biotinylierung nur Proteine nachgewiesen werden, die auf der Plasmamembran der Zelle lokalisiert sind, wird die Untersuchung des polarisierten Transports durch diesen Proteinanteil nicht beeinflusst.

3.5.1.2 Stabile exogene Expression von PrP-N/Dpl

Um den polarisierten Transport von PrP-N/Dpl zu untersuchen, wurden MDCK-Zellen stabil transfiziert und die selektierten Klone auf eine Expression überprüft. Es wurden zwei verschieden exprimierende Einzelzellklone für die Analyse ausgewählt.

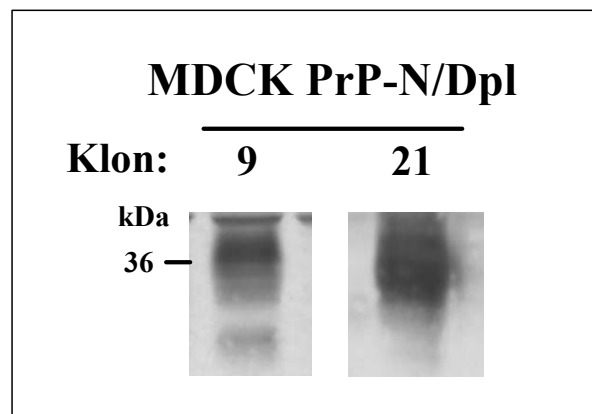


Abbildung 40: Stabile exogene Expression zweier PrP-N/Dpl MDCK-Einzelzellklone.

Gesamtproteinlysate von MDCK-Zellen mit stabiler exogener PrP-N/Dpl Expression wurden mittels 12 % SDS-PAGE getrennt und mit dem 3F4 AK detektiert. Um die Expressionsstärken miteinander vergleichen zu können, wurden von der Gesamtproteinmenge der Lysate jeweils 30µg Protein auf das Gel aufgetragen.

3.5.1.3 Dpl mit N-terminaler Domäne von PrP wird basolateral transportiert

Die Übertragung der N-terminalen Domäne (AS 1-133) von PrP auf das eigentlich apikal sortierte Dpl sollte zeigen, ob diese Domäne ausreicht, um eine Fehlsortierung von Dpl zu vermitteln. Ein basolateraler Transport der PrP-N/Dpl Chimäre würde zeigen, dass die N-terminale Domäne, in der sich die beiden homologen Proteine am stärksten unterscheiden, verantwortlich ist für deren unterschiedliches Sortierungsverhalten.

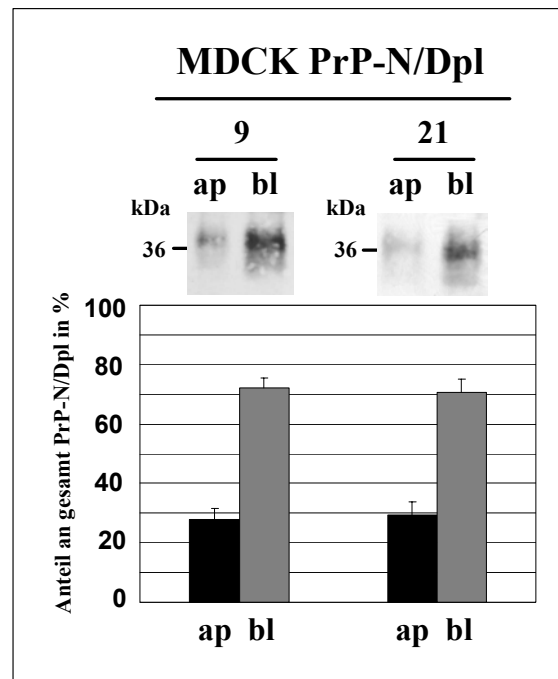


Abbildung 41: Quantitative Analyse des polarisierten Transports von PrP-N/Dpl in MDCK-Zellen.

MDCK-Zellen mit verschieden starker stabiler exogener Expression von PrP-N/Dpl (vgl. Abbildung 40) wurden 5 Tage auf Filtern mit 24 mm Durchmesser kultiviert und, wie in Abbildung 21 beschrieben, analysiert. Für die beiden untersuchten Einzelzellklone sind jeweils Mittelwerte mit Standardabweichung aus fünf unabhängigen Experimenten angegeben.

Die qualitative Auswertung des Western Blots ließ erkennen, dass ein basolateraler Transport der Chimäre vorliegt. Die Proteinbanden der basolateral biotinylierten Proteine waren im Vergleich mit den apikal biotinylierten Banden stärker. Die Quantifizierung ergab, dass beide untersuchten PrP-N/Dpl Einzelzellklone in einem Verhältnis von ca. 25:75 zu der basolateralen Zelloberfläche transportiert wurden. Der polarisierte Transport der PrP-N/Dpl Chimäre ist daher mit dem von PrP und nicht mit dem von Dpl vergleichbar.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die auf Dpl übertragene N-terminale Domäne von PrP ausreichte, um das eigentlich apikal sortierte Dpl zur basolateralen Zelloberfläche fehlzuleiten.

3.5.2 Die Hydrophobe Domäne als basolaterales Sortierungssignal

Durch die Untersuchung von PrP-N/Dpl konnte gezeigt werden, dass die Übertragung des N-terminalen Bereichs (Aminosäure 1-133) von PrP es dem eigentlich apikal sortierten Dpl ermöglichte, auf die basolaterale Zelloberfläche polarisierter Zellen transportiert zu werden. Dieses Ergebnis ließ den Schluss zu, dass die N-terminale Domäne von PrP eine für den basolateralen Transport von PrP essentielle Domäne enthält. Es stellte sich die Frage, welcher Bereich innerhalb der N-terminalen Domäne von PrP für diesen basolateralen Transport verantwortlich ist. Als mögliches Sortierungssignal kamen insbesondere die Oktarepeatregion und die Hydrophobe Domäne in Frage. Eine für den polarisierten Transport interessante Domäne ist die HD. Für diese konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass PrP-Mutanten mit deletierter N-terminaler Domäne, einschließlich der HD, aber auch Mutanten mit Mutationen in der HD, Neurodegeneration auslösen (Hegde et al., 1998; Shmerling et al., 1998). Es konnte in diesen Untersuchungen gezeigt werden, dass das toxische Potential von PrP mit der Integrität dieser Domäne zusammenhängt. Es sollte daher untersucht werden, ob diese Domäne auch einen Einfluss auf den polarisierten Transport von PrP nehmen kann. Die Hydrophobe Domäne umfasst einen Bereich von 20 Aminosäuren (AA 113-133) (Yost et al., 1990). Es wurden PrP/Dpl Chimären hergestellt, bei denen dieser Bereich in die entsprechende Stelle von Dpl übertragen wurde.

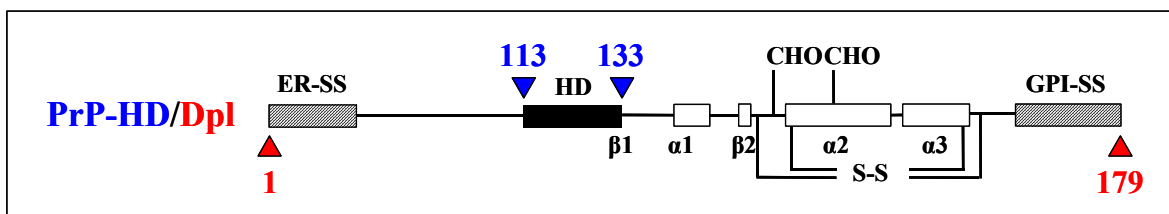


Abbildung 42: Schematische Darstellung der PrP-HD/Dpl Chimären.

ER-SS: ER-Signalsequenz, GPI-SS: GPI-Anker Signalsequenz, HD: Hydrophobe Domäne, α 1-3: α -Helices, β 1,2: β -Faltblätter, CHO: Glykosylierungsstelle, S-S: Disulfidbrücken. Domänen aus PrP sind schwarz, Domänen aus Dpl sind weiß gekennzeichnet. Die blaue Nummerierung gibt die erste und letzte AS der fusionierten Hydrophoben Domäne von PrP wieder, die rote Nummerierung stellt Vollängen Dpl dar.

Die hergestellten PrP-HD/Dpl Chimäre (vgl. Abbildung 42) bestehen aus Vollängen-Dpl, in das die Hydrophobe Domäne von PrP (AS 113-133) in die entsprechende Stelle eingefügt wurde. Für die Detektion der Chimäre wurde der AK 2234 gegen Vollängen-Dpl verwendet.

3.5.2.1 Biochemische Charakterisierung von PrP-HD/Dpl

Auch bei diesem Konstrukt wurde die Expressionsfähigkeit des Proteins in Zellen und die Löslichkeit in dem Detergenzpuffer Triton X-100/DOC untersucht, um erste Anhaltspunkte über die Faltung des Proteins zu erlangen. Anschließend wurden der Glykosylierungsstatus und die Membranverankerung charakterisiert.

Expression und Löslichkeit von PrP-HD/Dpl

Für die Untersuchung der Expressionsfähigkeit und Löslichkeit wurden N2a-Zellen transient mit PrP-HD/Dpl transfiziert. Nach Herstellung eines Gesamtproteinlysats wurden die Proben auf ein 12 % SDS-Gel aufgetragen und im Western Blot analysiert.

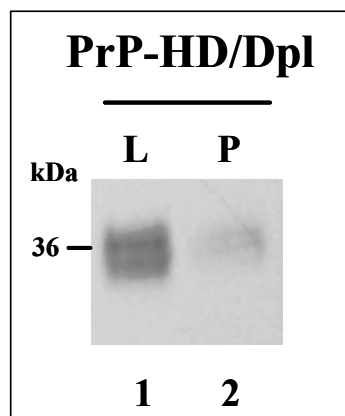


Abbildung 43: Expression von PrP-HD/Dpl im Gesamtproteinlysats.

Transient mit PrP-HD/Dpl transfizierte N2a-Zellen wurden geerntet und lysiert. Nach Zentrifugation wurden das Lysat (L) und das Pellet (P) getrennt auf ein 12 % SDS-PAGE Gel aufgetragen und im Western Blot mit dem 2234 AK detektiert.

Für PrP-HD/Dpl konnte ein heterogenes Bandenmuster ca. 34-38 kDa detektiert werden (vgl. Abbildung 43), dass dem von Vollängen-Dpl sehr ähnlich war. Das Protein war nach Lyse in dem Detergenzpuffer hauptsächlich im Lysat detektierbar (vgl. Abbildung 43, Spur 1), im Pellet dagegen kaum noch nachweisbar (vgl. Abbildung 43, Spur 2). Dieses

Ergebnis ließ vermuten, dass das Protein im sekretorischen Weg korrekt maturiert und gefaltet wird.

Glykosylierungsstatus und Oberflächenexpression von PrP-HD/Dpl

Um den Glykosylierungsstatus der hergestellten Chimäre zu charakterisieren, wurden Gesamtproteinlysate aus transient transfizierten N2a-Zellen hergestellt. Diese wurden entweder mit Endo H oder NGly F behandelt. Eine Lokalisation der Chimäre an der Zelloberfläche wurde durch eine Inkubation mit Trypsin, das Vorliegen einer GPI-Verankerung durch Behandlung mit PIPLC nachgewiesen.

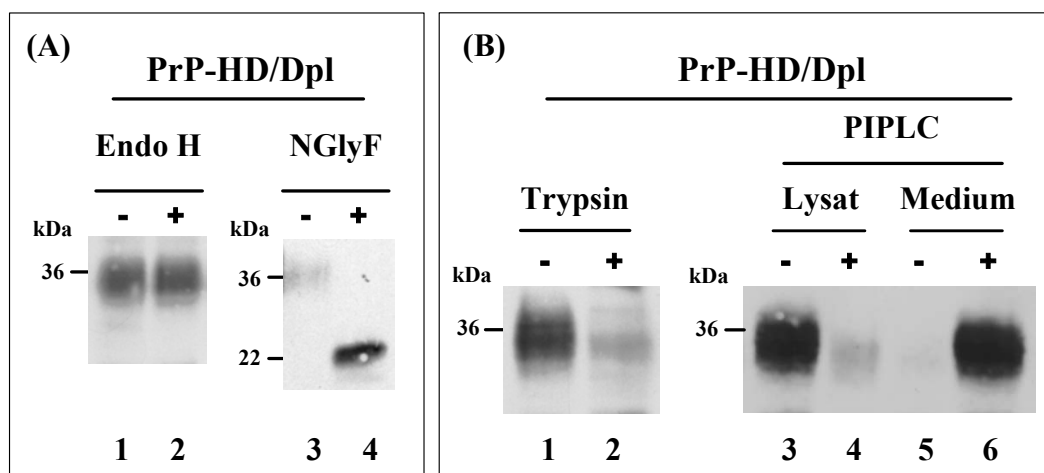


Abbildung 44: PrP-HD/Dpl ist komplex glykosyliert und mit einem GPI-Anker auf der Zelloberfläche verankert.

(A) N2a-Zellen wurden transient mit PrP-HD/Dpl transfiziert. Zelllysate wurden mit Endo H bzw. NGlyF inkubiert (Endo H + / NGlyF +) oder unbehandelt gelassen (Endo H - / NGlyF -) und die Proben im Western Blot mit dem 2234 AK detektiert. (B) Um an der Zelloberfläche exprimiertes Protein nachzuweisen, wurden transient mit PrP-HD/Dpl transfizierte N2a-Zellen mit Trypsin inkubiert (Trypsin +) oder zur Kontrolle unbehandelt gelassen (Trypsin -). Das nach Zellyse verbleibende PrP-HD/Dpl wurde im Western Blot mit dem 2234 AK detektiert. Eine GPI-Verankerung der an der Zelloberfläche exprimierten Proteine wurde nachgewiesen, indem transient mit PrP-HD/Dpl transfizierte N2a-Zellen bei 4°C mit PIPLC inkubiert (PIPLC +) oder zur Kontrolle unbehandelt gelassen (PIPLC -) wurden. Das Zelllysate (Lysat) und das Zellkulturmedium (Medium) wurden im Western Blot auf die Chimäre untersucht.

Die im Western Blot detektierbaren Proteinbanden der mit Endo H behandelten und unbehandelten Proben wiesen die gleiche elektrophoretische Mobilität auf (Abbildung 44 (A), Spur 1 und 2). Dies zeigte, dass in PrP-HD/Dpl keine Mannose-reichen Glykane vorliegen. Nach Inkubation mit PNGaseF war dagegen nur eine Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 22 kDa nachweisbar. Diese repräsentiert die deglykosylierte Form des Proteins (Abbildung 44 (A), Spur 4). Nach Inkubation mit Trypsin lässt sich erkennen, dass der größte Anteil des Proteins durch das Enzym entfernt wurde und somit

nicht mehr auf dem Blot detektierbar war (Abbildung 44 (B), Spur 2). Eine Inkubation mit Phospholipase C zeigte weiter, dass PrP-HD/Dpl, wie Dpl und PrP, durch einen GPI-Anker an der Oberfläche verankert ist. Ohne PIPLC (Abbildung 44 (B), Spur 3) waren die Chimäre im Lysat detektierbar. Durch eine Inkubation mit PIPLC wurde der GPI-Anker gespalten und die Chimäre als lösliche Proteine in den Überstand freigesetzt. Ein Nachweis war folglich nicht mehr im Lysat (Abbildung 44 (B), Spur 4), sondern im Überstand (Abbildung 44 (B), Spur 6) möglich.

Die biochemische Untersuchung zeigt, dass die Fusion der HD von PrP mit Vollängen Dpl keinen Einfluss nimmt auf Faltung, Glykosylierung und Membranverankerung. PrP-HD/Dpl wird komplex glykosyliert, ist mit einem GPI-Anker auf der Zelloberfläche verankert und ist biochemisch mit PrP bzw. Dpl vergleichbar.

3.5.2.2 Stabile exogene Expression von PrP-HD/Dpl

PrP-HD/Dpl wurde stabil in MDCK-Zellen transfiziert. Für die Untersuchung des polarisierten Transports wurden unterschiedlich exprimierende Einzelzellklone ausgewählt.

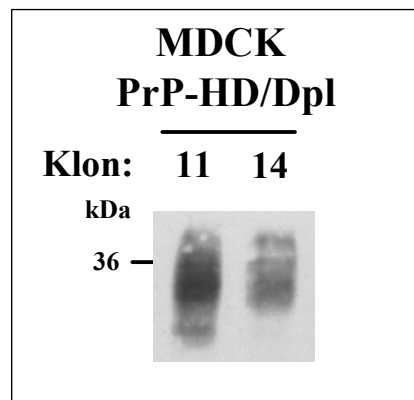


Abbildung 45: Stabile exogene Expression zweier PrP-HD/Dpl MDCK-Einzelzellklone.

Gesamtproteinlysate von MDCK-Zellen mit stabiler exogener PrP-HD/Dpl Expression wurde mittels 12 % SDS-PAGE getrennt und mit dem AK 2234 detektiert. Um die Expressionsstärken miteinander vergleichen zu können, wurden von der Gesamtproteinmenge der Lysate jeweils 30µg Protein auf das Gel aufgetragen.

3.5.3 Basolateraler Transport von Dpl durch Übertragung der Hydrophoben Domäne von PrP

Die Integration der Hydrophoben Domäne von PrP in die korrespondierende Stelle von Dpl sollte Aufschluss darüber ergeben, ob ein dominantes basolaterales Sortierungssignal von dieser Domäne ausgeht. Bei Vorliegen eines solchen Signals sollte das apikal transportierte Dpl durch den Einfluss dieses Signals zur basolateralen Zelloberfläche fehltransportiert werden.

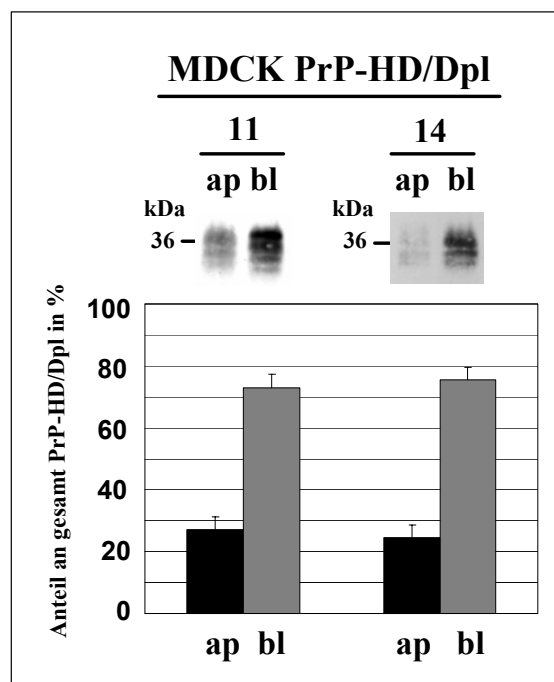


Abbildung 46: Quantitative Analyse des polarisierten Transports von PrP-HD/Dpl in MDCK-Zellen.

MDCK-Zellen mit verschieden starker stabiler exogener Expression von PrP-HD/Dpl (vgl. Abbildung 46) wurden 5 Tage auf Filtern mit 24 mm Durchmesser kultiviert und, wie in Abbildung 21, beschrieben analysiert. Für die beiden untersuchten Einzelzellklone sind die Mittelwerte aus je fünf unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung angegeben.

Nach Biotinylierung und Auftrennung der Proteine im Gel gab die qualitative Auswertung der Western Blots Grund zur Annahme, dass die Chimäre PrP-HD/Dpl zur basolateralen Plasmamembran transportiert werden. Die Quantifizierung der detektierten Proteinbanden ergab, dass PrP-HD/Dpl mit einem Verteilungsverhältnis von 25:75 zur basolateralen Zelloberfläche sortiert wird.

Zusammenfassend lässt sich daher für den polarisierten Transport der PrP-HD/Dpl Chimäre feststellen: Die Übertragung der HD von PrP auf Dpl war ausreichend für einen

Fehltransport des eigentlich apikal transportierten Proteins Dpl zur basolateralen Plasmamembran. Die HD kann daher als das dominante Sortierungssignal identifiziert werden, das für den basolateralen Transport von PrP verantwortlich ist.

3.5.4 Fehltransport von PrP durch Deletion der Hydrophoben Domäne

Aus den in 3.5.2 beschriebenen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die Hydrophobe Domäne von PrP das dominante Sortierungssignal für den basolateralen Transport von PrP darstellt. Die Identifizierung dieser Domäne sollte weiter bestätigt werden. Eine Möglichkeit hierfür ist die Inaktivierung eines solchen Signals durch Deletion (Le Bivic et al., 1991). Die Deletion von HD aus PrP (vgl. Abbildung 47) sollte daher durch das Fehlen des dominanten basolateralen Sortierungssignals zu einem veränderten polarisierten Transport des Proteins führen.

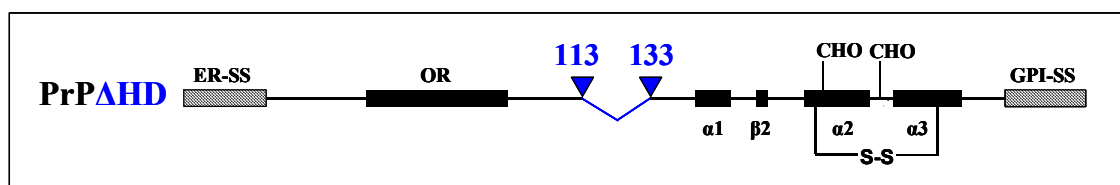


Abbildung 47: Schematische Darstellung von PrP Δ HD.

ER-SS: ER-Signalsequenz, OR: Oktarepeat Region; GPI-SS: GPI-Anker Signalsequenz, α 1-3: α -Helices, β 1,2: β -Faltblätter, CHO: Glykosylierungsstelle, S-S: Disulfidbrücken. Die Nummerierung gibt die erste und letzte AS der deletierten Hydrophoben Domäne von PrP (blau) wieder.

3.5.4.1 Beschreibung der biochemischen Eigenschaften von PrP Δ HD

Das Konstrukt PrP Δ HD wurde in vorausgehenden Untersuchungen schon biochemisch charakterisiert (Winklhofer et al., 2003b). Es konnte dabei gezeigt werden, dass Deletion der HD keinen größeren Effekt auf die Maturierung und Faltung des Proteins hat. Das Protein liegt bei Expression in Säugetierzellen in zwei unterschiedlichen Formen vor. Diese Formen sind mit denen, die bei dem Konstrukt PrP-N/Dpl beschrieben wurden (vgl. 3.5.1.1), vergleichbar. Ein Teil des Proteins ist in dem Detergenzpuffer Triton X-100/DOC löslich, komplex glykosyliert und mit einem GPI-Anker an der Zelloberfläche verankert. Der andere ist fehlgefaltet und daher in dem Detergenzpuffer unlöslich. Dieser Proteinanteil liegt als Mannose-reich glykosylierte Form vor und wird ohne Membranverankerung in das Zellkulturmedium sekretiert. Bei der Untersuchung des

polarisierten Transports von PrP Δ HD wird, wie bei PrP-N/Dpl auch, nur das komplex glykosylierte und GPI-verankerte Protein an der Zelloberfläche berücksichtigt.

3.5.4.2 Stabile exogene Expression von PrP Δ HD

Für die Untersuchung des polarisierten Transports wurde das Konstrukt stabil in MDCK-Zellen transfiziert. Von den selektierten Einzelzellklonen wurden zwei unterschiedlich exprimierende Klone für die Untersuchung ausgewählt.

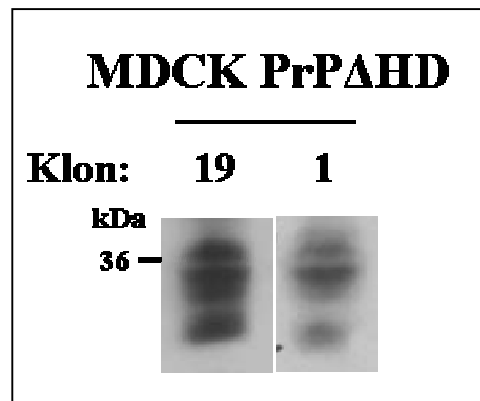


Abbildung 48: Stabile exogene Expression zweier PrP Δ HD MDCK-Einzelzellklone.

Gesamtproteinlysate von MDCK-Zellen mit verschieden stabiler exogener PrP Δ HD Expression wurden mittels 12 % SDS-PAGE getrennt und mit dem 3F4 AK detektiert. Um die Expressionsstärken miteinander vergleichen zu können, wurden von der Gesamtproteinmenge der Lysate jeweils 30 μ g Protein auf das Gel aufgetragen.

