Biogenese des Prion-Proteins:

Regulation und Fehlregulation bei Prion-Erkrankungen

Dissertation der
Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Sophia Kiachopoulos
aus Erlangen

Juni 2005

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Ferner erkläre ich, dass ich nicht anderweitig versucht habe, eine Dissertation oder Teile einer Dissertation einzureichen bzw. einer Prüfungskommission vorzulegen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

München, den 13. Juni 2005

Die vorliegende Dissertation wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Jörg Tatzelt durchgeführt und vor der Fakultät für Biologie von Prof. Dr. Thomas Cremer vertreten.

Dissertation eingereicht am 20. Juni 2005
Tag der mündlichen Prüfung am 25. Oktober 2005

Erster Gutachter: Prof. Dr. Thomas Cremer
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Erich A. Nigg
Sondergutachter: PD Dr. Jörg Tatzelt

Danksagung

Mein ganz herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Cremer.

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

Prof. Dr. Erich A. Nigg danke ich für die spontane Übernahme des Zweitgutachtens.
Für die sehr guten Arbeitsbedingungen in der Abteilung von Prof. Dr. F.-Ulrich Hartl sowie seine anregenden Fragen und Ideen bin ich ihm sehr dankbar.
Bei PD Dr. Konstanze F. Winklhofer möchte ich mich für ihre vielseitige Unterstützung und Hilfe besonders bedanken.
Für die erfolgreiche Zusammenarbeit danke ich sehr Dr. Andreas Bracher. Seine Unterstützung bei den Strukturvorhersagen hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Großer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe Tatzelt und allen Mitarbeitern der Abteilung von Prof. Dr. F.-Ulrich Hartl für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und die vielen privaten Unternehmungen. Die hier gewonnenen Freundschaften haben die drei Jahre am Max-Planck-Institut zu einem unvergesslichen Lebensabschnitt gemacht. Für die schöne gemeinsame Zeit im sowie außerhalb des Labors möchte ich mich besonders bei Iris Henn, Dr. Johanna Heske und Dr. Penelope Kay-Jackson bedanken.
Bei Dr. Johanna Heske bedanke ich mich außerdem für das Korrekturlesen dieser Arbeit und anregende Kommentare.

Schließlich möchte ich vor allem Jürgen für seine Geduld und den Rückhalt, den er mir gegeben hat, danken und Gianni dafür, dass er mir stets ein toller Bruder ist.

Mein tiefster Dank gilt meinen Eltern, die immer für mich da sind. Ihre Unterstützung und ihre Ermutigungen in allen Lebenslagen haben mir meinen bisherigen Weg sehr geebnet und mir unendlich viel geholfen.

1. EINLEITUNG 1

1.1 Prion-Erkrankungen 1

1.1.1 Einführung 1

1.1.2 Prion-Erkrankungen beim Tier 1

1.1.3 Prion-Erkrankungen beim Menschen 5

1.1.4 Transmissibilität innerhalb derselben und zwischen verschiedenen Spezies 10

1.2 Das Prion-Protein 13

1.2.1 Auf der Suche nach dem Erreger 13

1.2.2 Die zelluläre Form PrP^{C} im Vergleich zur pathogenen Isoform PrP^{Sc} 14

1.2.3 PrP^{C} besitzt eine globuläre C-terminale Domäne 15

1.2.4 Die Biogenese von PrP^{C} 18

1.2.5 Missfaltung von PrP^{C} ist kennzeichnend für Prion-Erkrankungen 20

1.2.6 Rätsel um die Funktion von PrP^{C} 23

1.2.7 Missfaltung von PrP^{C} kann zur Bildung von infektiösen Prionen und / oder Neurodegeneration führen 25

1.3 Maturierung und Faltung sekretorischer Proteine 28

1.3.1 PrP^{C} erhält zwei komplexe Glykosilierungen und eine GPI-Verankerung 28

1.3.2 Qualitätskontrollmechanismen im ER können die Bildung und den weiteren Transport missgefalteter Proteine verhindern 32