3.5.4.3 Apikale Fehlsortierung von PrP mit deletierter Hydrophoben Domäne

Die Übertragung der Hydrophoben Domäne von PrP auf Dpl ermöglichte es, das eigentlich apikal lokalisierte Protein auf die basolaterale Zelloberfläche fehlzutransportieren. Durch die Charakterisierung des polarisierten Transportes der PrP/Dpl Chimäre konnte daher die Hydrophobe Domäne in der N-terminalen Domäne von PrP als dominantes basolaterales Sortierungssignal identifiziert werden. Dies sollte nun durch Deletion der HD bestätigt werden. PrP Δ HD sollte durch das Fehlen dieses dominanten basolateralen Sortierungssignals in polarisierten MDCK-Zellen fehltransportiert werden.

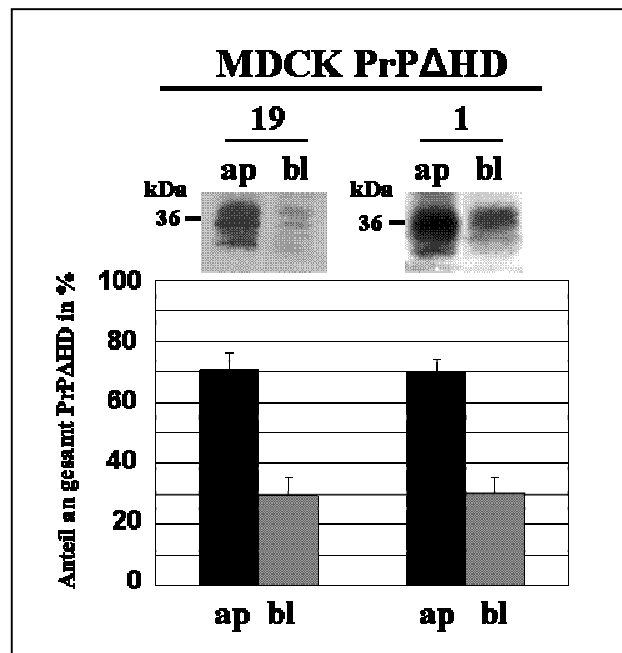


Abbildung 49: Quantitative Analyse des polarisierten Transports von PrPΔHD in MDCK-Zellen.

MDCK-Zellen mit verschiedener stabiler exogener Expression von PrPΔHD (vgl. Abbildung 48) wurden 5 Tage auf Filtern mit 24 mm Durchmesser kultiviert und, wie in Abbildung 21 beschrieben, analysiert. Für die beiden untersuchten Einzelzellklone sind jeweils die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung angegeben.

Die Quantifizierung der Biotinylierung ergab einen Transport von PrPΔHD zur apikalen Seite in einem prozentualen Verhältnis von ca. 75:25. Die Deletion der HD aus dem PrP Molekül führt demnach zu einem Fehltransport von PrP zur apikalen Zelloberfläche. Dieses Ergebnis bestätigte, dass durch die HD ein dominantes basolaterales Sortierungssignal vermittelt wird. Die Fehlsortierung von PrPΔHD nach Herausnehmen des basolateralen Sortierungssignals stimmt mit Ergebnissen aus früheren Studien über basolaterale Sortierungssignale überein (Casanova et al., 1991; Hunziker et al., 1991; Le Bivic et al., 1991). In diesen Arbeiten wurde gezeigt, dass die Herausnahme eines dominanten basolateralen Sortierungssignals in eine Fehlsortierung dieses Proteins zur apikalen Zelloberfläche resultieren kann. Der polarisierte Transport von PrPΔHD zur apikalen Plasmamembran unterstützt daher die Aussage, dass die HD den basolateralen Transport von PrP vermittelt.

3.6 Veränderung des polarisierten Transportes von PrP durch pathogene Mutationen

Die Identifikation der HD als das dominante basolaterale Sortierungssignal von PrP gelang durch die Untersuchung des polarisierten Transportes der PrP/Dpl Chimäre. Die Charakterisierung des Sortierungsverhaltens von PrP Δ HD bestätigt dies, da die Deletion der HD zu einem apikalen Fehltransport führte. Es sollte nun der polarisierte Transport von PrP-AV3 untersucht werden, das Mutationen an den Positionen A112V, A114V und A117V enthält (vgl. Abbildung 50). Aus früheren Studien ist bekannt, dass Einführung von Mutationen in Sortierungssignale zu einer falschen Sortierung führen können, wahrscheinlich durch Inaktivierung des Signals (Brewer and Roth, 1991). Durch die Untersuchung des Transportverhaltens von PrP-AV3 sollte daher zum einen ein weiterer Beweis für die HD als das Sortierungssignal erhalten werden. Zum anderen ist für die PrP-AV3 Mutante bekannt, dass sie in Zusammenhang steht mit einer progressiven Neurodegeneration in transgenen Mäusen (Hegde et al., 1998). Es stellte sich daher die Frage, ob pathogene Mutationen innerhalb der HD den physiologischen Transport von PrP in polarisierten MDCK-Zellen stören können und einem fehlerhaften Sortierungsverhalten dadurch eine pathophysiologische Bedeutung zukommen kann.

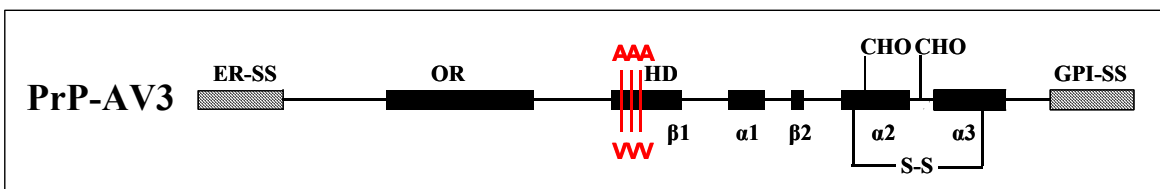


Abbildung 50: Schematische Darstellung von PrP-AV3.

ER-SS: ER-Signalsequenz, GPI-SS: GPI-Anker Signalsequenz, OR: Oktarepeat Region; HD: Hydrophobe Domäne; α 1-3: α -Helices, β 1,2: β -Faltblätter, CHO: Glykosylierungsstelle, S-S: Disulfidbrücken. Die eingeführten Punktmutationen sind rot gekennzeichnet.

3.6.1 Biochemische Charakterisierung von PrP-AV3

Exakte Daten zur biochemischen Charakterisierung von PrP-AV3 sind in der Literatur bisher nicht publiziert. *In vitro* Studien zeigten, dass das Protein eine GPI-Verankerung trägt. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass PrP-AV3 mit NGlyF deglykosyliert wird (Stewart and Harris, 2001). Um eine genauere Vorstellung über Faltung, Glykosylierungsstatus und Membranverankerung zu bekommen, wurden N2a-Zellen transient mit PrP-AV3 transfiziert. Der Glykosylierungsstatus wurde untersucht, indem die Proben nach Herstellung von Gesamtproteinlysaten entweder mit Endo H oder NGlyF inkubiert wurden. Die Lokalisation auf der Zellmembran und die Art der Membranverankerung wurden durch Behandlung mit Trypsin bzw. PIPLC analysiert.

Expression und Löslichkeit von PrP-AV3

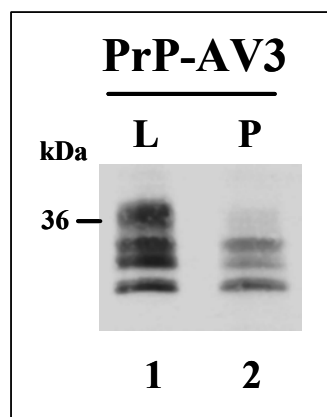


Abbildung 51: Expression und Löslichkeit von PrP-AV3.

Transient mit PrP-AV3 transfizierte N2a-Zellen wurden geerntet und lysiert. Nach Zentrifugation wurden das Lysat (L) und das Pellet (P) getrennt auf ein 12 % SDS-PAGE Gel aufgetragen und im Western Blot mit dem 3F4 AK detektiert.

In Abbildung 51 ist zu erkennen, dass PrP-AV3 in dem Detergenzpuffer Triton X-100/DOC löslich ist und hauptsächlich im Lysat detektierbar ist (vgl. Spur 1). Im Pellet ist aber dennoch ein geringer Anteil des Proteins detektierbar (vgl. Abbildung 51, Spur 2).

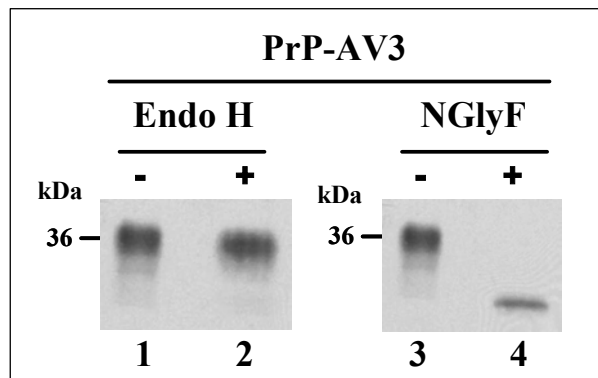
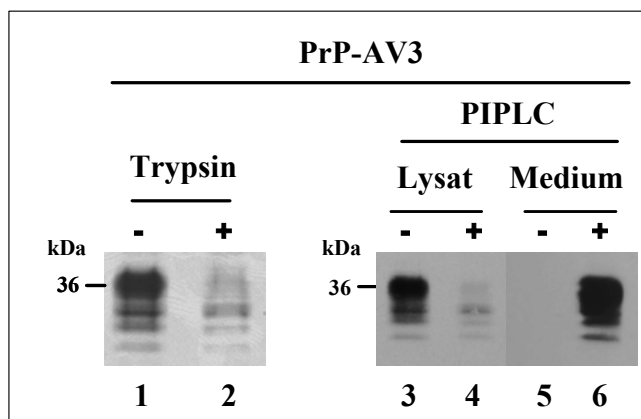
Glykosylierungsstatus und Oberflächenexpression von PrP-AV3**(A)****(B)**

Abbildung 52: PrP-AV3 ist komplex glykosyliert und wird mit einem GPI-Anker auf der Zelloberfläche verankert.

(A) N2a-Zellen wurden transient mit PrP-AV3 transfiziert. Zelllysate wurden mit Endo H bzw. NGlyF inkubiert (Endo H + / NGlyF +) oder unbehandelt gelassen (Endo H - / NGlyF -) und die Proben im Western Blot mit dem 3F4 AK detektiert. (B) Um an der Zelloberfläche exprimiertes Protein nachzuweisen, wurden transient mit PrP-AV3 transfizierte N2a-Zellen mit Trypsin inkubiert (Trypsin +) oder zur Kontrolle unbehandelt gelassen (Trypsin -). Das nach Zellyse verbleibende PrP-AV3 wurde im Western Blot mit dem 3F4 AK detektiert. Eine GPI-Verankerung der an der Zelloberfläche exprimierten Proteine wurde nachgewiesen, indem transient mit PrP-AV3 transfizierte N2a-Zellen bei 4°C mit PIPLC inkubiert (PIPLC +) oder zur Kontrolle unbehandelt gelassen (PIPLC -) wurden. Das Zellysate (Lysat) und das Zellkulturmedium (Medium) wurden im Western Blot auf PrP-AV3 untersucht.

Die Untersuchung des Glykosylierungsstatus von PrP-AV3 zeigte, dass das Protein resistent gegenüber einer Inkubation mit Endo H ist. Die elektrophoretische Mobilität der mit dem Enzym behandelten Proben (vgl. Abbildung 52 (A), Spur 1) zeigte keinen Unterschied zu der Kontrollprobe (vgl. Abbildung 52 (A), Spur 2). Die Untersuchung auf komplexe N-Glykosylierung durch Inkubation von Gesamtproteinlysaten mit NGlyF bestätigte die aus der Literatur bekannten Ergebnisse. Nach Inkubation mit dem Enzym ist

eine Proteinbande bei ca. 22 kDa detektierbar, die das unglykosylierte Protein repräsentiert (vgl. Abbildung 52 (A), Spur 4). Die Ergebnisse der enzymatischen Deglykosylierung zeigen also, dass PrP-AV3 komplex glykosyliert wird.

Nach Inkubation mit Trypsin kann man erkennen, dass PrP-AV3 fast vollständig von der Plasmamembran hydrolysiert werden konnte und im Lysat kaum noch detektierbar ist (vgl. Abbildung 52 (B), Spur 2). Die Inkubation mit PIPLC zeigte, dass PrP-AV3 mit einem GPI-Anker auf der Zelloberfläche verankert ist. PrP-AV3 ist ohne Inkubation mit PIPLC im Lysat nachweisbar (vgl. Abbildung 52 (B), Spur 3). Eine Inkubation mit PIPLC führt zur Spaltung des GPI-Ankers. PrP-AV3 ist daher nicht mehr im Lysat (vgl. Abbildung 52 (B), Spur 4), sondern im Überstand detektierbar (vgl. Abbildung 52 (B), Spur 6).

Aus diesen Ergebnissen der biochemischen Charakterisierung kann man schließen, dass PrP-AV3 zum größten Teil richtig gefaltet vorliegt, da es sowohl komplex glykosyliert ist als auch durch den GPI-Anker eine funktionale Membranverankerung erhält.

3.6.2 Stabile exogene Expression von PrP-AV3

Für die Untersuchung des polarisierten Transports dieser pathogenen Mutante wurden stabile verschieden exprimierende MDCK PrP-AV3 Einzelzellklone hergestellt. Bei der Auswertung dieser Einzelzellklone war festzustellen, dass nur wenige Zellen das Protein überhaupt exprimierten. Die stabile Expression in den Klonen im Vergleich zu anderen stabil exogen exprimierten Konstrukten war sehr schwach. Um die exogene Expression des Proteins zu erhöhen, wurden die Einzelzellklone daher vor einem Experiment über Nacht, d.h. 15-18 Stunden, mit 10 mM Na-Butyrat behandelt (Gottlieb et al., 1986). Na-Butyrat führt innerhalb des transfizierten DNA-Plasmids zu einer verstärkten Aktivität des CMV-Promotors. Dies resultiert in einer vermehrten Synthese der exprimierten Proteine.

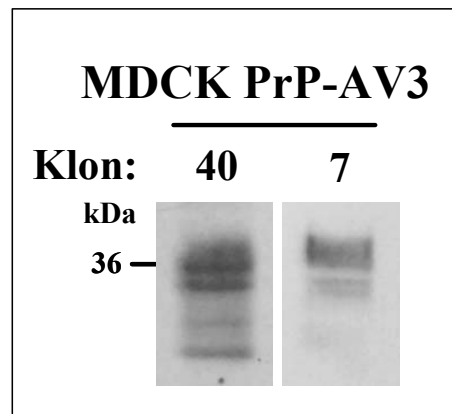


Abbildung 53: Stabile exogene Expression zweier PrP-AV3 MDCK-Einzelzellklone.

Gesamtproteinlysate von MDCK-Zellen mit stabiler exogener PrP-AV3 Expression wurden mittels 12 % SDS-PAGE getrennt und mit dem 3F4 AK detektiert. Um die Expressionsstärken miteinander vergleichen zu können, wurden von der Gesamtproteinmenge der Lysate jeweils 30µg Protein auf das Gel aufgetragen.

3.6.3 Apikale Fehlsortierung von PrP-AV3

Die Einführung einer pathogenen Mutation in die Hydrophobe Domäne sollte Aufschluss darüber geben, ob durch diese das von der HD ausgehende Sortierungssignal inaktiviert und so der basolaterale Transport von PrP gestört wird.

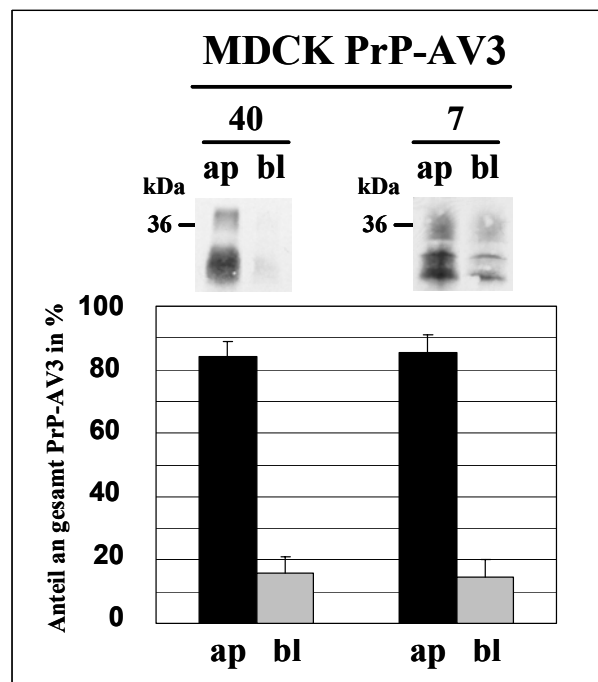


Abbildung 54: Quantitative Analyse des polarisierten Transports von PrP-AV3 in MDCK-Zellen.

MDCK-Zellen mit verschiedener stabiler exogener Expression von PrP-AV3 (vgl. Abbildung 53) wurden 5 Tage auf Filtern mit 24 mm Durchmesser kultiviert. Einen Tag vor Durchführung der Biotinylierung wurden die Zellen über Nacht mit 10 mM Na-Butyrat behandelt und anschließend, wie in Abbildung 21 beschrieben, weiter analysiert. Für die beiden untersuchten Einzelzellklone sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung angegeben.

Die qualitative Analyse der biotinylierten Proteine im Western Blot gab Grund zur Annahme, dass die pathogene PrP-AV3 Mutante einem Fehltransport zur apikalen Plasmamembran unterliegt. Diese Vermutung konnte in der Biotinylierung bestätigt werden (vgl. Abbildung 54). Die Quantifizierung der detektierten Proteinbanden ergab eine Lokalisation von PrP-AV3 vornehmlich auf der apikalen Zelloberfläche. Es konnte in beiden Einzelzellklonen ein prozentuales Verteilungsverhältnis von ca. 85:15 festgestellt werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden: Der Transport von PrP-AV3 zur apikalen Zelloberfläche findet mit einem prozentualen Verteilungsverhältnis von 85:15 statt. Im

Gegensatz zu PrP ist PrP-AV3 somit vornehmlich auf der apikalen Zelloberfläche lokalisiert. Die Einführung von Mutationen in die Hydrophobe Domäne von PrP, die im Tiermodell im Zusammenhang mit der Ausbildung neurodegenerativer Erkrankungen stehen, führen zu einer Störung des physiologischen Transportes von PrP und resultieren in einer massiven Fehlsortierung des Proteins in polarisierten MDCK-Zellen.

3.7 Fehlsortierung von PrP durch Koexpression von Dpl

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass neuronale Expression von Dpl in PrP-defizienten Mäusen verantwortlich ist für das Auftreten von Neurodegeneration (Moore et al., 1999). Koexpression von PrP kann diese Dpl-induzierte Neurotoxizität antagonisieren (Nishida et al., 1999; Rossi et al., 2001). Es wurde versucht dieses Phänomen anhand eines Modellsystems zu erklären (vgl. 1.3.5). In diesem Modell konkurrieren PrP und Dpl miteinander um die Bindung eines gemeinsamen Liganden X. In Abwesenheit von PrP kann Dpl den Liganden binden und eine neurotoxische Kaskade initiieren (Shmerling et al., 1998; Weissmann and Aguzzi, 1999). Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse über den polarisierten Transport von PrP und Dpl erschweren allerdings den Versuch, den Antagonismus von PrP auf die von Dpl verursachte Neurodegeneration durch einen neutralisierenden Mechanismus zu erklären. Im Gegensatz zu PrP ist Dpl in polarisierten MDCK-Zellen vornehmlich auf der apikalen Zelloberfläche lokalisiert, ein direkter Kontakt zwischen den beiden Proteinen also nicht möglich. Der polarisierte Transport von PrP und Dpl sollte daher unter den Bedingungen einer Koexpression erneut untersucht werden.

3.7.1 Stabile exogene Koexpression von PrP und Dpl in MDCK-Zellen

Bei der Koexpression von PrP und Dpl in MDCK-Zellen wurde für die Detektion von PrP der AK 3F4, für Dpl der AK 2234 gewählt. Für beide AK wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass sie endogen exprimierte Proteine nicht erkennen. Es war aber möglich, dass eine Kreuzreaktion mit dem jeweils anderen Protein stattfindet. Zunächst wurde daher die Spezifität der AK für das jeweilige Protein nachgewiesen. Gesamtlysate aus Einzelzellklonen wurden hergestellt, die entweder PrP oder Dpl stabil exprimierten (vgl. und Abbildung 34 (A)) und die Proteine im 12 % SDS-PAGE getrennt. Die PrP exprimierenden Einzelzellklone wurden anschließend im Western Blot mit dem AK 2234, die Dpl exprimierenden Einzelzellklone mit dem AK 3F4 detektiert. Als Kontrolle für den

AK 3F4 diente der exogen stabil exprimierende MDCK-PrP/3F4 Einzelzellklon 8, für den AK 2234 der exogen stabil exprimierende MDCK-Dpl Einzelzellklon 11.

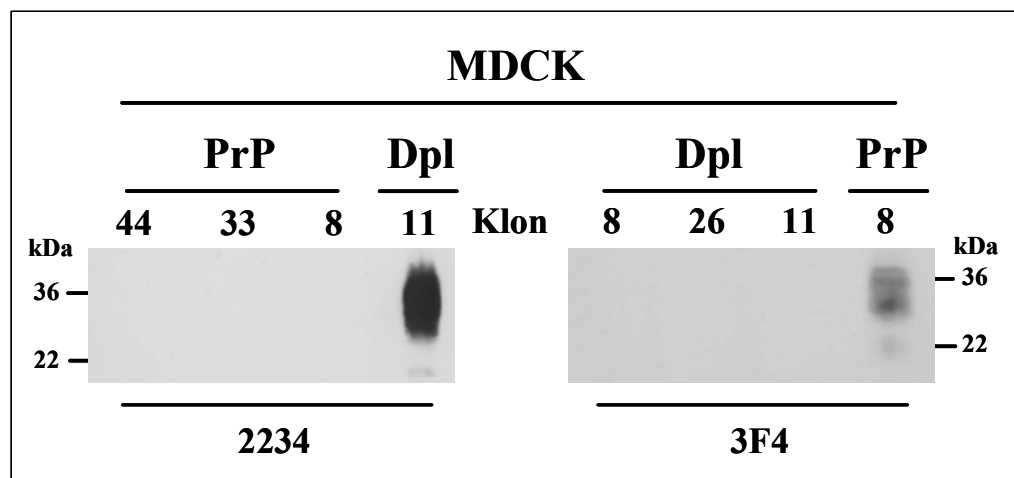


Abbildung 55: Spezifität der AK für PrP bzw. Dpl.

Gesamtproteinlysate von MDCK-Zellen mit stabiler exogener PrP oder Dpl Expression (vgl. Abbildung 17 und Abbildung 34 (A)) wurden mittels 12 % SDS-PAGE getrennt und mit den angegebenen AK detektiert.

In Abbildung 55 ist zu erkennen, dass durch den 2234 AK Dpl und durch den AK 3F4 PrP/3F4 detektiert wird. Beide AK sind aber nicht in der Lage, das jeweils andere Protein zu detektieren. Es ist also sichergestellt, dass die Effekte, die mit den AK 3F4 bzw. 2234 in der Koexpression zu sehen sind, spezifisch auf PrP bzw. Dpl zurückzuführen sind.

Beide Proteine wurden stabil in MDCK-Zellen kotransfiziert. Für die anschließenden Untersuchungen wurden drei Einzelzellklone mit unterschiedlicher Koexpression von PrP und Dpl ausgewählt.

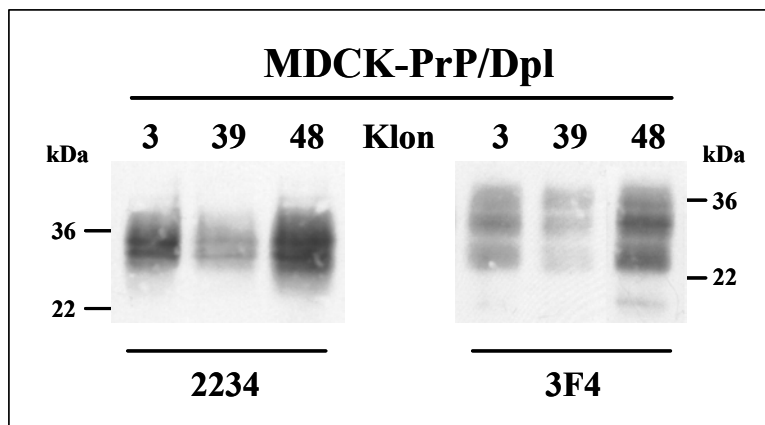


Abbildung 56: Expressionsstärke verschieden exogen stabil koexprimierender PrP/Dpl MDCK-Einzelzellklone.

Gesamtproteinlysate von MDCK-Zellen mit verschieden stabiler exogener PrP und Dpl Koexpression wurden mittels 12 % SDS-PAGE getrennt und mit den angegebenen AK detektiert. Um die Expressionsstärken miteinander vergleichen zu können, wurden von der Gesamtproteinmenge der Lysate jeweils 30µg Protein auf das Gel aufgetragen.

3.7.2 Biochemische Charakterisierung von koexprimiertem PrP und Dpl

Für beide Proteine ist gezeigt worden, dass sie komplex glykosyliert und an der Zelloberfläche lokalisiert sind, wenn sie unabhängig voneinander exprimiert werden (vgl. 3.1.3 und 3.4.2). Es sollte daher zunächst untersucht werden, ob die Koexpression beider Proteine einen Einfluss auf Faltung, Glykosylierung und Lokalisation auf der Plasmamembran nimmt.

Expression und Löslichkeit

Für PrP und Dpl ist bekannt, dass sie bei einer alleinigen Expression in dem Detergenzpuffer Triton X-100/DOC löslich und hauptsächlich im Überstand des Lysates nachweisbar sind (vgl. Abbildung 18 und Abbildung 31). Es wurde deshalb zunächst der Einfluss einer Koexpression von PrP mit Dpl auf die Löslichkeit der Proteine untersucht. Dies sollte einen ersten Anhaltspunkt dafür geben, ob eine korrekte Faltung der Proteine bei einer Koexpression möglich war. Es wurden Gesamtproteinlysate aus stabil exogen koexprimierenden PrP/Dpl MDCK-Zellen (vgl. Abbildung 56, Klon 3) hergestellt. Nach Zentrifugation wurden das Lysat (L) und das Pellet (P) getrennt voneinander auf ein 12 % SDS-Gel aufgetragen und die Proteine anschließend analysiert.

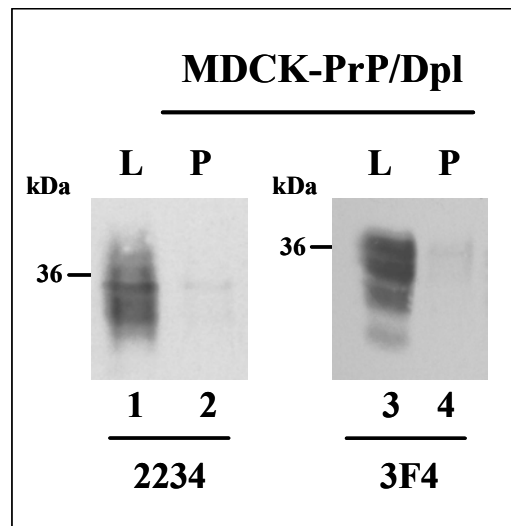


Abbildung 57: Expression und Löslichkeit von koexprimierten PrP und Dpl.

Stabil exogen koexprimierende PrP/Dpl MDCK-Einzelzellklone wurden geerntet und lysiert. Nach Zentrifugation wurden das Lysat (L) und das Pellet (P) getrennt auf ein 12 % SDS-PAGE Gel aufgetragen und im Western Blot mit den angegebenen AK detektiert.

Die Untersuchung auf Expression und Löslichkeit ergab, dass beide Proteine fast ausschließlich im Überstand nachgewiesen werden konnten (vgl. Abbildung 57, Spur 1 und 3), eine Detektion im Pellet war dagegen kaum möglich (vgl. Abbildung 57, Spur 2 und 4). Dies gab Grund zu der Annahme, dass eine Koexpression der Proteine keinen Einfluss nimmt auf Faltung und Maturierung von PrP und Dpl im sekretorischen Weg.

Glykosylierungsstatus und Oberflächenexpression

Das Vorliegen komplexer Glykosylierungen in beiden Proteinen wurde analysiert durch Inkubation mit Endo H bzw. NGlyF. Auf der Oberfläche exprimiertes PrP und Dpl wurde untersucht durch eine extrazelluläre Behandlung mit Trypsin.

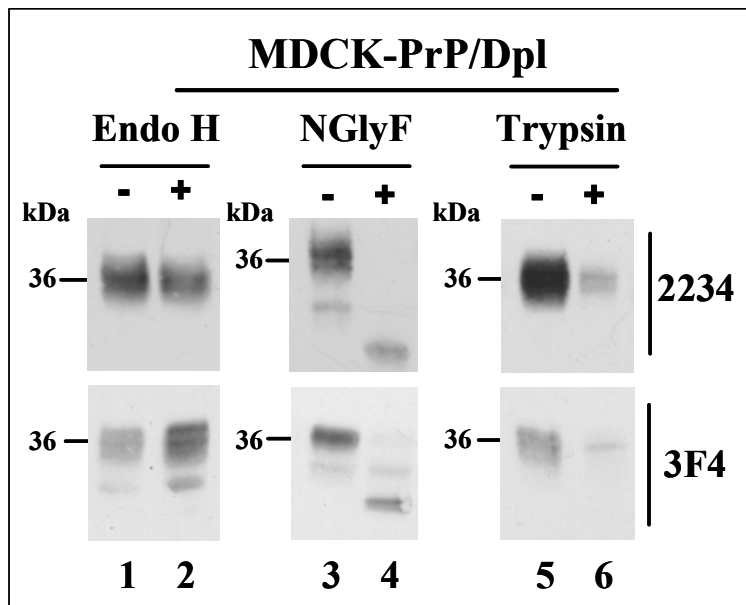


Abbildung 58: Koexprimiertes PrP und Dpl sind komplex glykosyliert und an der Zelloberfläche lokalisiert.

Herstellung von Gesamtzelllysaten von MDCK-Zellen mit stabiler exogener PrP und Dpl Koexpression. Diese wurden mit Endo H bzw. NGlyF inkubiert (EndoH + / NGlyF +) oder unbehandelt gelassen (EndoH - / NGlyF -). Um auf eine Expression von PrP und Dpl an der Oberfläche zu testen, wurden stabil exogen koexprimierende PrP/Dpl MDCK-Einzelzellklone mit Trypsin inkubiert (Trypsin +) oder zur Kontrolle unbehandelt gelassen (Trypsin -). Die Proben wurden in einem 12 % SDS-PAGE getrennt und im Western Blot mit den angegebenen AK detektiert.

Die Untersuchung des Glykosylierungsstatus zeigte, dass auch bei einer Koexpression von PrP und Dpl beide Proteine komplex glykosyliert werden. Beide waren resistent gegenüber einer Inkubation mit Endo H (Abbildung 58, Spur 1 und 2). Nach einer Behandlung mit PNGaseF konnte nur noch eine Proteinbande detektiert werden (Abbildung 58, Spur 4), die mit der deglykosylierten Form der voneinander unabhängig exprimierten Proteine übereinstimmt (vgl. Abbildung 19 (B), Spur 4; Abbildung 32 (A), Spur 4). Auch die Lokalisation der beiden Proteine auf der Zelloberfläche wird nicht durch eine Koexpression verändert. Beide Proteine konnten mit Trypsin von der Membran hydrolysiert werden und waren nach der Inkubation mit diesem Enzym kaum noch im Western Blot nachzuweisen (Abbildung 58, Spur 6).

Zusammenfassend kann man daher feststellen: Die Koexpression von PrP und Dpl in MDCK-Zellen nimmt keinen Einfluss auf Faltung, Glykosylierungsstatus oder Oberflächenexpression der beiden Proteine.

3.7.3 Apikaler Transport von PrP bei gleichzeitiger Expression von Dpl

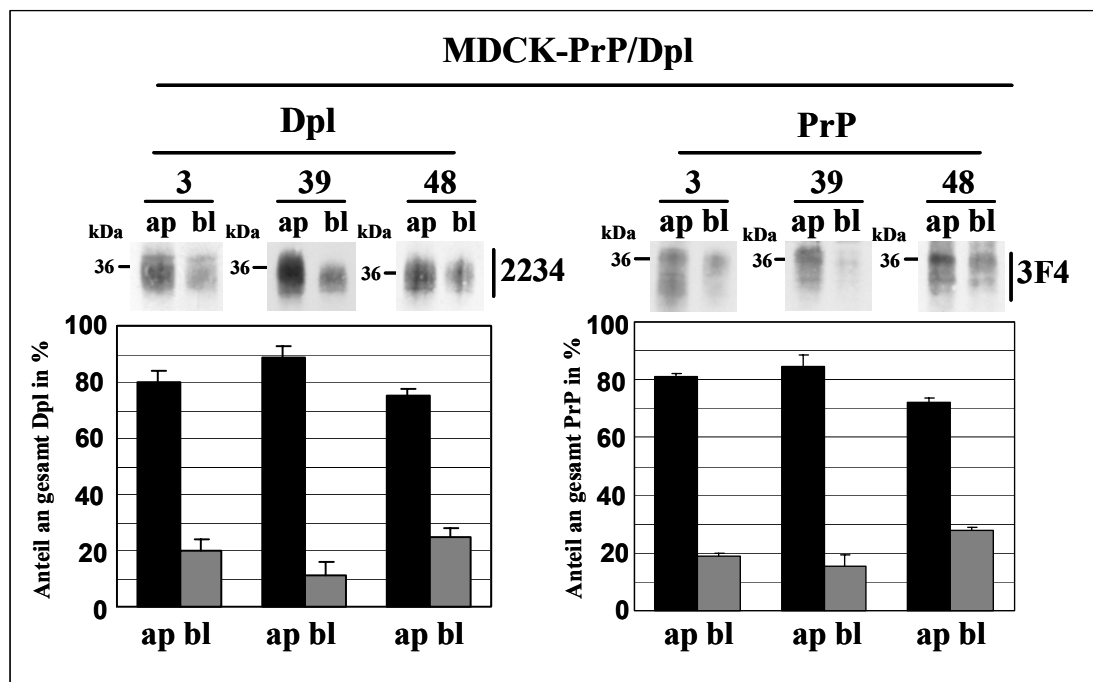


Abbildung 59: Quantitative Analyse des polarisierten Transports von PrP und Dpl in koexprimierenden MDCK-Zellen.

MDCK-Zellen mit verschiedener stabiler exogener Koexpression von PrP und Dpl (vgl. Abbildung 56) wurden 5 Tage auf Filtern mit 24 mm Durchmesser kultiviert. Auf der Oberfläche exprimiertes PrP und Dpl wurde selektiv entweder von der apikalen (ap=apikal) oder von der basolateralen (bl=basolateral) Seite mit EZ-linkTM Sulfo-NHS-Biotin markiert. Die Zellen wurden lysiert und die biotinylierten Proteine mit den entsprechenden AK immunpräzipitiert. Die immunpräzipitierten Proteine wurden mittels 12 % SDS-PAGE getrennt und die Proteine im Western Blot mit gegen Biotin gerichtetes Streptavidin-HRP nachgewiesen. Für die drei untersuchten Einzelzellklone sind jeweils die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung angegeben. Die Gesamt-Proteinmenge an PrP und Dpl, die auf der apikalen und basolateralen Seite gefunden werden konnte, wurde als 100 % festgelegt. Davon ausgehend wurde der prozentuale Anteil der auf den jeweiligen Seiten befindlichen Proteine errechnet.

Die Quantifizierung der biotinylierten Dpl Proteine ergab ein Verteilungsverhältnis von 80:20. Dieser apikale Transport entsprach der Verteilung, die bei einer alleinigen Expression von Dpl in polarisierten MDCK-Zellen gefunden wurde. Der polarisierte Transport von PrP bei einer Koexpression mit Dpl zeigte allerdings einen Fehltransport von PrP. Im Gegensatz zu der basolateralen Verteilung bei einer alleinigen Expression in MDCK-Zellen (vgl. Abbildung 21) wird PrP bei einer Koexpression mit Dpl effizient auf die apikale Seite der Zellen sortiert. Die Quantifizierung ergab eine Sortierung von nahezu

80:20 zur apikalen Zellmembran. Man kann hier wiederum erkennen, dass die Expressionsstärke der Klone einen Einfluss auf das Ausmaß der polarisierten Verteilung nimmt. Im Gegensatz zu dem sehr effizienten polarisierten Transport von PrP und Dpl in dem schwach exprimierenden Klon 39 (vgl. Abbildung 56) zeigt die Quantifizierung der Proteinbanden des stärker exprimierenden Klons 48 (vgl. Abbildung 56), dass die Proteine hier ein schlechteres Sortierungsverhalten aufweisen.

Mit dem gezeigten Ergebnis einer Fehlsortierung von PrP konnte allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere Proteine in ihrem polarisierten Transport beeinflusst werden. Es musste deshalb sichergestellt werden, dass der aufgezeigte apikale Fehltransport von PrP spezifisch für dieses Protein ist und eine Koexpression von PrP und Dpl auf den polarisierten Transport anderer Proteine keinen Einfluss nimmt.

In vorausgegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass MDCK-Zellen endogen das Alzheimer-Vorläufer-Protein β APP exprimieren und nach dessen proteolytischer Prozessierung den größten Teil der N-terminalen Ektodomäne als lösliches APP_s Molekül ins basolaterale Zellmedium sekretieren (Haass et al., 1994). Um die Spezifität des Fehltransportes von PrP in den PrP/Dpl koexprimierenden MDCK-Zellen nachzuweisen, wurde daher die polarisierte Sekretion von APP_s in den stabil exogen koexprimierenden MDCK-Einzelzellklonen analysiert.

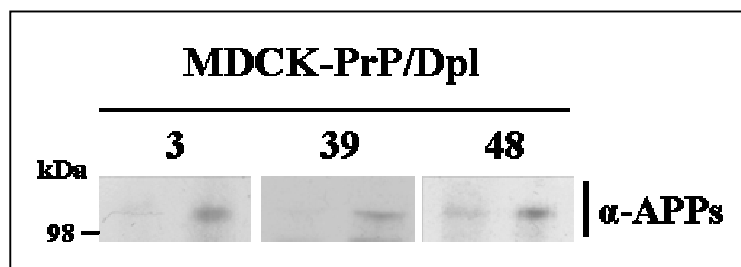


Abbildung 60: Basolaterale Sekretion von APP_s wird durch eine Koexpression von PrP und Dpl nicht beeinflusst.

Stabil exogen PrP und Dpl koexprimierende MDCK-Zellen (vgl. Abbildung 56) wurden 5 Tage auf Filtern mit 24 mm Durchmesser kultiviert. Das in den apikalen bzw. basolateralen Kammern der Filter befindliche Medium wurde getrennt abgenommen und die sekretierten Proteine aus dem Überstand mit dem AK 5313 immunpräzipitiert. Die Proteine wurden mittels 8 % SDS-PAGE getrennt und im Western Blot mit dem AK 22C11 nachgewiesen, der gerichtet ist gegen α -APPs.

Wie in Abbildung 60 zu sehen, hatten alle drei untersuchten stabil exogen koexprimierende MDCK-Einzelzellklone eine Sekretion von APP_s in das basolaterale Medium. Dieses Ergebnis ist übereinstimmend mit früheren Ergebnissen (Haass et al., 1994). Eine

Koexpression von PrP und Dpl nimmt somit keinen Einfluss auf den polarisierten Transport endogen exprimierter Proteine in dieser Zelllinie.

Zusammenfassend kann daher festgestellt werden: PrP und Dpl werden in polarisierten MDCK-Zellen unterschiedlich sortiert, wenn sie unabhängig voneinander exprimiert werden. Das hier beschriebene Ergebnis zeigt, dass eine Koexpression beider Proteine den polarisierten Transport von Dpl nicht verändert, aber zu einem Fehltransport von PrP zur apikalen Plasmamembran der Zelle führt. Die polarisierte Sekretion von APP_s zeigt außerdem, dass diese Fehlsortierung spezifisch ist für PrP und der polarisierte Transport anderer Proteine durch eine Koexpression von PrP und Dpl nicht beeinflusst wird.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Studie war, den polarisierten Transport des Prion-Proteins (PrP) und dessen homologen Proteins Doppel (Dpl) in *Madin-Darby canine kidney* (MDCK) Zellen zu untersuchen. Die gewonnenen Erkenntnisse zeigen, dass PrP das bisher einzig bekannte Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Protein ist, das in MDCK-Zellen zur basolateralen Zelloberfläche transportiert wird. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass der polarisierte Transport von PrP unabhängig ist von einem Membrananker und dem Glykosylierungsstatus; die Mannose-reichen PrP-Mutanten PrPmtGPI und PrP-M204S, die keine GPI-Verankerung besitzen, wurden effizient in das basolaterale Zellkulturmedium sekretiert. Ein Hinweis auf die Sortierungsdeterminante von PrP konnte durch die Untersuchung des polarisierten Transportes des PrP-homologen Proteins Dpl erhalten werden. Dpl, für das eine vornehmlich apikale Lokalisation gezeigt werden konnte, weist eine strukturelle Ähnlichkeit zu PrP auf, es fehlt aber die N-terminale Domäne einschließlich der Hydrophoben Domäne (HD). Die Übertragung der gesamten N-terminalen Domäne von PrP auf Dpl oder nur der HD ergaben, dass beide PrP/Dpl Chimäre basolateral sortiert wurden. Im Umkehrschluss führte die Deletion der HD in PrP zu einer apikalen Sortierung. Die HD konnte somit als ein dominantes basolaterales Sortierungssignal von PrP identifiziert werden.

4.2 MDCK-Zellen als Modellsystem

Für die Analyse eines polarisierten Transportes können sowohl Epithelzellen als auch neuronale Zellen verwendet werden. Für die Untersuchung des Sortierungsverhaltens von PrP und Dpl wurden in dieser Arbeit MDCK-Zellen verwendet, die eine epitheliale Zelllinie darstellen. MDCK-Zellen sind ein weit verbreitetes Modellsystem, um den polarisierten Transport von Proteinen zu untersuchen (Richardson et al., 1981; Bomsel et al., 1989) und die hierfür verantwortlichen Sortierungssignale zu identifizieren (Matter et al., 1992; Beau et al., 2004; Jespersen et al., 2004). Ein Vorteil von MDCK-Zellen gegenüber neuronalen Zellen ist, dass sie ein leichter zu kultivierendes System darstellen und stabil transfiziert werden können. Dies ermöglicht die Herstellung von Zelllinien, die als Einzelzellklone über längere Zeit in Kultur gehalten werden können und dabei das zu untersuchende Protein konstitutiv mit gleich bleibender Expression synthetisieren. Ein

weiterer Grund für das Auswählen der MDCK-Zellen als Modellsystem für die Untersuchung des polarisierten Transportes ist die mögliche Beteiligung epithelialer Zellen bei der oralen Aufnahme infektiöser Prionen im Gastro-Intestinal-Trakt (GIT) (Wells et al., 1994; Heppner et al., 2001; Neutra et al., 2001). Der GIT ist ausgekleidet mit Epithelzellen, wobei die apikale Seite der Zellen zum Lumen ausgerichtet ist und die basolaterale Seite den Rest der Zelle einnimmt. In dieses Epithel sind spezielle Zellen eingelagert (*membranous epithelial cells*; M-Zellen), denen wahrscheinlich eine Schlüsselstellung bei der Aufnahme pathogener Stoffe aus dem GIT zukommt (Sicinski et al., 1990; Jones et al., 1994; Neutra et al., 1996). Im Zellkulturmodell konnte gezeigt werden, dass M-Zellen PrP^{Sc} durch Transzytose von der apikalen Seite zur basolateralen Seite transportieren können (Heppner et al., 2001). PrP^{Sc} könnte demnach diese M-Zellen als Zugang zum Immunsystem nutzen, das bei der Ausbreitung der infektiösen Prion-Erkrankungen eine große Rolle spielt (Neutra et al., 2001; Aguzzi et al., 2003). So konnte auch für die unterhalb des Epithels befindlichen Peyer-Plaques eine Akkumulation von PrP^{Sc} gezeigt werden (Wells et al., 1994; Vankeulen et al., 1996). Aber nicht nur die Transzytose von PrP^{Sc}, sondern auch die Konversion des zellulären PrP^c in die pathogene Form PrP^{Sc} an sich könnte in den Epithelzellen des GIT eine Rolle spielen. Die Umwandlungsreaktion findet wahrscheinlich auf der Zelloberfläche oder in Kompartimenten des frühen endozytotischen Wegs (*rafts*) statt (Borchelt et al., 1992; Taraboulos et al., 1995). Der genaue Ort ist allerdings noch nicht bekannt; eine direkte Interaktion der beiden Proteine scheint hierbei aber wichtig zu sein (Kocisko et al., 1994; Harris, 1999; Horiuchi and Caughey, 1999). Diese Interaktion kann durch einen polarisierten Transport von PrP^c in den Epithelzellen des GIT begünstigt sein und so zu einer vermehrten Bildung und Aufnahme von PrP^{Sc} führen. Die Untersuchung des polarisierten Transportes von PrP in epithelialen Zellen kann daher aufzeigen, ob diesem eine mögliche pathophysiologische Bedeutung bei infektiösen Prion-Erkrankungen zukommt.

Auf der anderen Seite wird PrP zwar in fast allen Geweben exprimiert, eine besonders hohe Expression findet man aber vor allem in Neuronen (Bendheim et al., 1992). Neuronale Zellen besitzen wie Epithelzellen eine Polarität, deren Aufrechterhaltung durch spezifische Sortierungsmechanismen innerhalb der Zellen gewährleistet wird. Bei der Untersuchung polarisierter Transportvorgänge konnte für einige Proteine in polarisierten Epithelzellen und Neuronen eine vergleichbare Lokalisation nachgewiesen werden (Dotti and Simons, 1990). Zu diesem apikalen/axonalen bzw. basolateralen/dendritischen Modell

sind aber mittlerweile einige Ausnahmen bekannt (Simons et al., 1995; Jareb and Banker, 1998; Poyatos et al., 2000). Da in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass polarisierte Transportvorgänge sowohl Protein- als auch Zelltyp-spezifisch sind (Ahn et al., 1996; Poyatos et al., 2000; Deora et al., 2004), können die in epithelialen MDCK-Zellen gewonnenen Ergebnisse nicht kritiklos auf die physiologische Situation in Neuronen übertragen werden.

4.3 Atypisches Sortierungsverhalten von PrP

4.3.1 Basolateraler Transport von PrP

Über einen polarisierten Transport von PrP war zu Beginn dieser Arbeit nichts bekannt. In bisherigen Untersuchungen zeigten GPI-verankerte Proteine bei der Charakterisierung von polarisierten Transportvorgängen in MDCK-Zellen eine Lokalisation auf der apikalen Zelloberfläche (Brown and Rose, 1992). Dem GPI-Anker wurde deshalb ein apikales Sortierungssignal zugeschrieben (Lisanti, 1989; Le Gall et al., 1995). Untersuchungen in anderen epithelialen Zelllinien zeigten, dass dieses Signal allerdings zellspezifisch ist (Zurzolo et al., 1993). Aber auch N- bzw. O-Glykosylierungen wurden in Verbindung mit einer apikalen Sortierung in MDCK-Zellen gebracht (Scheiffele et al., 1995). Da PrP ein komplex glykosyliertes, mit einem GPI-Anker auf der Zelloberfläche verankertes Protein ist (vgl. Ergebnisse, Kapitel 1.1.3), schien ein Transport zur apikalen Plasmamembran wahrscheinlich. Aus früheren Studien war außerdem bekannt, dass PrP mit *lipid rafts* assoziiert ist (Naslavsky et al., 1997). Die Assoziation zu solchen Cholesterolsphingolipidhaltigen Mikrodomänen (*lipid rafts*) wurde ebenfalls als eine mögliche Ursache für einen apikalen Transport in MDCK-Zellen vermutet (Ikonen and Simons, 1998).

Die Untersuchungen in dieser Arbeit ergaben, dass PrP vornehmlich zur basolateralen Plasmamembran transportiert wird (vgl. Ergebnisse, Kapitel 1.1.4). Dieses Ergebnis wurde von einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt (Sarnataro et al., 2002). In ihrer Studie wurde außerdem gezeigt, dass der basolaterale Transport von PrP unabhängig ist von einer Assoziation mit *lipid rafts* (Sarnataro et al., 2002). PrP ist somit das erste GPI-verankerte und komplex glykosylierte Protein, für das eine Lokalisation auf der basolateralen Plasmamembran in MDCK-Zellen nachgewiesen werden konnte. Das in dieser Arbeit beobachtete Transportverhalten von PrP legt die Vermutung nahe, dass die post-translationalen Modifikationen entweder keinen Einfluss auf die Verteilung von PrP in

polarisierten Zellen haben oder dass sie durch ein dominantes basolaterales Sortierungssignal überdeckt werden.