1.4 Therapeutische Ansätze bei Prion-Erkrankungen 34

1.5 Zielsetzung 39

2. MATERIAL 41

2.1 Biologisches Material 41

2.1.1 Zelllinien 41

2.1.2 Vektoren und Plasmide 41

2.1.3 Bakterienstämme 41

2.1.4 Antikörper 42
2.1.5 Enzyme und Proteine 42
2.1.6 Standardgrößenmarker für Proteine und Nukleinsäuren 43
2.1.7 Synthetische Oligonukleotide 43

2.2 Chemikalien 44

2.3 Lösungen und Puffer 46

2.4 Medien 49

2.5 Kits 50

2.6 Geräte 50

2.7 Sonstige Materialien 52

3. METHODEN 54

3.1 Rekombinante Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 54
3.1.1 Bedingungen für die PCR 55
3.1.2 Sequenzierungen 55
3.1.3 Klonierung von PrP-Mutanten 55
3.1.3.1 PrP mit deletiertem N-Terminus: PrP ΔN 56
3.1.3.2 PrP mit verkürztem N-Terminus und ohne GPI-Anker: PrP Δ27-156 ΔGPI 56
3.1.3.3 PrP mit heterologem CD4-Anker 56
3.1.3.4 PrP mit pathogenen Punktmutationen 57
3.1.3.5 PrP mit Punktmutationen 57
3.1.3.6 PrP mit Punktmutation und ohne GPI-Anker: V160W ΔGPI 58
3.1.3.7 PrP mit zytosolischer Lokalisierung: zyto PrP 58

3.2 Bakterienkultur 59
3.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien 59
3.2.2 Transformation kompetenter Bakterien 59

3.3 DNA-Präparation 60

3.4 Zellkultur 60
3.4.1 Kultivierung von Zellen 60
3.4.2 Passagierung 60
3.4.3 Ausplattieren 61
3.4.4 Transfektion 61
3.4.5 Zellernte 62

3.5 Proteinpräparation und -analyse 62
3.5.1 Nachweis der Löslichkeit 62
3.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 62
3.5.3 Proteintransfer auf Nitrocellulose (Western Blot) 63
3.5.4 Immundetektion von Proteinen 63
3.5.5 Nachweis der Glykosilierung 63
3.5.5.1 Hemmung der Glykosilierung mit Desoxymannojirimycin (DMJ) 63
3.5.5.2 Verdau mit N-Glycosidase F (PNGase F) 64
3.5.5.3 Verdau mit Endoglycosidase H (Endo H) 64
3.5.6 Nachweis von Oberflächenproteinen 65
3.5.6.1 Verdau mit Trypsin 65
3.5.6.2 Oberflächenbiotinilierung 65
3.5.7 Untersuchung der Membranverankerung 66
3.5.8 Nachweis der Sekretion 66
3.5.9 Nachweis der Wiederaufnahme von sekretierten Proteinen 66
3.5.10 Nachweis der Protease-Resistenz 67
3.5.11 Nachweis der *in vitro*-Aggregation 67
3.5.12 Radioaktive Markierung 68
3.5.13 Immunpräzipitation (IP) 68
3.5.14 Autoradiodiagramme 69
3.5.15 Behandlung mit proteasomalem Inhibitor 69
3.5.16 Behandlung mit lysosomalem Inhibitor 69
3.5.17 Behandlung mit endozytotischem Inhibitor 70
3.5.18 Behandlung mit Suramin 70
3.5.19 Behandlung mit Kupfer 70
3.5.20 Indirekte Immunfluoreszenz 71

4. ERGEBNISSE 72

4.1 Pathogene Mutationen innerhalb des hydrophoben Cores des Prion-Proteins beeinflussen die Faltung und Maturierung 72

4.1.1 Die pathogene Mutation T183A beeinflusst die Maturierung des Prion-Proteins 73

4.1.1.1 Die Mutation T182A verhindert die Umwandlung von High Mannose Glykanen in komplexe Strukturen 73

4.1.1.2 Die Mutation T182A verhindert die Übertragung des GPI-Ankers 76

4.1.1.3 Die Mutation T182A bewirkt eine Sekretion 81

4.1.2 Die Mutation T182A hat eine Missfaltung von PrP zur Folge 82

4.1.3 Sekretiertes PrP kann von Zellen wieder aufgenommen werden 84

4.1.4 Missgefaltetes T182A unterliegt keiner ER-assoziierten Degradierung . 86

4.1.5 Eine korrekte Faltung der globulären C-terminalen Domäne von PrP ist für die komplexe Glykosilierung und Anheftung des GPI-Ankers notwendig 88

4.1.5.1 Die Seitenkette von Threonin 183 stabilisiert den hydrophoben Core der globulären C-terminalen Domäne 89

4.1.5.2 Eine Destabilisierung des hydrophoben Cores verhindert die komplexe Glykosilierung und Anheftung des GPI-Ankers 91

4.1.6 Eine weitere pathogene Mutation (F198S) beeinträchtigt die Maturierung und Faltung des Prion-Proteins 94

4.1.7 Zusammenfassung 96

4.2 Wirkungsmechanismus einer Anti-Prion-Substanz: Missfaltung des Prion-Proteins an der Plasmamembran bewirkt Internalisierung und Degradierung 98

4.2.1 Suramin bewirkt eine Missfaltung von PrP^C in verschiedenen Zelllinien 98

4.2.2 Der Status der Glykosilierung und der Typ des Membranankers haben keinen Einfluss auf die Suramin-induzierte Missfaltung 99

4.2.3 Suramin-induzierte Missfaltung hängt vom proximalen Bereich der globulären C-terminalen Domäne des Prion-Proteins ab 101

4.2.4 Intrazelluläre Lokalisierung des missgefalteten Prion-Proteins hängt von seiner N-terminalen Domäne ab 103
4.2.5 Suramin-induzierte Missfaltung findet an der Plasmamembran statt 107
4.2.6 Missfaltung bewirkt rasche lysosomale Degradierung von PrP^C 110
4.2.7 Eine Missfaltung mit nachfolgender Internalisierung von PrP^C kann ebenfalls durch Kupfer erzielt werden 111
4.2.8 Kupfer-induzierte Missfaltung hängt von der unstrukturierten N-terminalen Domäne des Prion-Proteins ab 112
4.2.9 Suramin und Kupfer interferieren mit der Propagierung von PrP^{Sc} 113
4.2.10 Zusammenfassung 115

5. DISKUSSION 117

5.1 Pathogene Mutationen destabilisieren den hydrophoben Core und interferieren mit der Maturierung von PrP 117
5.1.1 Faltung und posttranslationale Modifikationen von PrP 119
5.1.2 Das pathogene Potential von T183A und F198S 121

5.2 Missfaltung von PrP^C an der Plasmamembran führt zur raschen Internalisierung und verhindert die Bildung von PrP^{Sc} 123
5.2.1 Der unstrukturierte N-Terminus von PrP^C vermittelt eine Internalisierung von missgefalteten PrP-Formen 124
5.2.2 Internalisierung von PrP^C als potentielle Anti-Prion-Strategie 126