4.3.2 Membranverankerung und komplexe Glykosylierung ohne Einfluss auf den basolateralen Transport von PrP

Klassische basolaterale Sortierungssignale, wie z.B. auf Tyrosin oder Dileucin basierende Aminosäuremotive (Matter et al., 1992; Mellmann, 1996), wurden bisher nur in zytoplasmatischen Domänen von Proteinen gefunden. Als GPI-verankertes Protein besitzt PrP allerdings keinen solchen zytoplasmatischen Proteinanteil. Da das Protein aber dennoch in polarisierten MDCK-Zellen basolateral transportiert wird, müssen in PrP Aminosäuresequenzen oder Domänen vorhanden sein, die den bisher identifizierten klassischen basolateralen Sortierungssignalen nicht zugeordnet werden können. Zunächst wurde deshalb der Einfluss bereits bekannter anderer Sortierungssignale von GPI-verankerten Proteinen untersucht.

Um den Einfluss einer spezifischen GPI-Verankerung auf den polarisierten Transport von PrP zu untersuchen, wurde in PrP der GPI-Anker ersetzt durch die C-terminale Transmembrandomäne des CD4 T-Zell-Oberflächenproteins der Maus. Das Protein PrP-CD4 liegt daher als typisches Transmembranprotein vor. Die Untersuchung des polarisierten Transportes von PrP-CD4 zeigte, dass PrP mit einer heterologen Membranverankerung weiterhin basolateral sortiert wurde (vgl. Ergebnisse, Kapitel 1.3.4.2). Eine spezifische GPI-Verankerung ist für eine basolaterale Sortierung von PrP anscheinend nicht notwendig. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die CD4-Domäne selbst ein basolaterales Sortierungssignal enthält. In der Literatur finden sich aber hierzu keine Hinweise. Der basolaterale Transport von PrP-CD4 ist demnach kein endgültiger Beweis für die Unabhängigkeit des basolateralen Transportes von einem GPI-Anker.

Der Einfluss einer Membranverankerung auf den polarisierten Transport von PrP wurde daher durch die Mutanten PrP-M204S und PrPmtGPI weiter untersucht. Gleichzeitig sollte das Sortierungsverhalten dieser Konstrukte auch Aufschluss über die Rolle komplexer Glykosylierung in dem Transportverhalten von PrP geben. Für PrP-M204S und PrPmtGPI ist aus früheren Untersuchungen bekannt, dass beide Proteine keine funktionale GPI- bzw. Membranverankerung besitzen und die im ER angehängten *Core*-Glykane nicht komplex modifiziert werden (Winklhofer et al., 2003b). Beide Proteine werden als Mannose-reiche Glykane in das Medium sekretiert (vgl. Ergebnisse, Kapitel 1.3.2. bzw. 1.3.3). Es konnte in

dieser Arbeit für beide Proteine eine Sekretion vornehmlich von der basolateralen Seite polarisierter MDCK-Zellen in das Zellkulturmedium festgestellt werden (vgl. Ergebnisse, Kapitel 1.3.5.2). Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass weder die Membranverankerung noch die komplexe Glykosylierung einen Einfluss auf das basolaterale Sortierungsverhalten von PrP nimmt. In der Literatur sind allerdings einige Proteine beschrieben, in denen mehrere Sortierungssignale nebeneinander vorkommen können (Jacob et al., 1999; McGwire et al., 1999). Basolaterale Signale sind hierbei dominant über apikale Signale und können diese überdecken. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die post-translationalen Modifikationen in PrP apikale Sortierungssignale darstellen, die aber durch ein dominantes basolaterales Sortierungssignal nicht zum Tragen kommen.

4.3.3 Potentielle Sortierungssignale von PrP

In der Literatur werden GPI-Verankerung und komplexe Glykosylierung als apikale Sortierungssignale diskutiert. Die Untersuchungen von PrP-CD4, PrP-M204S und PrPmtGPI zeigen aber, dass diese post-translationalen Modifikationen für das Sortierungsverhalten von PrP entweder keine Rolle spielen oder durch ein dominantes basolaterales Signal überdeckt werden. Sie nehmen somit keinen Einfluss auf den polarisierten Transport von PrP.

Einen Hinweis auf die für den basolateralen Transport von PrP verantwortliche Domäne konnte durch die Untersuchung des polarisierten Transportes des PrP-homologen Proteins Doppel (Dpl) erhalten werden. Dpl weist eine strukturelle Homologie zur C-terminalen globulären Domäne von PrP auf. Beide Proteine beinhalten in diesem Bereich komplexe Glykane, einen GPI-Anker, α -helikale Strukturen und β -Faltblätter. Die N-terminalen Domänen von PrP und Dpl zeigen dagegen deutliche Unterschiede. Dpl besitzt eine wesentlich kürzere N-terminale Domäne. Es fehlen hier Strukturen, die mit der Oktarepeatregion oder der Hydrophoben Domäne (HD) von PrP vergleichbar sind (vgl. Einleitung, Kapitel 1.4.1). Mit der Analyse des polarisierten Transportes von Dpl sollte untersucht werden, ob dessen Sortierung mit der Sortierung des homologen Proteins PrP vergleichbar ist oder sich unterscheidet. Ein ebenfalls basolateraler Transport von Dpl könnte durch Strukturen vermittelt sein, die sich in der homologen C-terminalen Domäne beider Proteine befinden. Ein unterschiedlicher Transport könnte dagegen in der unterschiedlichen N-terminalen Domäne begründet sein.

4.3.4 Unterschiedliche Sortierung von PrP und Dpl in MDCK-Zellen

Die Untersuchung des polarisierten Transportes von Dpl in MDCK-Zellen zeigte, dass Dpl im Gegensatz zu PrP eine vornehmlich apikale Lokalisation aufweist (vgl. Ergebnisse, Kapitel 1.4.4). Dies bedeutet, dass Dpl ein Sortierungsverhalten besitzt, das für komplex glykosylierte und GPI-verankerte Proteine in der Literatur beschrieben ist. Das unterschiedliche Sortierungsverhalten von PrP und Dpl könnte auf Unterschiede in deren N-terminalen Domäne beruhen. Um ein mögliches basolaterales Sortierungssignal in PrP zu analysieren, wurde daher das Sortierungsverhalten von PrP/Dpl Chimären und PrP-Mutanten analysiert.

4.3.5 Die Hydrophobe Domäne - das basolaterale Sortierungssignal

Der Vergleich des polarisierten Transportes von PrP und Dpl ergab ein unterschiedliches Sortierungsverhalten. Da die C-terminalen Domänen der beiden Proteine homolog sind, könnte ein Grund für den differentiellen Transport ein basolaterales Sortierungssignal in der N-terminalen Domäne von PrP sein. Diese enthält Domänen, wie die Oktarepeatregion (OR) und die Hydrophobe Domäne (HD), die in Dpl nicht vorhanden sind. Die Identifizierung eines Sortierungssignals kann am deutlichsten durch Übertragung des Signals auf ein anderes Protein gezeigt werden (*domain swapping*) (Lisanti and Rodriguez-Boulan, 1990; Hunziker et al., 1991). Es wurden daher PrP/Dpl Chimäre hergestellt, bei denen die gesamte N-terminale Domäne von PrP (Aminosäuren 1-133) auf Dpl übertragen wurde (PrP-N/Dpl, vgl. Ergebnisse, Abbildung 21). Ein basolaterales Sortierungssignal innerhalb der N-terminalen Domäne von PrP sollte durch Übertragung dieser Domäne auf das eigentlich apikal lokalisierte Dpl zu dessen basolateralen Transport führen. Die Untersuchung des polarisierten Transportes ergab, dass die PrP-N/Dpl Chimäre effizient zur basolateralen Plasmamembran transportiert wurden (vgl. Ergebnisse, Kapitel 1.5.1.3, Abbildung 24). Dieses Ergebnis ließ den Schluss zu, dass innerhalb der N-terminalen Domäne von PrP ein basolaterales Sortierungssignal enthalten sein muss. Als mögliches Sortierungssignal kamen insbesondere die OR (Aminosäuren 51-91) und die HD (Aminosäuren 113-133) in Frage. Es zeigte sich, dass die durch Übertragung der HD auf Dpl hergestellten Chimäre PrP-HD/Dpl (vgl. Ergebnisse, Abbildung 27) vornehmlich zur basolateralen Plasmamembran transportiert wurden (vgl. Ergebnisse, Kapitel 1.5.2.3, Abbildung 29). Die Hydrophobe Domäne in der N-terminalen Domäne von PrP konnte

somit als das basolaterale Sortierungssignal identifiziert werden. Des Weiteren zeigt dieses Ergebnis auch, dass die HD sich dominant gegenüber apikalen Sortierungssignalen innerhalb von Dpl verhält. Diese Signale werden wahrscheinlich durch die Übertragung der HD überdeckt oder inaktiviert, so dass sie keinen Einfluss mehr auf den polarisierten Transport nehmen. Die Dominanz des basolateralen Sortierungssignals HD gegenüber den apikalen Sortierungssignalen in Dpl könnte auf die strukturelle Homologie zu PrP zurückzuführen sein. Die Integration des basolateralen Sortierungssignals HD in die Struktur von Dpl ist in einer zu PrP korrespondierenden Stelle möglich. Eine Aussage über die Dominanz der HD gegenüber apikalen Signalen in anderen, nicht homologen Proteinen ist allerdings nicht ohne weiteres möglich.

Für beide Chimären konnte gezeigt werden, dass post-translationale Modifikationen und zellulärer Transport mit denen von PrP vergleichbar sind (vgl. Ergebnisse, Kapitel 1.5.1.1. und 1.5.2.1). Es kann daher ausgeschlossen werden, dass eine signifikante Fehlfaltung, unvollständige Glykosylierung oder fehlende Membranverankerung einen Einfluss auf den polarisierten Transport nehmen. Das Ergebnis des polarisierten Transportes der PrP-HD/Dpl Chimäre lässt daher den Schluss zu, dass der Transport zur basolateralen Plasmamembran durch den Einfluss der HD vermittelt wurde. Dieses Sortierungssignal weist keinerlei Homologie zu bisherigen, klassischen basolateralen Signalen auf. Der Mechanismus, der dem HD-vermittelten, basolateralen Transport zugrunde liegt, bleibt daher noch ungeklärt. Da PrP als GPI-verankertes Protein keine zytoplasmatische Domäne besitzt, ist eine Bindung an Adaptor-Proteine, wie sie für klassische basolaterale Sortierungssignale gezeigt wurde (Bonifacino and Dell'Angelica, 1999), auszuschließen. Der polarisierte Transport von PrP könnte aber z.B. durch die Ausbildung einer Struktur zustande kommen. Das basolaterale Sortierungssignal HD liegt in der unstrukturierten N-terminalen Domäne von PrP (vgl. Ergebnisse, Abb. 22). Durch Bindung an Proteine in der Sortierungsmaschinerie könnte die Ausbildung einer Struktur in diesem Bereich induziert werden, die infolge den polarisierten Transport des Proteins vermittelt. Es ist allerdings ebenso möglich, dass die Sortierung von PrP auf einen ähnlichen Mechanismus zurückzuführen ist, wie er teilweise für N-Glykosylierungen postuliert wurde. Diese können von Lektin-ähnlichen Proteinen erkannt werden, mit denen sie zusammen durch Bindung an apikale Transportvesikel an die Zelloberfläche transportiert werden (Fiedler et al., 1994). Es ist möglich, dass die HD von noch nicht identifizierten Proteinen im sekretorischen Weg erkannt wird. Der polarisierte Transport könnte dann durch

Sortierungssignale innerhalb der zytoplasmatischen Domäne des bindenden Proteins vermittelt sein.

4.3.6 Fehltransport von PrP durch Mutation oder Deletion der HD

Die oben aufgeführten Ergebnisse konnten die HD als das basolaterale Sortierungssignal identifizieren. In der Literatur ist bekannt, dass die Deletion eines dominanten Sortierungssignals zu einer Fehlsortierung des Proteins führen kann (Casanova et al., 1991; Le Bivic et al., 1991). Durch die Untersuchung des polarisierten Transportes einer PrP-Mutante mit deletierter HD (PrP Δ HD) sollte ein weiterer Beweis dafür erbracht werden, dass die HD das basolaterale Sortierungssignal darstellt.

In früheren biochemischen Untersuchungen wurde für PrP Δ HD gezeigt, dass die Deletion der HD keinen signifikanten Einfluss auf den Glykosylierungsstatus oder die GPI-Verankerung hat (Winklhofer et al., 2003b). Die Charakterisierung des polarisierten Transportes von PrP Δ HD ergab einen Fehltransport des Proteins auf die apikale Plasmamembranseite (vgl. Ergebnisse, Kapitel 1.5.3.3, Abbildung 32). Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass die Deletion des dominanten, basolateralen Sortierungssignals HD Grund für den apikalen Transport von PrP Δ HD ist. Die apikale Sortierung kann darin begründet sein, dass die Zelle das Protein ohne Selektivität in einem *default pathway* zur Zelloberfläche transportiert. Es ist aber ebenso möglich, dass durch die Deletion des basolateralen Sortierungssignals vorher verdeckte apikale Sortierungssignale aktiviert werden. Es könnten hierbei der GPI-Anker oder die komplexe Glykosylierung eine Rolle spielen.

Für die Mutation A117V ist aus früheren Untersuchungen bekannt, dass diese eine mit der Gerstmann-Sträussler-Scheinker Krankheit (GSS) assoziierte Mutation darstellt (Mastrianni et al., 1995; Tranchant et al., 1997). Der in dieser Krankheit beobachtete Phänotyp ist charakterisiert durch markante Ablagerungen von Amyloid in großen, häufig multizentrischen Plaques (Brown, 1992; Prusiner et al., 1989). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass durch Einführung von zwei zusätzlichen Mutationen (PrP-AV3; A112, 114, 117V) eine Verstärkung des für die GSS typischen Phänotyps hervorgerufen werden kann (Hegde et al., 1998). Sowohl die A117V Mutation als auch die Mutationen von PrP-AV3 liegen innerhalb des in dieser Arbeit identifizierten basolateralen Sortierungssignals HD. Es stellte sich die Frage, ob der polarisierte Transport von PrP durch diese pathogenen Mutationen beeinflusst wird.

Die Untersuchung des polarisierten Transportes von PrP-AV3 ergab, dass dieses Protein zur apikalen Plasmamembran fehlsortiert wird (vgl. Ergebnisse, Kapitel 1.6.3). Grund für diesen Fehltransport könnte eine Deaktivierung des basolateralen Sortierungssignals sein, verursacht durch die Einführung der Mutationen in die HD. Es ist möglich, dass dabei Veränderungen in der Primärsequenz oder aber in der Sekundärstruktur eine Rolle spielen. Möglicherweise in PrP vorhandene apikale Signale, die vorher durch den Einfluss der HD verdeckt waren, könnten dann zu einer apikalen Lokalisation des Proteins führen. Es ist aber ebenso plausibel, dass der Fehltransport zur apikalen Plasmamembran durch einen *default pathway* hervorgerufen wird. Das Ergebnis eines apikalen Fehltransportes von PrP-AV3 lässt vermuten, dass die Pathogenität dieser Mutante in einem Zusammenhang mit einer falschen Sortierung des Proteins stehen kann. Eine andere Möglichkeit ist allerdings, dass die Ausbildung einer transmembranen PrP-Form bei der Toxizität von PrP-AV3 eine Rolle spielt. *In vitro* Studien zeigten, dass PrP im Endoplasmatischen Retikulum (ER) in verschiedenen Topologien auftreten kann (Hegde et al., 1999). Die häufigste Form ist die ^{Sec}PrP-Form. Hier ist das Protein ganz in das ER-Lumen transloziert und mit Hilfe des GPI-Ankers an der Zellmembran verankert. Die ^{Ctm}PrP-Form liegt dagegen als Transmembranprotein vor, wobei die Hydrophobe Domäne als Transmembrananker fungiert. Der N-Terminus dieses Proteins liegt im Zytoplasma, der C-Terminus ist im Lumen mit einem GPI-Anker an der Membran verankert. Die ^{Ntm}PrP-Form liegt ebenfalls als Transmembranprotein vor; auch hier dient die HD als Transmembrananker. Dieses Protein ist allerdings nicht GPI-verankert, und es besitzt eine zur ^{Ctm}PrP-Form umgekehrte Orientierung. Hier liegt die N-terminale Domäne im Lumen. Mutationen innerhalb oder nahe der HD, wie z.B. PrP-A117V oder PrP-AV3, wurden in diesen *in vitro* Studien in Zusammenhang mit einer vermehrten Bildung der ^{Ctm}PrP-Form gebracht (Hegde et al., 1998; Hegde et al., 1999). Diese ^{Ctm}PrP favorisierenden Mutationen lösen in transgenen Mäusen spontane Neurodegeneration aus. Diese Mäuse weisen eine Pathologie auf, die der einer Prion-Erkrankung ähnlich ist (Stewart et al., 2001). Eine PrP^{Sc} Akkumulation kann hierbei allerdings nicht festgestellt werden (Stewart et al., 2001); eine Transmission der Infektion ist ebenfalls nicht möglich (Tateishi et al., 1990; Tateishi and Kitamoto, 1995). Es wurde postuliert, dass PrP^{Sc} zwar die infektiöse Form, nicht aber der alleinige Auslöser der PrP-induzierten Neurodegeneration ist. Eine vermehrte Synthese der ^{Ctm}PrP-Form wurde deshalb als eine weitere mögliche Ursache für die Pathogenese von Prion-Erkrankungen diskutiert (Hegde et al., 1999). Es besteht daher die Möglichkeit, dass die Toxizität der ^{Ctm}PrP favorisierenden PrP-AV3 Mutante nicht auf einen Fehltransport des

Proteins, sondern auf eine vermehrte Synthese dieser transmembranen PrP^{Ctm}-Form zurückzuführen ist.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Inkubation mit Phospholipase C (PIPLC) zeigt allerdings, dass PrP-AV3 fast vollständig von der Zelloberfläche abgespalten und im Überstand nachgewiesen werden kann (vgl. Ergebnisse, Abbildung 37 (B)). Die Freigabe des Proteins in den Überstand durch eine PIPLC-vermittelte Spaltung des GPI-Ankers ist aber nur möglich, wenn keine transmembrane Form vorliegt. In der Literatur wurde außerdem für PrP-AV3 im Zellkulturmodell gezeigt, dass mit Proteinase K (PK) zum großen Teil ein der ^{Sec}PrP-Form entsprechendes Fragment von der Plasmamembran abgespalten werden konnte (Stewart and Harris, 2001). Der Nachweis einer kleineren ^{Ctm}PrP-Fraktion, die durch das Vorliegen in der transmembranen Form teilweise vor PK geschützt sein sollte, gelang nicht (Stewart and Harris, 2001). Ein Grund hierfür könnte eine mit der *in vitro* Synthese verglichene wesentlich geringere Effizienz für die Bildung transmembraner PrP-Formen in Zellen sein. Es ist aber auch möglich, dass das Protein nicht effizient genug aus dem ER zur Plasmamembran transportiert wird. Diese Zellkulturdaten zeigen, dass die Expression einer PrP^{Ctm}-Form von PrP-AV3 an der Plasmamembran zu vernachlässigen ist.

4.4 Beeinflussung des polarisierten Transportes von PrP durch eine Koexpression von Dpl

Bei der Herstellung von PrP *knock out*-Mäusen traten bei einigen der generierten Mäuse spontane Degeneration von Purkinje-Zellen auf (Li et al., 2000; Rossi et al., 2001). Diese konnte auf die neuronale ektope Expression des PrP-homologen Proteins Dpl zurückgeführt werden (Rossi et al., 2001). Aber auch PrP-Mutanten, denen Teile der N-terminalen Domäne fehlen, einschließlich der HD, und somit eine strukturelle Homologie zu Dpl aufweisen, können in transgenen Mäusen Neurodegeneration auslösen (PrP Δ F) (Shmerling et al., 1998). Die Pathologie dieses als Shmerling-Syndrom bezeichneten Krankheitsbildes ist dem des durch ektope Expression von Dpl induzierten Phänotyps ähnlich. Dpl- und PrP Δ F-induzierte Neurodegeneration ist durch Vollängen PrP antagonisierbar (Shmerling et al., 1998; Rossi et al., 2001). In Mäusen mit endogener PrP Expression löst eine Expression von Dpl oder PrP Δ F dagegen keine Neurodegeneration aus (Nishida et al., 1999). Mögliche Gründe hierfür könnten eine direkte Interaktion der Proteine miteinander oder eine Konkurrenz um die Bindung an einen gemeinsamen Liganden bzw. Rezeptor sein (Shmerling et al., 1998; Weissmann and Aguzzi, 1999).

Dieser antagonistische Effekt ist allerdings auf dem Hintergrund, dass PrP und Dpl in polarisierten MDCK-Zellen ein unterschiedliches Sortierungsverhalten aufweisen, schwer nachvollziehbar. Für eine direkte Interaktion wäre die Lokalisation der Proteine auf der gleichen Plasmamembranseite Voraussetzung. Es sollte daher in dieser Arbeit durch eine Koexpression von PrP und Dpl versucht werden, eine mögliche Erklärung für die Aufhebung der Toxizität von Dpl durch PrP zu finden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine Koexpression von Dpl den basolateralen Transport von PrP verhindert. PrP ist wie Dpl nach einer Koexpression vornehmlich auf der apikalen Plasmamembran lokalisiert. Dieser Effekt ist möglicherweise auf eine Inaktivierung des basolateralen Sortierungssignals HD zurückzuführen. Diese Deaktivierung könnte durch eine Abschirmung der HD vermittelt werden. Eine direkte oder durch weitere Proteine vermittelte indirekte Interaktion von PrP und Dpl könnte zu einer Integration von PrP und Dpl in gleiche Transportvesikel führen. Sortierungssignale innerhalb von Dpl könnten dann einen apikalen Transport der beiden Proteine vermitteln. Es ist aber ebenso plausibel, dass die Bildung von PrP/Dpl-Heterodimeren eine Bindung an Rezeptoren ermöglicht. Diese Bindung könnte dann den apikalen Transport beider Proteine vermitteln. Der genaue Mechanismus des Effekts von Dpl auf den zellulären Transport von PrP bleibt allerdings zum jetzigen Zeitpunkt ungeklärt.

Die Beeinflussung des polarisierten Transportes von PrP durch Dpl liefert eine mögliche Erklärung für den antagonisierenden Effekt von PrP auf die Dpl-induzierte Neurodegeneration. Die Toxizität von Dpl könnte dadurch aufgehoben werden, dass durch den Fehltransport von PrP ein direkter Kontakt oder Interaktion der beiden Proteine zustande kommt. Es ist möglich, dass PrP und Dpl um die Bindung an einen Rezeptor oder Liganden konkurrieren. Bindung von Dpl an den Liganden in Abwesenheit von PrP könnte eine proapoptotische Kaskade auslösen, die zur Neurotoxizität führt (Shmerling et al., 1998) (Kompetitions-Modell). Es ist aber ebenso plausibel, dass die Bindung von PrP an diesen Rezeptor oder Liganden ein direktes antiapoptotisches Signal vermittelt (Weissmann and Aguzzi, 1999) (Sensibilisierungs-Modell). Ob der apikale Transport von PrP bei einer Koexpression allerdings in Zusammenhang steht mit dem Verhindern der Dpl-induzierten Neurodegeneration, kann mit den bisher gewonnenen Daten nicht belegt werden. Zum einen ist es nicht gelungen, eine direkte Interaktion der Proteine nachzuweisen. Der Nachweis einer solchen direkten Interaktion kann durch Koimmunpräzipitation der zu untersuchenden Proteine erbracht werden. Ein generelles Problem bei der Durchführung dieser Koimmunpräzipitationen in der Prion-Forschung ist

aber, dass es bisher nicht gelungen ist, experimentelle Bedingungen zu finden, die eine effiziente und auch reproduzierbare Koimmunpräzipitation von PrP oder Dpl erlauben. Um eine mögliche Interaktion der beiden Proteine weiter zu analysieren, sollten daher auch andere Techniken, wie z.B. *cross-linking*, in Betracht gezogen werden. Zum anderen können die hier in MDCK-Zellen aufgezeigten Transportvorgänge nicht direkt auf die Situation in neuronalen Zellen übertragen werden, da diese sowohl Protein- als auch Zelltyp-spezifisch sein können (Ahn et al., 1996; Poyatos et al., 2000). Es ist daher möglich, dass die in dieser Arbeit untersuchten Proteine in Neuronen schon unabhängig von einer Koexpression einen von dem in MDCK-Zellen unterschiedlichen polarisierten Transport aufweisen. Der hier in MDCK-Zellen aufgezeigte Effekt einer Koexpression von PrP und Dpl lässt daher nicht den Schluss zu, dass dieser auch in Neuronen zu beobachten ist.