5.3 Ausblick 127

6. ZUSAMMENFASSUNG 130

7. GLOSSAR 132

8. LITERATURVERZEICHNIS 136

9. LEBENSLAUF 158

10. PUBLIKATIONEN 159

1. Einleitung

1.1 Prion-Erkrankungen

1.1.1 Einführung

Prion-Erkrankungen sind tödlich verlaufende, neurodegenerative Erkrankungen, die sowohl beim Tier als auch beim Menschen auftreten (Prusiner *et al.* 1998; Belay 1999; Collinge 2001; Collins *et al.* 2001). Aufgrund ihrer Übertragbarkeit (Transmissibilität) und Pathologie – eine schwammartige (*sponge*, Schwamm) Hirndegeneration – werden Prion-Erkrankungen auch als transmissible spongiforme Enzephalopathien bezeichnet. Neben spongiformen Veränderungen, die lichtmikroskopisch als Durchlöcherung (Vakuolisierung) des Hirngewebes wahrgenommen werden, sind auch astrozytäre Gliose und Ablagerungen des Prion-Proteins (Plaques) im Gehirn zu finden. Prion-Erkrankungen zeichnen sich durch eine lange Inkubationszeit und einen äußerst progressiven Krankheitsverlauf aus. Die Hirndegeneration zieht typische neurologische Symptome, wie Verhaltens- und Bewegungsstörungen nach sich.
Die Einzigartigkeit der Prion-Erkrankungen besteht darin, dass sie nicht nur sporadischen oder hereditären, sondern auch infektiösen Ursprungs sein können. Letztere Eigenschaft unterscheidet diese von anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimerschen oder Parkinsonschen Krankheit.

1.1.2 Prion-Erkrankungen beim Tier

Folgende Prion-Erkrankungen sind bei Tieren bekannt (vgl. Tab. 1): Die Traberkrankheit (Scrapie) bei Schafen und Ziegen, die Transmissible Nerz Enzephalopathie (***T**ransmissible **M**ink **E**ncephalopathy*, TME), die chronisch zehrende Hirschkrankheit (***C**hronic **W**asting **D**isease*, CWD) bei frei lebenden Hirschen, die **B**ovine **S**pongiforme **E**nzephalopathie (BSE) bei Rindern, die Exotische Huftier Enzephalopathie (***E**xotic **U**ngulate **E**ncephalopathy*, EUE) bei rinderartigen

Wiederkäuern im Zoo, wie beispielsweise Antilopen und die **F**eline **S**pongiforme **E**nzephalopathie (FSE) bei Haus- und Wildkatzen (Leopoldt 1759; Hartsough und Burger 1965; Williams und Young 1980; Wells *et al.* 1987; Pearson *et al.* 1991).

Krankheit	**Betroffene Tierart**	**Jahr der Erstdokumentation und Ort des Auftretens**	**Ursache**
Scrapie	Schaf	1732, GB	unbekannt
TME	Nerz	1974, USA	Infektion
CWD	Hirsch	1980, USA	unbekannt
BSE	Rind	1986, GB	Infektion
EUE	Zootiere	1986, GB	Infektion
FSE	Katze	1990, GB	Infektion

Tabelle 1: Prion-Erkrankungen der Tiere. TME: *Transmissible Mink Enzephalopathie*; CWD: *Chronic Wasting Disease*; BSE: Bovine Spongiforme Enzephalopathie; EUE: Exotische Huftier-Enzephalopathie; FSE: Feline Spongiforme Enzephalopathie.

Im Folgenden wird auf Scrapie der Schafe und die BSE der Rinder eingegangen, da diese Prion-Erkrankungen aus epidemiologischer, sowie wirtschaftlicher Sicht am folgenschwersten waren.

Die häufigste natürliche Prion-Erkrankung ist Scrapie beim Schaf. Diese ist seit 1732 bekannt und zum ersten Mal in Großbritannien aufgetreten (McGowan 1922). Scrapie hat sich dort kurz darauf rasch ausgebreitet. In Deutschland wurde bereits im Jahr 1759 publiziert, dass es sich um eine übertragbare Krankheit handelt (Leopoldt 1759). Im Jahr 1898 wurden erstmals pathologische Veränderungen im Gehirn kranker Schafe beschrieben (Besnoit und Morel 1898). Da erkrankte Tiere ihre Bewegungen nicht mehr koordinieren können, wird ihr Gang schwankend und trabend. Daher bezeichnet man die Scrapie auch als Traberkrankheit. Außerdem sind die betroffenen Tiere sehr schreckhaft und werden von einem intensiven Juckreiz heimgesucht, so dass sie sich durch ständiges Kratzen (*to scrape*, sich kratzen) und Scheuern selbst schwere Fellschäden zufügen.