Das Ergebnis der Koexpression in dieser Arbeit ist aber nicht nur interessant im Hinblick auf den antagonisierenden Effekt von PrP auf die Dpl-induzierte Neurodegeneration. Es könnte auch eine mögliche Rolle für den polarisierten Transport von PrP in der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen aufzeigen. In der Mutante PrP Δ F ist die N-terminale Domäne, einschließlich der HD (Aminosäuren 32-134), deletiert. Dieses Protein besitzt dadurch eine Homologie zu Dpl und löst in PrP *knock out*-Mäusen Neurodegeneration aus, die der Dpl-induzierten Degeneration ähnlich ist (Shmerling et al., 1998). Der durch Dpl- bzw. PrP Δ F-induzierte Phänotyp unterscheidet sich allerdings von dem klassischer Prion-Erkrankungen. Zum einen ist bei der Dpl- bzw. PrP Δ F-induzierten Degeneration nicht der gesamte Kortex betroffen. Die Neurodegeneration ist hier begrenzt auf Bereiche des Kleinhirns, wie z.B. die Körnerzellschicht oder die Purkinje-Zellen. Zum anderen konnte in transgenen Mäusen gezeigt werden, dass weder die Dpl- noch die PrP Δ F-induzierte Neurodegeneration übertragbar ist. Andere N-terminal verkürzte PrP-Mutanten, wie z.B. PrP Δ N (Aminosäure 24-89 deletiert), sind dagegen nicht in der Lage, Neurodegeneration auszulösen (Shmerling et al., 1998). Interessanterweise korreliert in den transgenen Mäusen das Auftreten von Neurodegeneration mit dem Fehlen der HD. Diese konnte in der vorliegenden Arbeit als basolaterales Sortierungssignal identifiziert werden. Da im Gegensatz zu PrP Δ N in PrP Δ F die HD nicht vorhanden ist, ist es möglich, dass die PrP Δ F-induzierte Neurodegeneration durch einen Fehltransport dieses Proteins verursacht wird. Aufgrund der Homologie von PrP Δ F zu Dpl könnten ähnliche Mechanismen für eine Toxizität verantwortlich sein. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Dpl- und PrP Δ F-induzierte Neurodegeneration durch das Wiedereinführen von Vollängen PrP verhindert

werden kann (Shmerling et al., 1998). Der bei Koexpression von Dpl in dieser Arbeit aufgezeigte apikale Transport von PrP könnte daher auch eine mögliche Erklärung für den antagonisierenden Effekt von PrP auf die PrP Δ F-induzierte Toxizität geben. Eine Koexpression von PrP Δ F könnte auch hier eine falsche Sortierung von PrP vermitteln und dadurch einen antagonisierenden Effekt auslösen. Da der polarisierte Transport von PrP Δ F allerdings noch nicht untersucht wurde, kann der Einfluss einer Fehlsortierung auf die PrP Δ F-induzierte Toxizität und den antagonisierenden Effekt von PrP nicht belegt werden.

4.5 Pathophysiologische Relevanz für Prion-Erkrankungen

Es konnte in dieser Arbeit die Hydrophobe Domäne in der N-terminalen Domäne von PrP als das dominante basolaterale Sortierungssignal identifiziert werden. In verschiedenen früheren Studien wurde gezeigt, dass das neurotoxische Potential verschiedener PrP-Mutanten abhängig ist von der Integrität dieser HD. So führt das Konstrukt PrP Δ F, bei dem die N-terminale Domäne, einschließlich der HD, von Aminosäure 32-134 entfernt ist, zu zerebellärer Neurodegeneration (Shmerling et al., 1998). Im Gegensatz dazu können N-terminal verkürzte PrP-Mutanten, bei denen die HD nicht deletiert ist, keine Degeneration induzieren (Shmerling et al., 1998). In der PrP-AV3 Mutante ist durch Einführung von Mutationen die Integrität der HD ebenfalls gestört. Es konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass auch PrP-AV3 Neurodegeneration auslöst (Hegde et al., 1998). Es ist somit denkbar, dass einer Störung des physiologischen Transportverhaltens von PrP in polarisierten Zellen eine pathophysiologische Bedeutung zukommt. Die Inaktivierung des Sortierungssignals durch Deletion, Mutation oder Maskierung könnte zu einer veränderten Lokalisation von PrP auf apikaler/axonaler zu basolateraler/dendritischer Seite der Zelle oder *vice versa* führen. Dieser Fehltransport könnte z.B. eine Bindung an Rezeptoren, Liganden oder anderen Proteinen ermöglichen und zur Toxizität des Proteins führen (*toxic gain of function*), die letztendlich zum Zelltod führt. Es ist aber ebenso plausibel, dass die Toxizität unabhängig von einem polarisierten Transport von PrP ist. Sie könnte die Konsequenz einer fehlenden oder veränderten HD sein, wodurch eine Bindung oder Interaktion mit noch nicht identifizierten Proteinen verhindert wird. Um über den Einfluss eines Fehltransportes von PrP auf die Entstehung von Neurodegenerationen genauere Aussagen machen zu können, muss daher zunächst der polarisierte Transport von PrP auch in neuronalen Zellen untersucht werden.

Der hier in Epithelzellen aufgezeigte Fehltransport von PrP, ausgelöst durch eine Inaktivierung der HD, könnte aber auch einen Einfluss auf die Empfänglichkeit von

Organismen gegenüber einer oralen Prion-Infektion nehmen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass PrP eine basolaterale Lokalisation in Epithelzellen aufweist, die HD für diesen physiologischen Transport verantwortlich ist und Mutation oder Deletion innerhalb dieses Sortierungssignals einen Fehltransport auslösen. In verschiedenen früheren Studien konnte gezeigt werden, dass PrP endogen in epithelialen Zellen des GIT exprimiert wird (Pammer et al., 2000; Ghosh, 2004). Es ist daher möglich, dass Veränderungen in der HD durch z.B. spontane Mutation in einer Fehlsortierung des in Epithelzellen des GIT exprimierten PrP resultieren. Dieser Fehltransport würde zu einer apikalen Lokalisation des Proteins führen und so im Lumen des GIT einen direkten Kontakt zwischen zellulärer und pathogener PrP-Form ermöglichen. Eine dadurch vermehrte Umwandlung von PrP in die pathogene Form könnte zu einer erhöhten Empfänglichkeit gegenüber einer Prion-Infektion und zu einer verringerten Inkubationszeit führen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zum ersten Mal eine basolaterale Lokalisation für ein komplex glykosyliertes, GPI-verankertes Protein. Es konnte in PrP die Hydrophobe Domäne als basolaterales Sortierungssignal identifiziert werden, die für das atypische Sortierungsverhalten verantwortlich ist. Die HD besitzt keinerlei Homologie zu bisher bekannten basolateralen Sortierungssignalen und kann daher dazu beitragen, die bei den Transportvorgängen beteiligten Mechanismen weiter aufzuklären. Der durch die HD vermittelte basolaterale Transport von PrP zeigt aber auch neue Aspekte für mögliche pathophysiologische Mechanismen in den transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien auf. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, dass Veränderungen in der HD zu einer fehlerhaften Sortierung von PrP führen können. Ein Fehltransport könnte PrP Neurotoxizität vermitteln oder aber bei einer Koexpression neuroprotektive Wirkung verleihen. Eine direkte Beteiligung des polarisierten Transportes an der Pathogenese von Prion-Erkrankungen ist daher durchaus plausibel und sollte in weiterführenden Arbeiten genauer analysiert werden.

5 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^c) spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese. Die auch als Prion-Erkrankung bezeichnete Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen ist einzigartig, da der Krankheitsprozess ausgelöst werden kann durch Vererbung, Infektion oder spontane Konversion von PrP^c in die pathogene Form PrP^{Sc}. Verschiedene Proteine, die in Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen stehen, z.B. das β -Amyloid-Vorläufer-Protein, die β -Sekretase oder Tau, unterliegen einem polarisierten Transport. In der vorliegenden Arbeit wurde eine vergleichende Analyse des polarisierten Transportes des Prion-Proteins und dessen homologen Proteins Doppel (Dpl) durchgeführt. Für die Charakterisierung der Transportvorgänge wurden *Madin-Darby canine kidney* Zellen (MDCK) verwendet. Diese stellen ein etabliertes epitheliales Modellsystem dar, um das Sortierungsverhalten von Proteinen in polarisierten Zellen zu untersuchen und dafür verantwortliche Sortierungssignale zu identifizieren. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, dass PrP und Dpl in MDCK-Zellen unterschiedlich transportiert werden. Für Dpl konnte ein Transport zur apikalen Plasmamembran festgestellt werden. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass PrP das erste komplex glykosylierte, mit einem Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI) verankerte Protein ist, das eine Lokalisation vornehmlich auf der basolateralen Plasmamembran aufweist. Durch die Untersuchung verschiedener PrP-Mutanten (PrP-M204S und PrPmtGPI) konnte nachgewiesen werden, dass dieser basolaterale Transport unabhängig von einer komplexen Glykosylierung oder Membranverankerung ist. Die Identifizierung eines basolateralen Sortierungssignals in PrP konnte durch die Charakterisierung verschiedener Deletionsmutanten und durch Domänenübertragung auf das PrP-homologe Protein Doppel (Dpl) erhalten werden. PrP/Dpl-Chimäre, bei denen die N-terminale Domäne von PrP auf Dpl übertragen wurde (PrP-N/Dpl), zeigten einen effizienten Transport zur basolateralen Plasmamembran. Darüber hinaus war die Übertragung der Hydrophoben Domäne (HD) von PrP auf Dpl (PrP-HD/Dpl) ausreichend, um einen basolateralen Transport von Dpl zu vermitteln. Es konnte daher in dieser Arbeit die HD innerhalb der N-terminalen Domäne von PrP als basolaterales Sortierungssignal identifiziert werden. Der Einfluss der HD auf das Transportverhalten von PrP wurde durch die Untersuchung von PrP-Mutanten mit deletierter HD (PrP Δ HD) bestätigt. Diese wurden zur apikalen Plasmamembran

fehlsortiert. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit eine mögliche pathophysiologische Bedeutung für den polarisierten Transport von PrP aufgezeigt werden. Die Einführung einer pathogenen Mutation in die HD (PrP-AV3), die in transgenen Tieren Neurodegeneration auslöst, führte zu einer Veränderung des physiologischen Transportes von PrP.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse geben einen experimentellen Beweis dafür, dass die HD für den physiologischen Transport von PrP nötig ist. Die HD stellt ein atypisches basolaterales Sortierungssignal dar, da es unabhängig von einer zytoplasmatischen Lokalisation agiert. Die Charakterisierung dieser Domäne kann daher einen Beitrag leisten, die Mechanismen und Sortierungssignale, die involviert sind in den Transportvorgängen von Proteinen, weiter aufzuklären. Es konnte weiter gezeigt werden, dass neurotoxische PrP-Mutanten mit deletierter oder mutierter HD einen Fehltransport von PrP vermitteln. Durch die Untersuchung des polarisierten Transportes können daher auch neue Aspekte für mögliche pathophysiologische Mechanismen der Prion-Erkrankungen aufgezeigt werden. Basierend auf den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen ist es möglich, dass eine fehlerhafte Sortierung von PrP eine Neurotoxizität verursacht, die an der Pathogenese von Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien beteiligt ist.

Literaturverzeichnis

- Aguzzi A., Heppner F. L., Heikenwalder M., Prinz M., Mertz K., Seeger H. and Glatzel M. (2003) Immune system and peripheral nerves in propagation of prions to CNS. *British Medical Bulletin* **66**, 141-159.
- Ahn J., Mundigl O., Muth T. R., Rudnick G. and Caplan M. J. (1996) Polarized Expression of GABA Transporters in Madin-Darby Canine Kidney Cells and Cultured Hippocampal Neurons. *J Biol Chem* **271**, 6917-6924.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Walter P. (2002) *Molecular Biology of the Cell*, 4 Edition. Garland Science.
- Alper T., Cramp W. A., Haig D. A. and Clarke M. C. (1967) Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* **214**, 764-766.
- Aronoff-Spencer E., Burns C. S., Avdievich N. I., Gerfen G. J., Peisach J., Antholine W. E., Ball H. L., Cohen F. E., Prusiner S. B. and Millhauser G. L. (2000) Identification of the Cu²⁺ binding sites in the N-terminal domain of the prion protein by EPR and CD spectroscopy. *Biochemistry* **39**, 13760-13771.
- Arreaza A. and Brown D. (1995) Sorting and Intracellular Trafficking of a Glycosylphosphatidylinositol-anchored Protein and Two Hybrid Transmembrane Proteins with the same Ectodomain in Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells. *J Biol Chem* **270**, 23641-23647.
- Balcarova-Stander J., S.E. P., Fuller S. D. and Simons K. (1984) Development of cell surface polarity in the epithelial Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell line. *Embo J* **3**, 2687-2694.
- Bastaki M., Braiterman L. T., Johns D. C., Chen Y. H. and Hubbard A. L. (2002) Absence of direct delivery for single transmembrane apical proteins or their "Secretory" forms in polarized hepatic cells. *Mol Biol Cell* **13**, 225-237.
- Beau I., Groyer-Picard M. T., Desroches A., Condamine E., Leprince J., Tome J. P., Dessen P., Vaudry H. and Misrahi M. (2004) The basolateral sorting signals of thyrotropin and luteinizing hormone receptors: an unusual family of signals sharing an unusual distal intracellular localization, but unrelated in their structures. *Mol Endocrinol* **18**, 733-746.
- Behrens A. (2003) Physiological and pathological functions of the prion protein homologue Dpl. *British Medical Bulletin* **66**, 35-42.

- Behrens A. and Aguzzi A. (2002) Small is not beautiful: antagonizing functions for the prion protein PrP^C and its homologue Dpl. *Trends in Neurosciences* **25**, 150-154.
- Behrens A., Brandner S., Genoud N. and Aguzzi A. (2001) Normal neurogenesis and scrapie pathogenesis in neural grafts lacking the prion protein homologue Doppel. *Embo J* **2**, 347-352.
- Behrens A., Genoud N., Naumann H., et al. (2002) Absence of the prion protein homologue Doppel causes male sterility. *Embo J* **21**, 3652-3658.
- Belay E. D. (1999) Transmissible spongiform encephalopathies in humans. *Annu Rev Microbiol* **53**, 283-314.
- Bendheim P. E., Brown H. R., Rudelli R. D., Scala L. J., Goller N. L., Wen G. Y., Kascsak R. J., Cashman N. R. and Bolton D. C. (1992) Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology* **42**, 149-156.
- Benting J. H., Rietveld A. G. and Simons K. (1999) N-glycans mediate the apical sorting of a GPI-anchored, raft-associated protein in Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* **146**, 313-320.
- Bernoulli C., Siegfried J., Baumgartner G., Regli F., Rabinowicz T., Gajdusek D. C. and Gibbs C. J. J. (1977) Danger of accidental person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by surgery. *Lancet* **1**, 478-479.
- Bolton D. C., McKinley M. P. and Prusiner S. B. (1982) Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* **218**, 1309-1311.
- Bomsel M., Prydz K., Parton R. G., Gruenberg J. and Simons K. (1989) Endocytosis in filter-grown Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* **109**, 3243-3258.
- Bonifacino J. S. and Dell'Angelica E. C. (1999) Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *J Cell Biol* **145**, 923-926.
- Bonilha V. L., Marmorstein A. D., Cohen G. L. and Boulan R. (1997) Apical sorting of influenza hemagglutinin by transcytosis in retinal pigment epithelium. *J. Cell. Biol.* **110**, 1717-1727.
- Borchelt D. R., Taraboulos A. and Prusiner S. B. (1992) Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* **267**, 16188-16199.
- Bravo-Zehnder M., Orio P., Norambuena A., Wallner M., Meera P., et al. (2000) Apical sorting of a voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channel alpha-subunit in Madin-Darby canine kidney cells is independent of N-glycosylation. *Proc Nat Acad Sci U S A* **97**, 13114-13119.

- Brewer C. B. and Roth M. G. (1991) A single amino acid change in the cytoplasmic domain alters the polarized delivery of influenza virus hemagglutinin. *J Cell Biol* **114**, 413-421.
- Brown D. and Breton S. (2000) Sorting proteins to their target membranes. *Kidney Int* **57**, 816-824.
- Brown D. R. and Rose J. K. (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* **68**, 533-544.
- Brown D. R., Schulz-Schaeffer W. J., Schmidt B. and Kretzschmar H. A. (1997a) Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol* **146**, 104-112.
- Brown D. R., Wong B. S., Hafiz F., Clive C., Haswell S. J. and Jones I. M. (1999) Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem J* **344**, 1-5.
- Brown D. R., Qin K., Herms J. W., Madlung A., Manson J., Strome R., Fraser P. E., Kruck T., von Bohlen A., Schulz-Schaeffer W., Giese A., Westaway D. and Kretzschmar H. (1997b) The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* **390**, 684-687.
- Brown P. (1992) The phenotypic expression of different mutations in transmissible human spongiform encephalopathy. *Rev. Neurol. (Paris)* **148**, 317-327.
- Brown P., Will R. G., Bradley R., Asher D. M. and Detwiler L. (2001) Bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease: background, evolution and current concerns. *Emerg Infect Dis* **7**, 6-16.
- Bruce M. E., Will R. G., Ironside J. W., McConnell I., Drummond D., Suttie A., McCordle L., Chree A., Hope J., Birkett C., Cousens S., Fraser H. and Bostock C. J. (1997) Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* **389**, 498-501.
- Büeler H., Raeber A., Sailer A., Fischer M., Aguzzi A. and Weissmann C. (1994) High prion and PrP^{Sc} levels but delayed onset of disease in scrapie-inoculated mice heterozygous for a disrupted PrP gene. *Mol. Med.* **1**, 19-30.
- Büeler H., Fischer M., Lang Y., Bluethmann H., Lipp H.-P., DeArmond S. J., Prusiner S. B., Aguet M. and Weissmann C. (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* **356**, 577-582.
- Cai X. D., Golde T. E. and Younkin S. G. (1993) Release of excess amyloid β protein from a mutant amyloid β protein precursor. *Science* **259**, 514-516.

- Capell A., Meyn L., Fluhrer R., Teplow D. B., Walter J. and Haass C. (2002) Apical Sorting of β -Secretase limits Amyloid β -Peptide Production. *J Biol Chem* **277**, 5637-5643.
- Casanova J. E., Apodaca G. and Mostov K. E. (1991) An autonomous signal for basolateral sorting in the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor. *Cell* **66**, 65-75.
- Cashman N. R., Loertscher R., Nalbantoglu J., Shaw I., Kascsak R. J., Bolton D. C. and Bendheim P. E. (1990) Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell* **61**, 185-192.
- Caughey B. and Raymond G. J. (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.
- Caughey B., Kocisko D. A., 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., Race R. E., Ernst D., Buchmeier M. J. and Chesebro B. (1989) Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. *J. Virol.* **63**, 175-181.
- Caughey B. W., Dong A., Bhat K. S., Ernst D., Hayes S. F. and Caughey W. S. (1991) Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry* **30**, 7672-7680.
- Chalet G. and Wolf F. J. (1964) The properties of streptavidin, a biotin-binding protein produced by Streptomycetes. *Arch. Biochem. Biophys.* **106**, 1-5.
- Chazot G., Broussolle E., et al. (1996) New variant of Creutzfeldt-Jacob disease in a 26-year-old French man. *Lancet* **347**, 1181.
- Chuang J. Z. and Sung C. H. (1998) The cytoplasmic tail of rhodopsin acts as a novel apical sorting signal in polarized MDCK cells. *J Biol Chem* **142**, 1245-1256.
- Chung J. J., Shikano S., Hanyu Y. and Li M. (2002) Functional diversity of protein C-termini: more than zipcoding? *Trends Cell Biol* **12**, 146-150.
- Citron M., Oltersdorf T., Haass C., McConlogue L., Hung A. Y., Seubert P., Vigo-Pelfrey C., Lieberburg I. and Selkoe D. J. (1992) Mutation of the β -amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases β -protein production. *Nature* **360**, 672-674.

- Collinge J. (2001) Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci* **24**, 519-550.
- Collinge J., Sidle K. C., Meads J., Ironside J. and Hill A. F. (1996) The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* **383**, 685-690.
- Collins S., McLean C. A. and Masters C. L. (2001) Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia, and kuru: a review of these less common human transmissible spongiform encephalopathies. *J Clin Neurosci* **8**, 387-397.
- Colman D. R. (1999) Neuronal polarity and the epithelial metaphor. *Neuron* **23**, 649-651.
- Creutzfeldt H. G. (1920) Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z Gesamte Neurol Psychiatrie* **57**, 1-18.
- Cuillé J. and Chelle P.-L. (1936) La maladie dite "tremblante" du mouton: est-elle inoculable? *Compte Rend Acad Sci* **203**, 1552.
- Davanipour Z., et al. (1984) Possible modes of transmission of Creutzfeldt-Jacob disease. *N Engl J Med* **311**, 1582-1583.
- De Strooper B., Craessaerts K., Dewachter L., Moechars D., Greenberg B., Van Leuven F. and Van den Berghe H. (1995) Basolateral secretion of amyloid precursor protein in Madin-Darby canine kidney cells is disturbed by alterations of intracellular pH and by introducing a mutation associated with familial Alzheimer's disease. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 4058-4065.
- Deora A. A., Gravotta D., Kreitzer G., Hu J., Bok D. and Rodriguez-Boulan E. (2004) The Basolateral Targeting Signal of CD147 (EMMPRIN) Consists of a Single Leucine and Is Not Recognized by Retinal Pigment Epithelium. *Mol Biol Cell* **15**, 4148-4165.
- Diamandis E. P. and Christopoulos T. K. (1991) The biotin-(strep) avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clin Chem* **37**, 625-636.
- Dickinson A. G., Young G. B., Stamp J. T. and Renwick C. C. (1965) An analysis of natural scrapie in Suffolk sheep. *Heredity* **20**, 485-503.
- Donne D. G., Viles J. H., Groth D., Mehlhorn I., James T. L., Cohen F. E., Prusiner S. B., Wright P. E. and Dyson H. J. (1997) Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 13452-13457.
- Dotti C. G. and Simons K. (1990) Polarized sorting of viral glycoproteins to the axon and dendrites of hippocampal neurons in culture. *Cell* **62**, 63-72.

- Duffy P., Wolf J., Collins G., DeVoe A. G., Streeten B. and Cowen D. (1974) Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* **290**, 692-693.
- Dunn M. J. (1994) Detection of proteins on blots using the avidin-biotin system. *Methods Mol Biol* **32**, 227-232.
- Endo T., Groth D., Prusiner S. B. and Kobata A. (1989) Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. *Biochemistry* **28**, 8380-8388.
- Fanning A. S. and Anderson J. M. (1999) Protein modules as organizers of membrane structure. *Curr. Opin. Cell Biol* **11**, 432-439.
- Fiedler K., Kobayashi T., Kurzchalia T. V. and Simons K. (1993) Glycosphingolipid-enriched, detergent-insoluble complexes in protein sorting in epithelial cells. *Biochemistry* **32**, 6365-6373.
- Fiedler K., Parton R. G., Kellner R., Etzold T. and Simons K. (1994) VIP36, a novel component of glycolipid rafts and exocytic carrier vesicles in epithelial cells. *Embo J* **13**, 1729-1740.
- Foletti D. L., Prekeris R. and Scheller R. H. (1999) Generation and maintenance of neuronal polarity: mechanisms of transport and targeting. *Neuron* **23**, 641-644.
- Folsch H., Ohno H., Bonifacino J. S. and Mellmann I. (1999) A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell* **99**, 189-198.
- Forbes J. R. and Cox D. W. (2000) Copper-dependent trafficking of Wilson disease mutant ATP7B proteins. *Hum Mol Genet* **9**, 1927-1935.
- Fullekrug J. and Simons K. (2004) Lipid rafts and apical membrane traffic. *Ann N Y Acad Sci* **1014**, 164-169.
- Fuller S., von Bonsdorff C.-H. and Simons K. (1984) Vesicular stomatitis virus infects and matures only through the basolateral surface of polarized epithelial cell line. *Cell* **38**, 65-77.
- Gajdusek D. C. (1996) Infectious amyloids: subacute spongiform encephalopathies as transmissible cerebral amyloidoses. *Fields virology* **3**, 2851-2899.
- Gajdusek D. C. and Zigas V. (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.
- Gerstmann J., Sträussler E. and Scheinker I. (1936) Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns. *Z Neurol* **154**, 736-762.
- Ghosh S. (2004) Mechanism of intestinal entry of infectious prion protein in the pathogenesis of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Adv Drug Del Rev* **56**, 915-920.
- Gibbson R. A. and Hunter G. D. (1967) Nature of the scrapie agent. *Nature* **215**, 1041-1043.
- Glatzel M. and Aguzzi A. (2001) The shifting biology of prions. *Brain Res Rev* **36**, 241-248.
- Gokay K. E., Young R. S. and Wilson J. M. (2001) Cytoplasmic Signals Mediate Apical Early Endosomal Targeting of Endotubulin in MDCK Cells. *Traffic* **2**, 487-500.
- Gordon W. S. (1946) Advances in veterinary research. *Vet Res* **58**, 516-520.
- Gottlieb A., Beaudry G., Rizzolo L., Colman A., Rindler M., Adesnik M. and Sabatini D. D. (1986) Secretion of endogenous and exogenous proteins from polarized MDCK cell monolayers. *Proc Nat Acad Sci U S A* **83**, 2100-2104.
- Graner E., Mercadante A. F., Zanata S. M., Forlenza O. V., Cabral A. L., Veiga S. S., Juliano M. A., Roesler R., Walz R., Minetti A., Izquierdo I., Martins V. R. and Brentani R. R. (2000) Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Brain Res Mol Brain Res* **76**, 85-92.
- Green N. M., Konieczny L., Toms E. J. and Valentine R. C. (1971) The use of bifunctional biotinyl compounds to determine the arrangement of subunits in avidin. *Biochem J* **125**, 781-791.
- Griffiths G. and Simons K. (1986) The trans-Golgi network: sorting at the exit of the Golgi complex. *Science* **234**.
- Gut A., Kappeler F., Hyka N., Balda M. S., Hauri H. P. and Matter K. (1998) Carbohydrate-mediated Golgi to cell surface transport and apical targeting of membrane proteins. *Embo J* **17**, 1919-1929.
- Haass C. and Selkoe D. J. (1993) Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell* **75**, 1039-1042.

- Haass C. and Steiner H. (2002) Alzheimer disease gamma secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases. *Trends Cell Biol* **12**, 556-562.
- Haass C., Koo E. H., Teplow D. B. and Selkoe D. J. (1994) Polarized secretion of β -amyloid precursor protein and amyloid β -peptide in MDCK cells. *Proc Nat Acad Sci U S A* **91**, 1564-1568.
- Haass C., Koo E. H., Capell A., Teplow D. B. and Selkoe D. J. (1995a) Polarized sorting of beta-amyloid precursor protein and its proteolytic products in MDCK cells is regulated by two independent signals. **128**, 537-547.
- Haass C., Lemere C. A., Capell A., Citron M., Seubert P., Schenk D., Lannfelt L. and Selkoe D. J. (1995b) The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat Med* **12**, 1291-1296.
- Hanson R. P., Eckroade R. J., Marsh R. F., Zu Rhein G. M., Kanitz C. L. and Gustafson D. P. (1971) Susceptibility of mink to sheep scrapie. *Science* **172**, 859-861.
- Hansson J. H., et al. (1995) A de novo missense mutation of the β subunit of the epithelial sodium channel causes hypertension and Liddle syndrome. Identifying a proline-rich segment critical for regulation of channel activity. *Proc Nat Acad Sci U S A* **92**, 11495-11499.
- Haraguchi T., Fisher S., Olofsson S., Endo T., Groth D., Tarentino A., Borchelt D. R., Teplow D., Hood L., Burlingame A., Lycke E., Kobata A. and Prusiner S. B. (1989) Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Arch Biochem Biophys* **274**, 1-13.
- Harmey J. H., Doyle D., Brown V. and Rogers M. S. (1995) The cellular isoform of the prion protein, PrP^c, is associated with caveolae in mouse neuroblastoma (N2a) cells. *Biochem Biophys Res Commun* **210**, 753-759.
- Harris B. Z. and Lim W. A. (2001) Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *J Cell Sci* **114**, 3219-3231.
- Harris D. A. (1999) Cellular biology of prion diseases. *Clin Microbiol Rev* **12**, 429-444.
- Hartsough G. R. and Burger D. (1965) Encephalopathy of mink: Epizootiologic and clinical observations. *J Infect Dis* **115**, 387-392.
- Hegde R. S., Tremblay P., Groth D., DeArmond S. J., Prusiner S. B. and Lingappa V. R. (1999) Transmissible and genetic prion diseases share a common pathway of neurodegeneration [see comments]. *Nature* **402**, 822-826.

- Hegde R. S., Mastrianni J. A., Scott M. R., DeFea K. A., Tremblay P., Torchia M., DeArmond S. J., Prusiner S. B. and Lingappa V. R. (1998) A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science* **279**, 827-834.
- Helenius A. and Aebi M. (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**, 2364-2369.
- Heppner F. L., Christ A. D., Klein M. A., et al. (2001) Transepithelial prion transport by M-cells. *Nat Med* **7**, 976-977.
- Hobbs H. H., et al. (1992) Molecular genetics of the LDL receptor gene familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* **1**, 445-466.
- Hope J., Morton L. J., Farquhar C. F., Multhaup G., Beyreuther K. and Kimberlin R. H. (1986) The major polypeptide of scrape-associated fibrils (SAF) has the same size, charge distribution and N-terminal protein sequence as predicted for the normal brain protein (PrP). *Embo J* **5**, 2591-2597.
- Horiuchi M. and Caughey B. (1999) Specific binding of normal prion protein to the scrapie form via a localized domain initiates its conversion to the protease-resistant state. *Embo J* **18**, 3193-3203.
- Hornemann S., Korth C., Oesch B., Riek R., Wider G., Wuthrich K. and Glockshuber R. (1997) Recombinant full-length murine prion protein, mPrP(23-231): purification and spectroscopic characterization. *FEBS Lett* **413**, 277-281.
- Hörnlimann B., Riesner D., et al. (2001) *Prionen und Prionenerkrankungen*. de Gruyter, Berlin.
- Hung A. Y. and Sheng M. (2002) PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *J Biol Chem* **277**, 5699-5702.
- Hunziker W., Harter C., Matter K. and Mellmann I. (1991) Basolateral sorting in MDCK cells requires a distinct cytoplasmic domain determinant. *Cell* **66**, 907-920.
- Hutter G., Heppner F. L. and Aguzzi A. (2003) No superoxide dismutase activity of cellular prion protein. *Biol Chem* **384**, 1279-1285.
- Ikonen E. and Simons K. (1998) Protein and lipid sorting from the *trans*-Golgi network to the plasma membrane in polarized cells. *Cell & Developmental Biology* **9**, 503-509.
- Ivanova L., Barmada S., Kummer T. and Harris D. A. (2001) Mutant prion proteins are partially retained in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **276**, 42409-42421.

- Jacob R., Preuss U., Alfalah M. and Quack S. (1999) Hierarchy of sorting signals in chimeras of intestinal lactase-phlorizin hydrolase and the influenza virus hemagglutinin. *J Biol Chem* **274**, 8061-8067.
- Jakob A. (1921) Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswerten anatomischen Befunden (spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Z Gesamte Neurol Psychatrie* **64**, 147-228.
- James T. L., Liu H., Ulyanov N. B., Farr-Jones S., Zhang H., Donne D. G., Kaneko K., Groth D., Mehlhorn I., Prusiner S. B. and Cohen F. E. (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**, 10086-10091.
- Jareb M. and Banker G. (1998) The polarized sorting of membrane proteins expressed in cultured hippocampal neurons using viral vectors. *Neuron* **20**, 855-867.
- Jarrett J. T. and Lansbury P. T., Jr. (1993) Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* **73**, 1055-1058.
- Jespersen T., Rasmussen H. B., Grunnet M., Jensen H. S., Angelo K., Dupuis D. S., Vogel L. K., Jorgensen N. K., Klaerke D. A. and Olesen S.-P. (2004) Basolateral localisation of KCNQ1 potassium channels in MDCK cells: molecular identification of an N-terminal targeting motif. *J Cell Sci* **117**, 4517-4526.
- Johnson R. T. and Gibbs C. J. J. (1998) Creutzfeldt-Jakob Disease and Related Transmissible Spongiform Encephalopathies. *N Engl J Med* **339**, 1994-2004.
- Jones B., Ghorri N. and Falkow S. (1994) Salmonella typhimurium initiated murine infection by penetrating and destroying the specialized M cells and Peyer's patches. *J Exp Med* **180**, 15-23.
- Kaneko K., Vey M., Scott M., Pilkuhn S., Cohen F. E. and Prusiner S. B. (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. K. (1997) Polarized signaling: basolateral receptor localisation in epithelial cells by PDZ-containing proteins. *Curr. Opin. Cell Biol* **9**, 853-859.
- Klatzo I., Gajdusek D. C. and Zigas V. (1959) Pathology of kuru. *Lab Invest* **8**, 799-847.

- Kocisko D. A., Come J. H., Priola S. A., Chesebro B., Raymond G. J., Lansbury P. T., Jr. and Caughey B. (1994) Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* **370**, 471-474.
- Koivisto U. M., et al. (2001) A novel cellular phenotype for familial hypercholesterolemia due to a defect in polarized targeting of the LDL receptor. *Cell* **105**, 575-585.
- Kondo K. and Kroina Y. (1981) A case control study of Creutzfeldt-Jacob disease; association with physical injuries. *Ann Neurol* **11**, 377-381.
- Kornfeld R. and Kornfeld S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* **54**, 631-664.
- Kosovsky M. J. (2000) High Throughput Analysis of Transfected Cell Lines Using BD BioCoat™ Cellware. *BD Labware; BD Biosciences* **10**, 1-5.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lasmézas I. L., Deslys J. P., Demaimay R., Adjou K. T., Lamoury F., Dormont D., Robain O., Ironside J. and Hauw J. J. (1996) BSE transmission to macaques. *Nature* **381**, 743-744.
- Le Bivic A., Sambuy Y., Patzak A., Patil N., Chao M. and Rodriguez-Boulan E. (1991) An internal deletion in the cytoplasmic tail reverses the apical localization of human NGF receptor in transfected MDCK cells. *J Cell Biol* **115**, 607-618.
- Le Gall A. H., Yeaman C., Muesch A. and Rodriguez-Boulan E. (1995) Epithelial cell polarity: new perspectives. *Semin. Nephrol.* **15**, 272-284.
- Lee I. Y., Westaway D., Smit A. F., Wang K., Seto J., Chen L., Acharya C., Ankener M., Baskin D., Cooper C., Yao H., Prusiner S. B. and Hood L. E. (1998) Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species. *Genome Res* **8**, 1022-1037.
- Legname G., Baskakov I. V., Nguyen H. O., Riesner D., Cohen F. E., DeArmond S. J. and Prusiner S. B. (2004) Synthetic Mammalian Prions. *Science* **305**, 673-676.
- Lehmann S. and Harris D. A. (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**, 21479-21487.
- Leopoldt J. G. (1759) Von denen mancherley Krankheiten des Schaafviehes, und was vor Euren damit vorgenommen werden, in *Nützliche und auf die Erfahrung gegründete*

- Einleitung zu der Landwirthschaft. Fünf Theile*, pp 344-360. Christian Friedrich Günthern, Berlin und Glogau.
- Letourneur F. and Klausner R. D. (1992) A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediated lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell* **69**, 1143-1157.
- Li A., et al. (2000) Physiological expression of the gene for PrP-like protein, PrPLP/Dpl, by brain endothelial cells and its ectopic expression in neurons of PrP-deficient mice ataxic due to Purkinje cell degeneration. *Am. J. Pathol.* **157**, 1447-1452.
- Lisanti M. P. (1989) A glycopospholipid membrane anchor acts as an apical targeting signal in polarized epithelial cells. *J. Cell. Biol.* **109**, 2145-2156.
- Lisanti M. P. and Rodriguez-Boulan E. (1990) Glycophospholipid membrane anchoring provides clues to the mechanism of protein sorting in epithelial cells. *Trends Biochem Sci* **15**, 113-118.
- Lo A. C., Haass C., Wagner S. L., Teplow D. B. and Sisodia S. S. (1994) Metabolism of the "Swedish" amyloid precursor protein variant in Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* **269**, 30966-30973.
- Lopez G. F., Zahn R., Riek R. and Wüthrich K. (2000) NMR structure of the bovine prion protein. *Proc Nat Acad Sci U S A* **97**, 8334-8339.
- Lu K., Wang W., Xie Z., Wong B. S., Li R., Petersen R. B., Sy M. S. and Chen S. G. (2000) Expression and Structural Characterization of the Recombinant Human Doppel Protein. *Biochemistry* **39**, 13575-13583.
- Lugaresi E., Medori R., Montagna P., Baruzzi A., Cortelli P., Lugaresi A., Tinuper P., Zucconi M. and Gambetti P. (1986) Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N Engl J Med* **315**, 997-1003.
- Lühns T., Riek R., Güntert P. and Wüthrich K. (2003) NMR structure of the Human Doppel Protein. *J. Mol.Biol.* **326**, 1549-1557.
- Manson J. C., et al. (1994) 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol. Neurobiol.* **8**, 121-127.
- Marella M., Lehmann S., Grassi J. and Chabry J. (2002) Filipin prevents pathological prion protein accumulation by reducing endocytosis and inducing cellular PrP release. *J Biol Chem* **277**, 25457-25464.

- Marmorstein A. D., Csaky K. G., Baffi J., Lam L., Rahaal F. and Rodriguez-Boulan E. (2000) Saturation of, and competition for entry into, the apical secretory pathway. *Proc Nat Acad Sci U S A* **97**, 3248-3253.
- Marr N., et al. (2002) Heteroligomerization of an aquaporin-2 mutant with wild-type aquaporin-2 and their misrouting to late endosomes/lysosomes explains dominant nephrogenic diabetes insipidus. *Hum Mol Genet* **11**, 779-789.
- Marzolo M. P., Bull P. and Gonzalez A. (1997) Apical sorting of hepatitis B surface antigen (HB-sAg) is independent of N-glycosylation and glycosylphosphatidylinositol-anchored protein segregation. *Proc Nat Acad Sci U S A* **94**, 1834-1839.
- Massimino M. L., Ballarin C., Bertoli A., Casonato S., Genovesi S., Negro A. and Sorgato M. C. (2004) Human Doppel and prion protein share common membrane microdomains and internalization pathways. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36**, 2016-2031.
- Mastrangelo P. and Westaway D. (2001) The prion gene complex encoding PrP(c) and Doppel: Insights from mutational analysis. *Gene* **275**, 1-18.
- Mastrianni J. A., Curtis M. T., Oberholtzer J. C., Da Costa M. M., DeArmond S., Prusiner S. B. and Garbern J. Y. (1995) Prion disease (PrP-A117V) presenting with ataxia instead of dementia. *Neurology* **45**, 2042-2050.
- Matter K. and Mellmann I. (1994) Mechanisms of cell polarity: sorting and transport in epithelial cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 545-554.
- Matter K., Hunziker W. and Mellmann I. (1992) Basolateral sorting of LDL receptor in MDCK cells: The cytoplasmic domain contains two tyrosine-dependent targeting determinants. *Cell* **71**, 741-753.
- Mc Gowan J. P. (1922) Scrapie in sheep. *Scottish J Agric* **5**, 365-375.
- Mc Kinley M. P. and Prusiner S. B. (1983) A protein of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin and ATP. *J Biol Chem* **132**, 291-298.
- McGwire G. B., Becker R. P. and Skidgel R. A. (1999) Carboxypeptidase M, a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, is localized on both the apical and basolateral domains of polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* **274**, 31632-31640.
- McRoberts J. A., Taub M. and Saier M. H. J. (1981) *The Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell line*, pp 117-139. Alan R. Liss Inc., New York.

- Mead S., Beck J., Dickinson A. G., Fisher E. M. and Collinge J. (2000) Examination of the human prion protein-like gene Doppel for genetic susceptibility to sporadic and variant Creutzfeld-Jakob disease. *Neurosci Lett* **290**, 117-120.
- Mellmann I. (1996) Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**, 575-625.
- Menasche G., et al. (2000) Mutations in Rab27A causes Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat Genet* **25**, 173-176.
- Milewski M. I., et al. (2001) A PDZ-binding motif is essential but not sufficient to localize the C-terminus of CFTR to the apical membrane. *J Cell Sci* **114**, 719-726.
- Mo H., Moore R. C., Cohen F. E., Westaway D., Prusiner S. B., Wright P. E. and Dyson H. J. (2001) Two different neurodegenerative diseases caused by proteins with similar structures. *Proc Nat Acad Sci U S A* **98**, 2352-2357.
- Moore R. C., Lee I. Y., Silverman G. L., Harrison P. M., Strome R., Heinrich C., Karunaratne A., Pasternak S. H., Chishti M. A., Liang Y., Mastrangelo P., Wang K., Smit A. F. A., Katamine S., Carlson G. A., Cohen F. E., Prusiner S. B., Melton D. W., Tremblay P., Hood L. E. and Westaway D. (1999) Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein Doppel. *J.Mol.Biol.* **292**, 797-817.
- Mostov K. E., Verges M. and Altschuler Y. (2000) Membrane traffic in polarized epithelial cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 483-490.
- Mostov K. E., Tao S. and ter Beest M. (2003) Polarized epithelial membrane traffic: conservation and plasticity. *Nat Cell Biol* **5**, 287-293.
- Mouillet-Richard S., Ermonval M., Chebassier C., Laplanche J. L., Lehmann S., Launay J. M. and Kellermann O. (2000) Signal Transduction Through Prion Protein. *Science* **289**, 1925-1928.
- Moyer B. D., et al. (1999) A PDZ-interacting domain in CFTR is an apical membrane polarization signal. *J Clin Invest* **104**, 1353-1361.
- Naslavsky N., Stein R., Yanai A., Friedlander G. and Taraboulos A. (1997) Characterization of Detergent-insoluble Complexes Containing the Cellular Prion Protein and its Scrapie Isoform. *J Biol Chem* **272**, 6324-6333.
- Neutra M. R., Frey A. and Kraehenbuhl J.-P. (1996) Epithelial M-cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell* **86**, 345-348.

- Neutra M. R., Mantis N. J. and Kraehenbuhl J.-P. (2001) Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nature Immunology* **2**, 1004-1009.
- Nicholson E. M., Mo H., Prusiner S. B., Cohen F. E. and Marqusee S. (2001) Differences between the Prion Protein and its Homolog Doppel: A Partially Structured State with Implications for Scrapie Formation. *J. Mol. Biol.* **316**, 807-815.
- Nishida N., Tremblay P., Sugimoto T., Shigematsu K., Shirabe S., Petromilli C., Erpel S. P., Nakaoka R., Atarashi R., Houtani T., Torchia M., Sakaguchi S., DeArmond S. J., Prusiner S. B. and Katamine S. (1999) A mouse prion protein transgene rescues mice deficient for the prion protein from purkinje cell degeneration and demyelination. *Lab Invest* **79**, 689-697.
- Normington K., Kohno K., Kozutsumi Y., Gething M. J. and Sambrook J. (1989) S. cerevisiae encodes an essential protein homologous in sequence and function to mammalian BiP. *Cell* **57**, 1223-1236.
- Nuoffer C., Horvath A. and Riezman H. (1993) Analysis of the sequence requirements for glycosylphosphatidylinositol anchoring of *Saccharomyces cerevisiae* Gas1 protein. *J Biol Chem* **268**, 10558-10563.
- Oesch B., Westaway D., Wälchli M., McKinley M. P., Kent S. B. H., Aebersold R., Barry R. A., Tempst P., Teplow D. B., Hood L. E., Prusiner S. B. and Weissmann C. (1985) A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* **40**, 735-746.
- Pammer J., Cross H. S., Frobert Y., Tschachler E. and Oberhuber G. (2000) The pattern of prion-related protein expression in the gastrointestinal tract. *Virchows Arch* **436**, 466-472.
- Pan K.-M., Baldwin M., Nguyen J., Gasset M., Serban A., Groth D., Mehlhorn I., Huang Z., Fletterick R. J., Cohen F. E. and Prusiner S. B. (1993) Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10962-10966.
- 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.
- Pauly P. C. and Harris D. A. (1998) Copper stimulates Endocytosis of the Prion Protein. *Biochemistry* **273**, 33107-33119.

- Pearson G. R., Gruffydd-Jones T. J., Wyatt J. M., Hope J., Chong A., Scott A. C., Dawson M. and Wells G. A. (1991) Feline spongiform encephalopathy. *Vet Rec* **128**, 532.
- Peoc'h K., Guerin C., Brandel J. P., Launay J. M. and Laplanche J. L. (2000) First report of polymorphisms in the prion-like protein gene (PRND): implications for human prion diseases. *Neurosci Lett* **286**, 144-148.
- Peters P. J., Mironov A. J., Peretz D., Van Donselaar E., Leclerc E., Erpel S. P., DeArmond S. J., Burton D. R., Williamson R. A., Vey M. and Prusiner S. B. (2003) Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *J Biol Chem* **162**, 703-717.
- Poyatos I., Ruberti F., Martinez-Maza R., Gimenez C., Dotti C. G. and Zafra F. (2000) Polarized distribution of glycine transporter isoforms in epithelial and neuronal cells. *Mol Cell* **15**, 99-111.
- Prusiner S. B. (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**, 136-144.
- Prusiner S.B., et al. (1989) Prion disease. In: McKendall, R.R. (ed.). *Handbook of clinical neurology*. Elsevier, Amsterdam. pp. 543.
- Prusiner S. B. (1991) Molecular biology of prion diseases. *Science* **252**, 1515-1522.
- Prusiner S. B., Scott M. R., DeArmond S. J. and Cohen F. E. (1998) Prion protein biology. *Cell* **93**, 337-348.
- Prusiner S. B., McKinley M. P., Groth D. F., Bowman K. A., Mock N. I., Cochran S. P. and Masiarz F. R. (1981) Scrapie agent contains a hydrophobic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 6675-6679.
- Raymond G. J., Hope J. and al. e. (1997) Molecular assessment of the potential transmissibilities of BSE and scrapie to humans. *Nature* **388**, 285-288.
- Richardson J. C. W., Scalera V. and Simmons N. L. (1981) Identification of two strains of MDCK cells which resemble separate nephron tubule segments. *Biochem Biophys Acta* **673**, 26-36.
- Rieger R., Edenhofer F., Lasmezas C. I. and Weiss S. (1997) The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *Nat Med* **3**, 1383-1388.
- Riek R., Hornemann S., Wider G., Glockshuber R. and Wuthrich K. (1997) NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett* **413**, 282-288.

- Riek R., Hornemann S., Wider G., Billeter M., Glockshuber R. and Wuthrich K. (1996) NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature* **382**, 180-182.
- Riesner D. (2003) Biochemistry and structure of PrP^C and PrP^{Sc}. *British Medical Bulletin* **66**, 21-33.
- Robbins P. W., Trimble R. B., Wirth D. F., Hering C., Maley F., Maley G. F., Das R., Gibson B. W., Royal N. and Biemann K. (1984) Primary structure of the Streptomyces enzyme endo-beta-N-acetylglucosaminidase H. *J Biol Chem* **259**, 7577-7583.
- Rogers M., Yehiely F., Scott M. and Prusiner S. B. (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.
- Rogers M., Taraboulos A., Scott M., Groth D. and Prusiner S. B. (1990) Intracellular accumulation of the cellular prion protein after mutagenesis of its Asn-linked glycosylation sites. *Glycobiology* **1**, 101-109.
- Rossi D., Cozzio A., Klein M. A., Rüllicke T., Aguzzi A. and Weissmann C. (2001) Onset of ataxia and Purkinje cell loss in PrP null mice inversely correlated with Dpl level in brain. *EMBO J* **20**, 694-702.
- Rudd P. M., Wormald M. R., Wing D. R., Prusiner S. B. and Dwek R. A. (2001) Prion glycoprotein: Structure, dynamics and roles for the sugars. *Biochemistry* **40**, 3759-3766.
- Rudd P. M., Endo T., Colominas C., Groth D., Wheeler S. F., Harvey D. J., Wormald M. R., Serban H., Prusiner S. B., Kobata A. and Dwek R. A. (1999) Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13044-13049.
- Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B. and Erlich H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sakaguchi S., Katamine S., Nishida N., Moriuchi R., Shigematsu K., Sugimoto T., Nakatani A., Kataoka Y., Houtani T., Shirabe S., Okada H., Hasegawa S., Miyamoto T. and Noda T. (1996) Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* **380**, 528-531.