Schon Mitte des 18. Jahrhunderts reichten britische Farmer aufgrund erheblicher wirtschaftlicher Einbußen auf höchster politischer Ebene eine Petition zur Scrapie-

Bekämpfung ein. Kurz darauf wurde im englischen Parlament über die Folgen der Scrapie für die Textilindustrie diskutiert (Journal of the House of Commons, 1755). Zwischen 1920 und 1950 waren besonders englische Suffolk-Schafe von Scrapie betroffen, was erneut zu großen finanziellen Verlusten führte. Der internationale Handel mit Suffolk-Schafen aus Großbritannien war vermutlich für die Einschleppung von Scrapie in viele andere Länder verantwortlich (Hourrigan *et al.* 1979). Heute sind weltweit verschiedene Schafrassen betroffen. In England wurde schließlich 1993 die Meldepflicht für Scrapie eingeführt. Viele Tierhalter schrecken jedoch immer noch aus ökonomischen Gründen davor zurück, verdächtige Fälle anzuzeigen.

Die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE), auch als Rinderwahnsinn bekannt, ist erstmals im Jahr 1986 in Großbritannien aufgetreten (Wells *et al.* 1987). Der englische Veterinärmediziner Gerald Wells und seine Kollegen entdeckten in Gewebeschnitten eines Rinderhirns eine lichtmikroskopisch sichtbare Durchlöcherung und erkannten, dass es sich um eine neuartige Rinderkrankheit mit eigenem Krankheitsbild handelte. Befallene Rinder verlieren, ähnlich wie Scrapie-infizierte Schafe, die Kontrolle über ihre Bewegungen, sind außergewöhnlich schreckhaft und bekommen einen starren Blick. Innerhalb weniger Jahre hat sich BSE in Großbritannien zu einer Epidemie ausgeweitet. Der britische Epidemiologe John W. Wilesmith erkannte schließlich die mögliche Ursache für die plötzlich massive Verbreitung der BSE: die Verfütterung von Rindermischfutter, das ungenügend erhitztes, teilweise vom Schaf stammendes Tiermehl enthielt, das wahrscheinlich mit Scrapie-Erregern kontaminiert war (Wilesmith *et al.* 1988; Wilesmith *et al.* 1992).

Die Aufbereitung des Tiermehls wurde in den 70er Jahren in Großbritannien aus ökonomischen Gründen vereinfacht. Während zuvor die Erhitzungstemperatur der Schlachtabfälle mindestens 120°C betrug, wurde gemäß dem neuen Produktionsverfahren lediglich mit 80-90°C gearbeitet. Zudem fiel der zweite Erhitzungsprozess weg. Diese Faktoren führten dazu, dass die Erreger nicht mehr wie zuvor inaktiviert wurden (Wilesmith *et al.* 1991). Die britische Regierung erließ im Jahr 1988 ein Verbot für die Beimengung von Tiermehl in Rindermischfutter (TM-Fütterungsverbot) und verhängte eine Anzeigepflicht für BSE-verdächtige Fälle. Dennoch erreichte die Epidemie im Jahr 1992 mit über 37 000 Fällen ihren Höhepunkt. Der kontinuierliche Anstieg der BSE-Fälle nach dem TM-Fütterungsverbot hat verschiedene Gründe: zum einen die lange Inkubationszeit der BSE. Diese beträgt bei Rindern ca. vier bis fünf Jahre (im Vergleich dazu bei Schafen

nur ein bis zwei Jahre), wobei der Tod der Tiere sechs bis zwölf Monate nach Ausbruch der Krankheit eintritt. Die Inkubationszeit und die klinische Krankheitsphase stehen somit in zeitlichem Zusammenhang mit dem Epidemieverlauf. Zum anderen wurde aufgrund der inadäquaten Tiermehl-Verarbeitung zwischen der Erstinfektion und dem TM-Fütterungsverbot zusätzlich BSE-kontaminiertes Mischfutter an Rinder verabreicht, da Gehirne subklinisch infizierter Rinder – Tiere in einem frühen Inkubationsstadium ohne klinische Merkmale – aus der Schlachtindustrie, ebenso wie Scrapie-kontaminiertes Material der Schafe, in die Tiermehl-Industrie gelangten (Abb. 1). BSE-infektiöses Rinder-Material wurde auf diese Weise über Jahre hinweg in großem Ausmaß innerhalb derselben Tierart rezykliert.