- Salamero J., Sztul E. S. and Howell K. E. (1990) Exocytic transport vesicles generated in vitro from the trans-Golgi network carry secretory and plasma membrane proteins. *Proc Nat Acad Sci U S A* **87**, 7717-7721.
- Salman M. D. (2003) Chronic Wasting Disease in Deer and Elk: Scientific Facts and Findings. *J Vet Med Sci* **65**, 761-768.
- Sambrook J. and Russel D. W. (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York.
- Sarnataro D., Paladino S., Campana V., Grassi J., Nitsch L. and Zurzolo C. (2002) PrP^c is sorted to the basolateral Membrane of Epithelial Cells Independently of its Association with Rafts. *Traffic* **3**, 810-821.
- Sastre M., Steiner H., Fuchs K., Capell A., Multhaup G., Condron M. M., Teplow D. B. and Haass C. (2001) Presenilin-dependent gamma-secretase processing of veta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep.* **2**, 835-841.
- Scheiffele P., Peranen J. and Simons K. (1995) N-glycans as typical sorting signals in epithelial cells. *Nature* **378**, 96-98.
- Scott M. R., Will R., Ironside J., Nguyen H. O., Tremblay P., DeArmond S. J. and Prusiner S. B. (1999) Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 15137-15142.
- Serban D., Taraboulos A., DeArmond S. J. and Prusiner S. B. (1990) Rapid detection of Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie prion proteins. *Neurology* **40**, 110-117.
- Shmerling D., Hegyi I., Fischer M., Blättler T., Brandner S., Götz J., Rüllicke T., Flechsig E., Cozzio A., von Mehring C., Hangartner C., Aguzzi A. and Weissmann C. (1998) Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell* **93**, 203-214.
- Shyng S.-L., Huber M. T. and Harris D. A. (1993) A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *J Biol Chem* **21**, 15922-15928.
- Sicinski P., et al. (1990) Poliovirus type 1 enters the human host through intestinal M cells. *Gastroenterology* **98**, 56-58.
- Silverman G. L., Qin K., Moore R. C., Yang Y., Mastrangelo P., Tremblay P., Prusiner S. B., Cohen F. E. and Westaway D. (2000) Doppel is an N-glycosylated GPI-

- anchored protein: expression in testis and ectopic production in the brains of Prnp^{0/0} mice predisposed to Purkinje cell loss. *J. Biol. Chem.* **275**, 26834-41.
- Simons K. (1995) Biogenesis of epithelial cell surface polarity. *Harvey Lecture* **89**, 125-146.
- Simons K. and Ikonen E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572.
- Simons M., E. I., Tienari P. J., Cid-Arregui A., Monning U., Beyreuther K. and Dotti C. G. (1995) Intracellular routing of human amyloid protein precursor: axonal delivery followed by transport to the dendrites. *J Neurosci Res* **41**, 121-128.
- Somerville R. A., Ritchie L. A. and Gibson P. H. (1989) Structural and biochemical evidence that scrapie-associated fibrils assemble in vivo. *J gen Virol* **70**, 25-35.
- Stahl N., Borchelt D. R. and Prusiner S. B. (1990) Differential release of cellular and scrapie prion proteins from cellular membranes by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochemistry* **29**, 5405-5412.
- Stahl N., Borchelt D. R., Hsiao K. and Prusiner S. B. (1987) Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* **51**, 229-240.
- Stahl N., Baldwin M. A., Hecker R., Pan K. M., Burlingame A. L. and Prusiner S. B. (1992) Glycosylinositol phospholipid anchors of the scrapie and cellular prion proteins contain sialic acid. *Biochemistry* **31**, 5043-5053.
- Steiner H., Duff K., Capell A., Romig H., Grim M.G., Lincoln S., Hardy J., Yu X., Picciano K., Fichteler K., Citron R., Kopan R., Pesold B., Keck S., Baader M., Tomita T., Iwatsubo T., Baumeister R. and Haass C. (1999) A loss of function mutation of presenelin-2 interferes with amyloid beta-peptide production and notch signaling. *J Biol Chem* **274**, 28669-73.
- Stewart R. S. and Harris D. A. (2001) Most pathogenic mutations do not alter the membran topology of the Prion Protein. *J Biol Chem* **276**, 2212-2220.
- Stewart R. S., Drisaldi B. and Harris D. A. (2001) A Transmembrane Form of the Prion Protein Contains an Uncleaved Signal Peptide and Is Retained in the Endoplasmic Reticulum. *Mol Biol Cell* **12**, 881-889.
- Stimson E., Hope J., Chong A. and Burlingame A. L. (1999) Site-specific characterization of the N-linked glycans of murine prion protein by high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and exoglycosidase digestions. *Biochemistry* **38**, 4885-4895.

- Stöckel J., Safar J., Wallace A. C., Cohen F. E. and Prusiner S. B. (1998) Prion protein selectively binds copper (II) ions. *Biochemistry* **37**, 7185-7193.
- Sumudhu W., Perera W. S. and Hooper N. M. (2001) Ablation of the metal ion-induced endocytosis of the prion protein by disease-associated mutation of the octarepeat region. *Curr Biol* **11**, 519-523.
- Sunyach C., Jen A., Deng J., Fitzgerald K. T., Frobert Y., Grassi J., McCaffrey M. W. and Morris R. (2003) The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein. *Embo J* **22**, 3591-3601.
- Tagliavini F., Prelli F., Verga L., Giaccone G., Sarma R., Gorevic P., Ghetti B., Passerini F., Ghibaudi E., Forloni G., et al. (1993) Synthetic peptides homologous to prion protein residues 106-147 form amyloid-like fibrils in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 9678-9682.
- Taraboulos A., Scott M., Semenov A., Avrahami D., Laszlo L. and Prusiner S. B. (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.
- Tarentino A. L., Plummer T. H. Jr. and Maley F. (1974) The release of intact oligosaccharides from specific glycoproteins by endo-beta-N-acetylglucosaminidase H. *Journal of Biological Chemistry* **249**, 818-824.
- Tarentino A. L., Gomez C. M. and Plummer T. H. Jr. (1985) Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide: N-glycosidase F. *Biochemistry* **24**, 4665-4671.
- Tateishi J. and Kitamoto T. (1995) Inherited prion diseases and transmission to rodents. *Brain Pathol* **5**, 53-59.
- Tateishi J., Kitamoto T., Doh-ura K., Sakaki Y., Steinmetz G., Tranchant C., Warter J. M. and Heldt N. (1990) Immunochemical, molecular genetic, and transmission studies on a case of Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome. *Neurology* **40**, 1578-1581.
- Tatzelt J., Prusiner S. B. and Welch W. J. (1996) Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein. *EMBO J* **15**, 6363-6373.
- Tobler I., Gaus S. E., Deboer T., Achermann P., Fischer M., Rulicke T., Moser M., Oesch B., McBride P. A. and Manson J. C. (1996) Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* **380**, 639-642.

- Tranchant C., et al. (1997) Neurofibrillary tangles in Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome with the A117V prion gene mutation. *J. Neurol. Neurosurg.* **63**, 240-246.
- Tuzi N. L., Gall E., Melton D. and Manson J. C. (2002) Expression of Doppel in the CNS of mice does not modulate transmissible spongiform encephalopathy disease. *J gen Virol* **83**, 705-711.
- Vankeulen L. J. M., Schreuder B. E. C., Meloen R. H., Mooijharkes G., Vromans M. E. W. and Langeveld J. P. M. (1996) Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. *J Clin Microbiol* **34**, 1228-1231.
- Vey M., Pilkuhn S., Wille H., Nixon R., DeArmond S. J., Smart E. J., Anderson R. G., Taraboulos A. and Prusiner S. B. (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., Cohen F. E., Prusiner S. B., Goodin D. B., Wright P. E. and Dyson H. J. (1999) Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 2042-2047.
- Waggoner D. J., Drisaldi B., Bartnikas T. B., Casareno R. L., Prohaska J. R., Gitlin J. D. and Harris D. A. (2000) Brain copper content and cuproenzyme activity do not vary with prion protein expression level. *J Biol Chem* **275**, 7455-7458.
- Weissmann J. S. and Aguzzi A. (1999) Perspectives: neurobiology. PrPs double causes trouble. *Science* **286**, 914-915.
- Wells G. A., Dawson M., Hawkins S. A., et al. (1994) Infectivity in the ileum of cattle challenged orally with bovine spongiform encephalopathy. *Vet Res* **135**, 40-41.
- Wells G. A. H., Scott A. C., Johnson C. T., Gunning R. F., Hancock R. D., Jeffrey M., Dawson M. and Bradley R. (1987) A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.* **121**, 419-420.
- Westaway D., Mirenda C. A., Foster D., Zabarjadian Y., Scott M., Torchia M., Yang S.-L., Serban H., DeArmond S. J., Ebeling C., Prusiner S. B. and Carlson G. A. (1991) Paradoxical shortening of scrapie incubation times by expression of prion protein transgenes derived from long incubation period mice. *Neuron* **7**, 59-68.
- Wilcheck M. and Bayer E. A. (1990) Avidin-biotin technology. *Methods in Enzymology* **184**.
- Will R. G. and Matthews W. B. (1982) Evidence for case-to case transmission of Creutzfeldt-Jacob-disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **45**, 235-238.

- Will R. G., Ironside J. W., Zeidler M., Cousens S. N., Estibeiro K., Alperovitch A., Poser S., Pocchiari M., Hofman A. and Smith P. G. (1996) A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* **347**, 921-925.
- Williams E. S. and Young S. (1980) Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J Wildl Dis* **16**, 89-98.
- Wilson J. M. (1990) Polarity of endogenous and exogenous glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins in Mardin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Sci.* **96**, 143-149.
- Winklhofer K. F., Heller U., Reintjes A. and Tatzelt J. (2003a) Inhibition of complex glycosylation increases formation of PrP^{Sc}. *Traffic* **4**, 313-322.
- Winklhofer K. F., Heske J., Heller U., Reintjes A., Muranji W., Moarefi I. and Tatzelt J. (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**, 14961-14970.
- Wopfner F., Weidenhöfer G., Schneider R., von Brunn A., Gilch S., Schwarz T. F., Werner T. and Schätzl H. M. (1999) Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J Mol Biol* **289**, 1163-1178.
- Yost C. S., Lopez C. D., Prusiner S. B., Myers R. M. and Lingappa V. R. (1990) Non-hydrophobic extracytoplasmic determinant of stop transfer in the prion protein. *Nature* **343**, 669-672.
- Zahn R., Liu A., Luhrs T., Riek R., von Schroetter C., Lopez G. F., Billeter M., Calzolari L., Wider G. and Wüthrich K. (2000) NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Nat Acad Sci U S A* **97**, 145-150.
- Zeidler M., Stewart G. E., Barraclough C. R., Bateman D. E., Bates D., Burn D. J., Colchester A. C., Durward W., Fletcher N. A., Hawkins S. A., Mackenzie J. M. and Will R. G. (1997a) New variant Creutzfeldt-Jakob-disease: neurological features and diagnostic tests. *Lancet* **350**, 903-907.
- Zeidler M., Johnstone E. C., Bamber R. W. K., Dickens C. M., Fisher C. J., Francis A. F., Goldbeck R., Higgs R., Johnson-Sabine E. C., Lodge G. J., McGarry P., Mitchell S., Tarlo L., Turner M., Ryley P. and Will R. G. (1997b) New variant Creutzfeldt-Jakob disease: psychiatric features. *Lancet* **350**, 908-910.
- Zigas V. and Gajdusek D. C. (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.

- Zurzolo C., et al. (1994) VIP21/caveolin, glycosphingolipid clusters and the sorting of glycosphosphatidylinositol-anchored proteins in epithelial cells. *Embo J* **13**, 42-53.
- Zurzolo C., Lisanti M. P., Caras I. W., Nitsch L. and Rodriguez-Boulan E. (1993) Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins Are Preferentially Targeted to the Basolateral Cell Surface in Fischer Rat Thyroid Epithelial Cells. *J Cell Biol* **121**, 1031-1039.

Abkürzungsverzeichnis

β APP	<i>β-Alzheimer Precursor Protein</i> ; β -Alzheimer Vorläufer Protein
β APP _s β	Lösliches β APP entstanden durch β -Sekretase Spaltung
β APP _s α	Lösliches β APP entstanden durch α -Sekretase Spaltung
β APP CTF α	C-terminales β APP Fragment entstanden durch α -Sekretase Spaltung
β APP CTF β	C-terminales β APP Fragment entstanden durch β -Sekretase Spaltung
AICD	<i>βAPP Intracellular Domain</i> ; Intrazelluläre Domäne des β APP
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
A β	Amyloid β -Peptid
ATP	Adenosintriphosphat
BACE	β -site APP Cleaving Enzyme
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
CJK	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
C-Terminus	Carboxy-Terminus eines Proteins oder Peptids
CWD	<i>Chronic Wasting Disease</i>
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
dCTP	Deoxycytosintriphosphat
dGTP	Deoxyguanosintriphosphat
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

DOC	Desoxycholat
Dpl	Doppel; PrP-homologes Protein
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
E.Coli	Escherichia Coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EndoH	Endo- β -N-Acetylglucosamidase, Endoglykosidase H
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FKS	Fötales Kälberserum
FFI	Fatale Familiäre Insomnie
FSE	Feline Spongiforme Enzephalopathie
Glc	Glukose
GNA	N-Acetylglucosamin
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom
HD	Hydrophobe Domäne
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobasenpaare
kDa	10 ³ Dalton, Molekulargewicht von Proteinen
Man	Mannose
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney cells</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
N-Terminus	Amino-Terminus eines Proteins oder Peptids
OD _x	optische Dichte bei $\lambda = x$ nm
p3	Spaltprodukt des β APP nach α - und γ -Sekretase Spaltung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte physiologische Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Ionenkonzentration

PK	Proteinase K
PNGase F	Peptid-PNGase F
PrP	Prion-Protein
PrP ^c	zelluläres PrP
PrP ^{Sc}	Scrapie-Form des PrP
UpM	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAP	Alkalische Phosphatase (<i>shrimp alkaline phosphatase</i>)
Sarkosyl	N-Lauroylsarkosin
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecylsulfate</i>)
SOD	Superoxiddismutase
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TGN	<i>trans</i> Golgi Netzwerk
TME	Transmissible Nerz (<i>Mink</i>) Enzephalopathie
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	t-Octyl-Phenoxy-Polyethoxyethanol
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
Wt	Wild Typ Form eines Proteins
ZNS	Zentrale Nervensystem

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

Danksagung

Bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Christian Haass bedanke ich mich herzlich für das interessante Thema und die Bereitstellung bester Arbeitsbedingungen sowie für die stete enthusiastische Unterstützung während dieser Arbeit.

Das gute Gelingen dieser Arbeit wäre ohne die hervorragende Zusammenarbeit mit der Abteilung Zelluläre Biochemie von Prof. Dr. F. Ullrich Hartl am Max-Planck-Institut, Martinsried, nicht möglich gewesen. Besonders möchte ich mich daher bei PD Dr. Jörg Tatzelt und PD Dr. Konstanze F. Winklhofer für die uneingeschränkte Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die umfangreiche Betreuung, die fortwährende Unterstützung und die Bereitstellung wichtiger und wertvoller Reagenzien bedanken.

Michael Willem, Anja Capell, Sven Lammich und allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Haass danke ich für die Einführung in die Methodik der Molekularbiologie, ihre andauernde Diskussionsbereitschaft und freundliche Unterstützung.

Ohne meine Kolleginnen Regina Fluhrer, Angelika Rambold, Ann-Katrin Ludwig, Sophia Kiachopoulos, Karin Görner, Iris Henn und Sabine Odoy wäre diese Arbeit nur mit halb so viel Spaß verbunden gewesen. Danke für die Nervennahrung, unermüdliche Hilfsbereitschaft, wissenschaftliche Tipps, zahlreiche entspannende Abende und Lebenshilfe zu jeder Tages- und Nachtzeit.

Bei Frau Gertrud Zumnorde-Uelhoff und Tanja Vogt bedanke ich mich für das Korrekturlesen sowie hilfreiche Anregungen beim Zusammenstellen dieser Arbeit.

Ich danke meinem Vater, der mir meine Ausbildung ermöglicht hat und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Mein besonderer Dank gilt Jörg Köhler, der mich sehr unterstützt hat, viel Verständnis für meine Arbeit aufgebracht hat und mich immer zum Durchhalten ermutigt hat.

Curriculum vitae

Name: Armgard Uelhoff
 Geburtstag: 02.10.1973
 Geburtsort: Recklinghausen
 Staatsangehörigkeit: Deutsch
 Familienstand: Ledig

1980-1984: Grundschule Dahn

1984-1993: Otfried von Weissenburg Gymnasium, Dahn

1993-1999: Studium der Pharmazie an der Johannes-Gutenberg Universität
 Mainz

1996: 1. Staatsexamen

1998: 2. Staatsexamen

11/98 –05/99: Praktikum im Royal & Devon Hospital, Exeter, England

05/99-11/99: Praktikum in der Spitzweg Apotheke, München

1999: 3. Staatsexamen

01/00-09/00: Arbeit als Apothekerin in der Partnach Apotheke, München

09/00-10/01: Arbeit als Apothekerin in der Sani Plus Apotheke im PEP, München

10/01-03/05: Promotionsarbeit im Labor von Prof. Dr. Christian Haass
 Adolf-Butenandt-Institut, Lehrstuhl für Stoffwechselbiochemie,
 Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
 München

Thema: Polarisierter Transport des Prion-Proteins

Anhang: Publikation

A Pathogenic PrP Mutation and Doppel Interfere with Polarized Sorting of the Prion Protein*

Received for publication, December 2, 2004,
and in revised form, December 14, 2004
Published, JBC Papers in Press, December 21, 2004,
DOI 10.1074/jbc.C400560200

Armgard Uelhoff‡, Jörg Tatzelt§,
Adriano Aguzzi¶, Konstanze F. Winklhofer§||,
and Christian Haass‡

From the ‡Adolf Butenandt-Institute, Department of Biochemistry, Laboratory for Alzheimer's and Parkinson's Disease Research, Ludwig-Maximilians-University, 80336 Munich, Germany, the §Max-Planck-Institute for Biochemistry, Department of Cellular Biochemistry, 82152 Martinsried, Germany, and the ¶Institute of Neuropathology, University Hospital of Zurich, 8091 Zurich, Switzerland

Several proteins linked to neurodegenerative diseases, such as the β -amyloid precursor protein, amyloid β -peptide, β -secretase, and tau, undergo selective polarized sorting. We investigated polarized sorting of the mammalian prion protein (PrP^C) and its homologue doppel (Dpl). In contrast to Dpl, which accumulates on the apical surface, PrP^C is targeted selectively to the basolateral side in Madin-Darby canine kidney cells. An extensive deletion and domain swapping analysis revealed that the internal hydrophobic domain (HD) of PrP (amino acids 113–133) confers basolateral sorting in a dominant manner. PrP mutants lacking the HD are sorted apically, while Dpl chimeras containing the HD of PrP are directed to the basolateral membrane. Furthermore, a pathogenic PrP missense mutation within the HD leads to aberrant apical sorting of PrP as well.

A hallmark of prion diseases in humans and animals is the conversion of the cellular prion protein PrP^C into an abnormally folded isoform, designated PrP^{Sc}, which is the major component of infectious prions (reviewed in Refs. 1–4). However, transgenic animal models revealed that misfolding or mistargeting of PrP^C can induce neurodegeneration in the absence of infectious PrP^{Sc}, indicating that the neurotoxic agent might be different from the infectious agent. For instance, mutations in the hydrophobic domain (HD)¹ of PrP, like A117V and AV3 (alanines at positions 112, 114, and 117 replaced by

* This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (WI 2111/1 and SFB 596) and from the Bayerische Staatsminister für Wissenschaft, Forschung und Kunst ("for Prion" MPI3, LMU6). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

|| To whom correspondence should be addressed: Dept. of Cellular Biochemistry, Max-Planck-Institute of Biochemistry, 82152 Martinsried, Germany. Fax: 49-89-8578-2211; E-mail: winklhof@biochem.mpg.de.

¹ The abbreviations used are: HD, hydrophobic domain; ER, endoplasmic reticulum; APP, amyloid precursor protein; APPs, soluble APP; BACE, β -site APP-cleaving enzyme; GPI, glycosylphosphatidylinositol; aa, amino acid(s); MDCK, Madin-Darby canine kidney; Endo H, endo-

valines) lead to an aberrant folding of PrP during import into the endoplasmic reticulum (ER) and induce neurodegeneration in transgenic animals (5). Furthermore, neurodegeneration without the formation of PrP^{Sc} was induced by cytosolic expression of PrP^C (6). Of note, mistargeting of PrP to the cytosol was described for PrP145Stop and PrP160Stop, two mutations linked to inherited prion diseases in humans (7).

Spontaneous cerebellar neurodegeneration in certain strains of PRNP^{0/0} mice led to the discovery of doppel (Dpl), a protein structurally related to PrP^C (8). Under physiological conditions, Dpl is not expressed in the brain; however, ectopic neuronal expression of Dpl induces Purkinje cell degeneration (9, 10). Dpl shows structural homology with the C-terminal globular domain of PrP^C but lacks the N-terminal octarepeats and the HD (11). Interestingly, expression of PrP Δ F, a mutant devoid of the octarepeats and the HD (Δ 32–134), induces cerebellar degeneration similarly to Dpl. Co-expression experiments in transgenic animals revealed that full-length PrP^C can antagonize both Dpl- and PrP Δ F-induced neurodegeneration (10, 12).

Polarized sorting is an essential mechanism to establish and maintain the physiological functions of neurons and epithelial and endothelial cells. Selective trafficking is dependent on sorting signals within the cargo protein itself, on the lipid composition of membranes, and on adapter proteins of the transport machinery (reviewed in Refs. 13–16). Several proteins, which play a fundamental role in neurodegenerative diseases, like the β -amyloid precursor protein (APP) (17–20), amyloid β -peptide (A β) (17, 18), β -secretase (BACE) (21), and tau (22), undergo polarized sorting. Moreover, pathological conditions such as the familial AD-associated Swedish mutation of APP affect polarized sorting of BACE-generated soluble APP (23). While the cellular targeting of AD-associated proteins has been studied in great detail, little is known about sorting of PrP^C and its homologue Dpl.

In this study we investigated the trafficking of PrP^C and Dpl in polarized cells and found that the two proteins, which are both anchored to the plasma membrane via a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor, are sorted differentially. We identified the HD of PrP^C as a dominant signal for basolateral sorting. Moreover, we demonstrate that pathogenic mutations within the HD and the expression of Dpl interfere with the physiological sorting of PrP^C.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

cDNA Constructs—The coding region of mouse PRNP modified to express PrP-L108M/V111M was inserted into the pcDNA3.1/Zeo vector (Invitrogen), allowing detection by the 3F4 monoclonal antibody (24). Generation of the PrP mutants PrPmtGPI, PrP-M204S, and PrP Δ HD was described previously (25). To generate a Dpl-expressing construct, the coding region of mouse PRND was amplified by PCR and subcloned into the pcDNA3.1/Zeo expression vector. For co-expression of PrP-3F4 and Dpl, the coding region of PrP-3F4 was amplified by PCR and subcloned into the pcDNA6/V5-HisA/Blasticidin expression vector (Invitrogen). PrP-N/Dpl and PrP-HD/Dpl were generated by transferring aa 1–133 or aa 113–133 of mouse PrP into the corresponding site in Dpl by PCR techniques.

Cell Culture and Transfection—Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells (strain II) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, antibiotics, and glutamine.

β -N-acetylglucosaminidase H; PNGase H, peptide N-glycosidase F; PBS, phosphate-buffered saline.

Stable transfections of MDCK cells were performed with FuGENE as described by the manufacturer. Cell lines expressing either PrP or Dpl from pcDNA3.1/Zeo were selected with 200 $\mu\text{g/ml}$ zeocin; cell lines co-expressing PrP and Dpl were selected with 200 $\mu\text{g/ml}$ zeocin and 2.5 $\mu\text{g/ml}$ blasticidin. Cell lines with moderate expression levels and normal morphology were chosen for the study. To obtain polarized monolayers for surface biotinylation, cells were plated at confluence on 24-mm polycarbonate transwell filters. Media were changed every day, and cells were used for the corresponding experiment after 5 days. N2a cells were cultivated and transfected as described earlier (26).

Antibodies—Monoclonal anti-PrP antibody 3F4 (27) was purchased from Signet Pathology. The polyclonal anti-Dpl rabbit antiserum 2234 raised against recombinant Doppel was described earlier (10). Soluble APP (APPs) was immunoprecipitated with polyclonal antibody 5313 raised against the ectodomain of APP (28) and immunoblotted with monoclonal antibody 22C11 (Chemicon International).

Immunoprecipitation, Western Blotting, and Quantification Analysis—Secreted PrP mutants present in the cell culture medium were analyzed by immunoprecipitation (29) and subsequent Western blotting (30). Quantification was performed using AIDA 3.26 image analysis software (Raytest). The total amounts of protein located at/in the apical and basolateral cell surface/medium was set as 100%, and quantifications were based on at least four independent experiments.

Trypsin, Endo H, and PNGase F Digestion—Trypsin and Endo H digestions were described previously (25). For PNGase F digestion, protein lysates were adjusted to 0.1% SDS, 0.9% Triton X-100, digested overnight at 37 °C and precipitated by trichloroacetic acid.

Surface Biotinylation—MDCK cell monolayers were washed with cold PBS and incubated with sulfo-NHS-LC-biotin (1 mg/ml), either apically or basolaterally for 1 h at 4 °C. 1% bovine serum albumin in PBS was added to the opposite chamber. The reaction was stopped by washing with PBS followed by quenching with 10 mM glycine in PBS. Cells were lysed in cold lysis buffer (0.5% Triton X-100 and 0.5% sodium deoxycholate in PBS) on ice for 30 min and scraped off the filter. Lysates were clarified by centrifugation for 20 min at 14,000 $\times g$, and proteins were precipitated with streptavidin-Sepharose. Biotinylated proteins were detected by Western blotting. For the co-expression of PrP and Dpl, lysates were immunoprecipitated using the 3F4 or 2234 antibody, respectively. The immunopellet was analyzed by Western blotting using streptavidin-horseradish peroxidase conjugate. Results obtained by biotinylation were confirmed by indirect immunofluorescence experiments.

RESULTS

PrP^C and Dpl Are Differentially Sorted in Polarized Cells—MDCK cells have been used successfully to study polarized sorting of proteins linked to Alzheimer's disease. We now used this model system to study polarized trafficking of the mammalian PrP^C and its homologue Dpl. Individual clones of stably transfected MDCK cells expressing different levels of PrP^C or Dpl were selected (Fig. 1, A and B). Trafficking of PrP^C and Dpl was analyzed by cell surface biotinylation, which confirmed that PrP^C was selectively targeted to the basolateral membrane (Fig. 1C), corroborating earlier results (31). Basolateral sorting of PrP^C is unexpected, since GPI-anchored proteins are usually sorted to the apical surface (16, 32). Interestingly, sorting of Dpl is distinct from PrP^C sorting. Similarly to other GPI-anchored proteins, Dpl was sorted to the apical membrane of MDCK cells (Fig. 1D).

Co-expression of Dpl Targets PrP^C to the Apical Membrane—Neuronal expression of Dpl in PrP^C-deficient mouse strains has been shown to be responsible for cerebellar degeneration. Interestingly, co-expression of PrP^C can counteract Dpl-induced neurotoxicity (10, 33). An attractive model proposes that PrP^C and Dpl compete for a common ligand, and ligand binding to Dpl in the absence of PrP^C might initiate a neurotoxic cascade (12, 34). However, a neutralizing activity of PrP^C on Dpl-mediated neurodegeneration would be difficult to reconcile, since we found PrP^C and Dpl on opposite sites of MDCK cells.

To address this problem, we created cell lines stably expressing both PrP^C and Dpl (Fig. 2A) and analyzed if co-expression has an effect on the trafficking of PrP^C or Dpl. Co-expression did not interfere with the maturation of the individual pro-

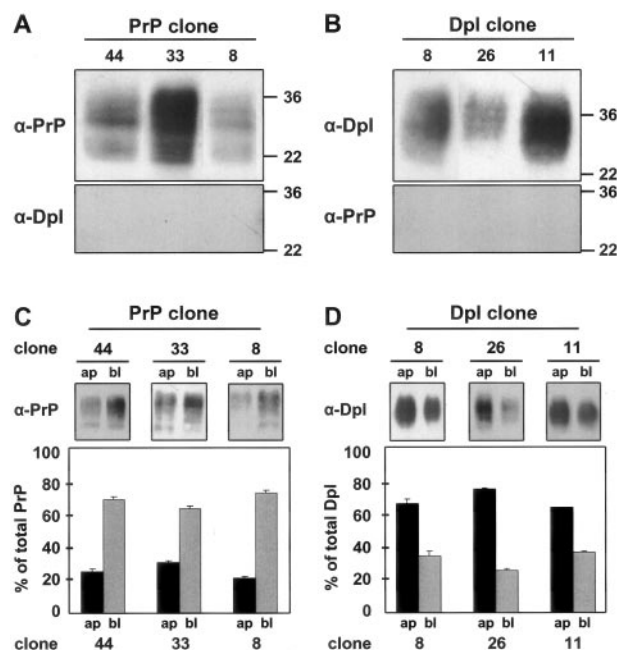


FIG. 1. PrP^C and Dpl are sorted differentially. MDCK cells were stably transfected with either PrP^C or Dpl. A and B, a Western blot analysis is shown of total cell lysates from three independently established PrP^C or Dpl clones with different expression levels. Specificity of antibodies used is shown by immunoblotting PrP clones with the polyclonal anti-Dpl antiserum 2234 (α -Dpl) and Dpl clones with the monoclonal anti-PrP antibody 3F4 (α -PrP). C and D, quantitative analysis of polarized sorting of PrP^C and Dpl. PrP^C- (C) or Dpl- (D) expressing clones shown in A and B were grown on filters for 5 days. Surface-expressed PrP^C or Dpl was selectively biotinylated from the apical (ap = apical) or basolateral (bl = basolateral) side. Biotinylated proteins were isolated from cell lysates using streptavidin-coated Sepharose and detected by immunoblotting. The relative amount of PrP^C or Dpl sorted to the apical or basolateral cell surface was determined from at least five independent experiments. The total amount of PrP^C or Dpl located on the apical and basolateral cell surface was set as 100%. Of note, the sorting behavior of either PrP^C or Dpl was independent of expression levels.

teins. Both Dpl and PrP^C were complex glycosylated and present at the cell surface (Fig. 2B). Polarized sorting of Dpl was not affected by the co-expression of PrP^C, since Dpl was still found predominantly at the apical membrane (Fig. 2C, α -Dpl). In contrast, Dpl expression had a profound effect on the sorting of PrP^C. Instead of being targeted to the basolateral site, PrP^C was found mainly at the apical membrane in the presence of Dpl (Fig. 2C, α -PrP). Notably, the effect of Dpl was selective for PrP^C, since in the presence of Dpl, APPs was still secreted from the basolateral membrane (Fig. 2C, α -APPs).

The Internal Hydrophobic Domain of PrP^C Acts as a Dominant Signal for Basolateral Sorting—To analyze polarized sorting of PrP^C mechanistically, we first addressed the role of the membrane anchor and of the complex N-linked glycans, as both post-translational modifications have been described to harbor possible sorting signals (15). PrP^C contains two partially sialylated complex N-linked glycans (35). Two different mutants, PrPmtGPI (ω site for GPI anchor attachment mutated) and PrP-M204S, are devoid of the GPI-anchor and are secreted into the cell culture medium as high mannose glycoforms (25). Similarly to wild type PrP^C, these PrP mutants were sorted basolaterally and secreted into the basolateral chamber (Fig. 2D).

In comparison to PrP^C, Dpl lacks the N-terminal unstructured region including the HD (Fig. 3A). Consequently, we asked whether this domain could contain information required for the basolateral sorting of PrP^C. Two PrP-Dpl chimeras were analyzed to address this question. PrP-N/Dpl contains the complete N-terminal domain up to amino acid 133 of PrP^C, while

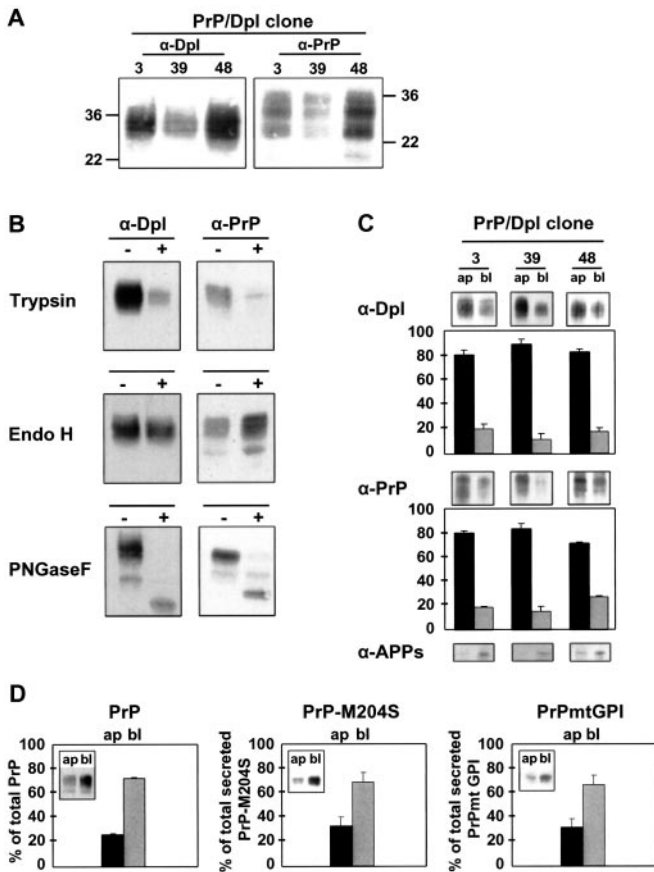


FIG. 2. Co-expression of Dpl directs PrP^C to the apical side. *A*, MDCK cells were stably transfected with both PrP^C and Dpl. A Western blot analysis is shown of total cell lysates from three independently established MDCK clones co-expressing PrP^C and Dpl with different expression levels. *B*, biochemical analysis of PrP^C and Dpl co-expressed in MDCK cells. MDCK cells stably co-expressing PrP^C and Dpl were incubated on ice with trypsin to remove cell surface proteins or mock-treated. After cell lysis, residual PrP^C and Dpl were detected by Western blotting. For analyzing the glycosylation status, cell lysates were prepared and either incubated with Endo H, PNGase F, or mock-treated prior to Western blotting. *C*, quantitative analysis of polarized sorting of PrP^C and Dpl co-expressed in MDCK cells. PrP^C- and Dpl-expressing clones shown in *A* were cell surface-biotinylated on the apical or basolateral side. After cell lysis proteins were immunoprecipitated and subsequently detected by Western blotting using a streptavidin-horseradish peroxidase conjugate. The relative amount of PrP^C or Dpl sorted to the apical or basolateral side was determined from at least four independent experiments. As a control, conditioned apical and basolateral media were collected prior to cell surface biotinylation, and immunoprecipitation was performed using the polyclonal anti-APPs antibody 5313. Secreted endogenous APPs on either side of the polarized monolayer was detected by immunoblotting using the monoclonal anti-APPs antibody 22C11 (α -APPs). *D*, basolateral sorting of PrP^C is independent of GPI anchoring and complex glycosylation. Polarized sorting of PrP^C was analyzed as described in the legend for Fig. 1, *C* and *D*. For the analysis of PrP mutants, MDCK cells stably transfected with either PrPmtGPI or PrP-M204S were grown on filters for 5 days. Conditioned media were collected, and secreted PrP mutants were immunoprecipitated and detected by immunoblotting. Quantification shows the relative amount of PrPmtGPI or PrP-M204S secreted on either side of the polarized monolayer, determined from at least six independent experiments.

for the generation of PrP-HD/Dpl only the HD of PrP^C (aa 113–133) was transferred to Dpl (Fig. 3A). First, we demonstrated that PrP-HD/Dpl was present as a complex glycosylated protein at the cell surface, suggesting that folding and maturation was not impaired (Fig. 3B). PrP-N/Dpl showed the same biochemical behavior (data not shown). However, polarized sorting of the PrP-Dpl chimera was dramatically affected. Dpl containing the N-terminal domain of PrP^C was directed to

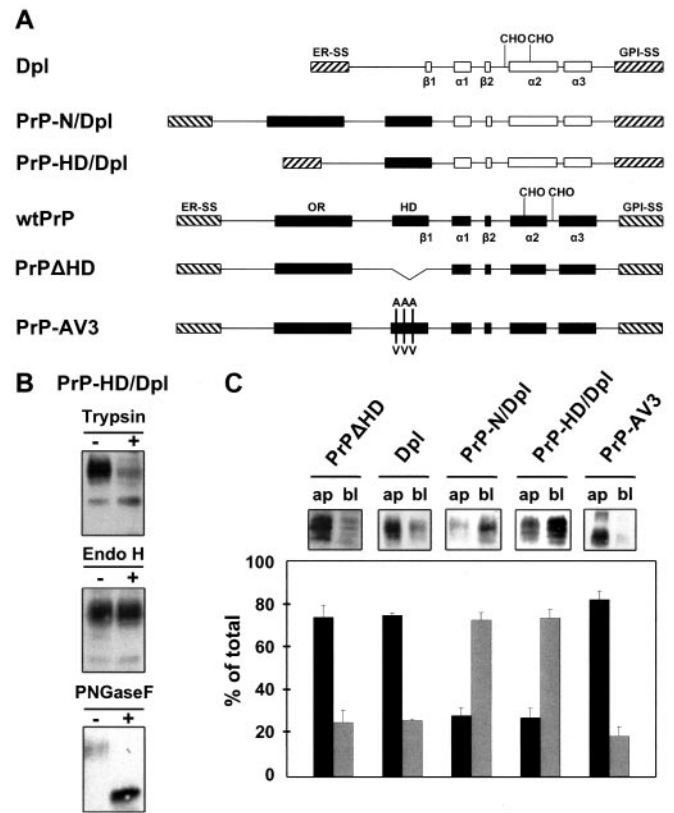


FIG. 3. The HD of PrP^C acts as a dominant sorting signal. *A*, schematic representation of the constructs analyzed. *ER-SS*, ER signal sequence; *OR*, octarepeat region; *HD*, hydrophobic domain; α 1–3, helical regions; β 1,2, β -strands; *CHO*, *N*-linked glycan attachment sites; *GPI-SS*, glycosylphosphatidylinositol anchor signal sequence; *black boxes*, domains of PrP^C; *white boxes*, domains of Dpl. *B*, biochemical characterization of PrP-HD/Dpl. N2a cells were transiently transfected to express chimeric PrP-HD/Dpl. One day after transfection, cells were incubated on ice with trypsin to remove cell surface proteins or mock-treated. After cell lysis, residual PrP-HD/Dpl was detected by Western blotting. For analyzing the glycosylation status, total cell lysates were either incubated with Endo H, PNGase F, or mock-treated prior to Western blotting. *C*, quantitative analysis of polarized sorting. Polarized sorting of the different constructs in stably transfected MDCK cells were analyzed as described in Fig. 1, *C* and *D*.

the basolateral membrane (Fig. 3C, PrP-N/Dpl). Moreover, the HD of PrP^C comprising 20 amino acids was sufficient to mediate basolateral sorting of Dpl (Fig. 3C, PrP-HD/Dpl).

To confirm the role of the HD in the trafficking of PrP^C, we analyzed a PrP mutant lacking this internal stretch of hydrophobic amino acids. Deletion of the HD has no major effect on the maturation of PrP^C (25); however, PrP Δ HD was found mainly at the apical membrane, supporting the pivotal role of the HD in basolateral sorting of PrP^C (Fig. 3C, PrP Δ HD). This observation is consistent with the mistargeting of basolaterally targeted proteins after deletion of the basolateral sorting signal (see for example Ref. 17).

A Pathogenic Mutation Interferes with Physiological Sorting of PrP^C—After having identified the HD as a dominant sorting signal for basolateral trafficking of PrP^C, we wondered whether pathogenic mutations located within this domain would affect polarized sorting. Two mutations, A117V and AV3 (alanine residues at positions 112, 114, and 117 replaced by valines) (Fig. 3A), are linked to prion diseases in humans and transgenic mice, respectively (5). In previous studies the HD domain was identified as a putative transmembran domain, and it was shown that the AV3 mutation enhanced the formation of Ctm-PrP, a transmembrane topology of PrP with the C terminus facing the ER lumen (5). However, we could not detect a trans-

membrane topology of PrP-AV3 at the cell surface (data not shown). Strikingly, cell surface biotinylation and indirect immunofluorescence (data not shown) analysis revealed that in contrast to PrP^C, PrP-AV3 was predominantly found at the apical membrane (Fig. 3C, AV3). Thus, a pathogenic mutation within the HD affects polarized sorting of PrP.

DISCUSSION

Apical sorting of GPI-anchored proteins is thought to be mediated by the GPI anchor itself, its association with lipid microdomains, or *N*- and/or *O*-linked glycosylation (15, 32). Remarkably, PrP^C is to our knowledge the only GPI-anchored protein, which is sorted to the basolateral membrane in polarized MDCK cells. Our analysis showed that PrP^C sorting is independent of a membrane anchor and the glycosylation status; secreted high mannose glycoforms of PrP lacking the GPI anchor (PrPmtGPI, PrP-M204S) were efficiently sorted to the basolateral side as well.

A clue to the sorting determinants of PrP^C was obtained by analyzing the PrP^C homologue Dpl. This protein shows a structural organization similar to that of PrP^C, but it lacks the N-terminal region including the hydrophobic domain (11). Domain swapping experiments demonstrated that the HD of PrP^C confers basolateral sorting. Dpl containing either the whole N-terminal domain of PrP^C or the HD only was sorted basolaterally, indicating that this domain acts as a dominant sorting signal. *Vice versa*, PrP^C lacking the HD was found mainly at the apical surface of MDCK cells.

The atypical and unique sorting behavior of PrP^C might be of pathophysiological relevance. Previous studies indicated that expression of PrP^{AF}, a mutant devoid of the unstructured N-terminal region including the HD (Δ 32–134), leads to cerebellar degeneration in transgenic mice. Importantly, the neurotoxic potential of PrP variants correlated with the disruption of the HD, which we identified as an important dominant sorting domain for polarized trafficking. PrP mutants lacking the N-terminal domain but containing the HD did not induce neurodegeneration (12). Moreover, we show in this study that a pathogenic mutation within the HD (PrP-AV3), which induces neurodegeneration in transgenic mice, alters the sorting of PrP^C as well. Inactivation of the sorting signal might be due to an alteration of either the primary sequence or the secondary structure.

Another interesting aspect of our study is the observation that the expression of Dpl has an impact on the sorting of PrP^C. Dpl induces cerebellar degeneration in transgenic mice, but its neurotoxic potential can be antagonized by wildtype PrP^C (10, 12). This effect is difficult to understand in the light of the differential sorting of PrP^C and Dpl. However, our co-expression studies may provide an explanation for the observations in transgenic mice. Co-expression of Dpl prevents basolateral sorting of PrP^C and directs PrP^C to the apical membrane, possibly by masking the dominant sorting signal within the HD. Thus, in cells expressing Dpl and PrP^C, both proteins are found at the same cellular locale, which could be a prerequisite for a functional interaction. Unfortunately, we could not demonstrate a direct interaction between PrP^C and Dpl. A general problem in PrP research is that no detergent conditions could be identified which allow efficient and reproducible co-immunoprecipitation experiments for either PrP^C or Dpl. It therefore will be important to employ other techniques, such as cross-linking in live cells or surface plasmon resonance with purified components, to further analyze a possible interaction of PrP^C and Dpl.

Our study provides experimental evidence that the HD is required for the physiological trafficking of PrP^C and reveals missorting of neurotoxic PrP mutants with a deleted or mutated HD. In transgenic animals expression of these mutants

induces neurodegeneration, but the mechanism of neuronal cell death is still unknown. Based on our data, it is tempting to speculate that PrP might acquire a neurotoxic potential by missorting. However, it is equally plausible that a toxic gain of function is a consequence of an aberrant or missing protein interaction involving the hydrophobic domain.

Acknowledgments—We are grateful to F. Ulrich Hartl for his continuous support and helpful discussions. We thank Drs. J. Walter and C. Kaether for critically reading the manuscript.

REFERENCES

1. Aguzzi, A., Montrasio, F., and Kaeser, P. S. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2**, 118–126
2. Collinge, J. (2001) *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 519–550
3. Prusiner, S. B., Scott, M. R., DeArmond, S. J., and Cohen, F. E. (1998) *Cell* **93**, 337–348
4. Weissmann, C., Fischer, M., Raeber, A., Büeler, H., Sailer, A., Shmerling, D., Rüllicke, T., Brandner, S., and Aguzzi, A. (1996) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **61**, 511–522
5. Hegde, R. S., Mastrianni, J. A., Scott, M. R., DeFea, K. A., Tremblay, P., Torchia, M., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., and Lingappa, V. R. (1998) *Science* **279**, 827–834
6. Ma, J., Wollmann, R., and Lindquist, S. (2002) *Science* **298**, 1781–1785
7. Heske, J., Heller, U., Winkhofer, K. F., and Tatzelt, J. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 5435–5443
8. Moore, R. C., Lee, I. Y., Silverman, G. L., Harrison, P. M., Strome, R., Heinrich, C., Karunaratne, A., Pasternak, S. H., Chishti, M. A., Liang, Y., Mastrianni, P., Wang, K., Smit, A. F. A., Katamine, S., Carlson, G. A., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., Melton, D. W., Tremblay, P., Hood, L. E., and Westaway, D. (1999) *J. Mol. Biol.* **292**, 797–817
9. Li, A., Sakaguchi, S., Shigematsu, K., Atarashi, R., Roy, B. C., Nakaoke, R., Arima, K., Okimura, N., Kopacek, J., and Katamine, S. (2000) *Am. J. Pathol.* **157**, 1447–1452
10. Rossi, D., Cozzio, A., Flechsig, E., Klein, M. A., Rulicke, T., Aguzzi, A., and Weissmann, C. (2001) *EMBO J.* **20**, 694–702
11. Mo, H., Moore, R. C., Cohen, F. E., Westaway, D., Prusiner, S. B., Wright, P. E., and Dyson, H. J. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 2352–2357
12. Shmerling, D., Hegyi, I., Fischer, M., Blättler, T., Brandner, S., Götz, J., Rüllicke, T., Flechsig, E., Cozzio, A., von Mehning, C., Hangartner, C., Aguzzi, A., and Weissmann, C. (1998) *Cell* **93**, 203–214
13. Ikonen, E., and Simons, K. (1998) *Semin. Cell Dev. Biol.* **9**, 503–509
14. Mostov, K., Su, T., and ter Beest, M. (2003) *Nat. Cell Biol.* **5**, 287–293
15. Mayor, S., and Riezman, H. (2004) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **5**, 110–120
16. Fullekrug, J., and Simons, K. (2004) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1014**, 164–169
17. Haass, C., Koo, E. H., Capell, A., Teplow, D. B., and Selkoe, D. J. (1995) *J. Cell Biol.* **128**, 537–547
18. Haass, C., Koo, E. H., Teplow, D. B., and Selkoe, D. J. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 1564–1568
19. De Strooper, B., Craessaerts, K., Dewachter, I., Moechars, D., Greenberg, B., Van Leuven, F., and Van den Berghe, H. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 4058–4065
20. Yamazaki, T., Selkoe, D. J., and Koo, E. H. (1995) *J. Cell Biol.* **129**, 431–442
21. Capell, A., Meyn, L., Flührer, R., Teplow, D. B., Walter, J., and Haass, C. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 5637–5643
22. Kosik, K. S., and Caceres, A. (1991) *J. Cell Sci. Suppl.* **15**, 69–74
23. Thinakaran, G., Teplow, D. B., Siman, R., Greenberg, B., and Sisodia, S. S. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 9390–9397
24. Gilch, S., Winkhofer, K. F., Nunziante, M., Lucassen, R., Spielhauer, C., Muranyi, W., Groschup, M. H., Riesner, D., Tatzelt, J., and Schätzl, H. M. (2001) *EMBO J.* **20**, 3957–3966
25. Winkhofer, K. F., Heske, J., Heller, U., Reintjes, A., Muranji, W., Moarefi, I., and Tatzelt, J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 14961–14970
26. Winkhofer, K. F., Reintjes, A., Hoener, M. C., Voellmy, R., and Tatzelt, J. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 45160–45167
27. Kacsak, R. J., Rubenstein, R., Merz, P. A., Tonna-DeMasi, M., Fersko, R., Carp, R. I., Wisniewski, H. M., and Diring, H. (1987) *J. Virol.* **61**, 3688–3693
28. Steiner, H., Duff, K., Capell, A., Romig, H., Grim, M. G., Lincoln, S., Hardy, J., Yu, X., Picciano, M., Fichtler, K., Citron, M., Kopan, R., Pesold, B., Keck, S., Baader, M., Tomita, T., Iwatsubo, T., Baumeister, R., and Haass, C. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 28669–28673
29. Winkhofer, K. F., Heller, U., Reintjes, A., and Tatzelt, J. (2003) *Traffic* **4**, 313–322
30. Tatzelt, J., Groth, D. F., Torchia, M., Prusiner, S. B., and DeArmond, S. J. (1999) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **58**, 1244–1249
31. Sarnataro, D., Paladino, S., Campana, V., Grassi, J., Nitsch, L., and Zurzolo, C. (2002) *Traffic* **3**, 810–821
32. Lisanti, M. P., and Rodriguez-Boulan, E. (1990) *Trends Biochem. Sci.* **15**, 113–118
33. Nishida, N., Tremblay, P., Sugimoto, T., Shigematsu, K., Shirabe, S., Petromilli, C., Erpel, S. P., Nakaoke, R., Atarashi, R., Houtani, T., Torchia, M., Sakaguchi, S., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., and Katamine, S. (1999) *Lab. Invest.* **79**, 689–697
34. Weissmann, C., and Aguzzi, A. (1999) *Science* **286**, 914–915
35. Rudd, P. M., Endo, T., Colominas, C., Groth, D., Wheeler, S. F., Harvey, D. J., Wormald, M. R., Serban, H., Prusiner, S. B., Kobata, A., and Dwek, R. A. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 13044–13049