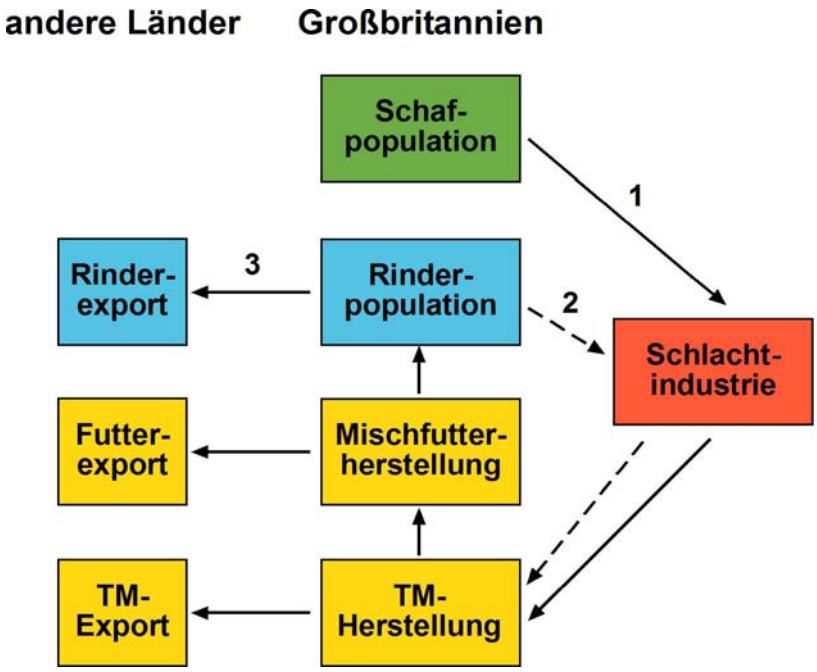

Abbildung 1: Schematische Darstellung zum BSE-Ursprung und der Epidemie. (1) Ursprung der BSE. Inadäquat verarbeitete Schlachttierabfälle Scrapie-kontaminierter Schafe gelangten über die Tiermehl (TM)-Industrie in die Mischfutterherstellung und schließlich in die Rinderpopulation **(2)** Ausweitung der BSE-Epidemie. Inadäquat verarbeitete Schlachttierabfälle infizierter Rinder wurden über die Tiermehl- und Mischfutterherstellung innerhalb der Rinderpopulation rezykliert (gestrichelte Linie). **(3)** Ursprung der BSE außerhalb von Großbritannien. Infizierte Rinder sowie kontaminiertes Tiermehl oder Mischfutter wurden aus Großbritannien in andere Länder exportiert.

Tiere innerhalb einer Herde haben sich also nicht untereinander infiziert, sondern über die Verfütterung von Scrapie-kontaminiertem bzw. rezykliertem, BSE-infektiösem Tiermehl, was schließlich zu einer BSE-Epidemie in Großbritannien führte. Britische Landwirte, die Fleisch- und Futtermittelindustrie, die Wiederverwerter tierischer Nebenprodukte, sowie der Exporthandel erlitten große finanzielle Verluste. Die Bewältigung der BSE-Krise kostete die britische Wirtschaft und den Steuerzahler Summen in Milliardenhöhe.

Außerhalb von England trat BSE zum ersten Mal im Jahr 1988 in Nordirland auf (Denny *et al.* 1992). Weiter betroffen sind hauptsächlich europäische Länder, vor allem Portugal und die Schweiz (Doherr *et al.* 1999), allerdings mit einer um mehrere Zehnerpotenzen geringeren Inzidenz als Großbritannien. Die ersten BSE-Fälle außerhalb von England sind auf den Import von britischen Rindern, aber – wie sich im Jahr 1994 herausstellte – auch von kontaminiertem Tiermehl (Abb. 1) zurückzuführen (Hornlimann *et al.* 1994). Im Jahr 2001 wurde schließlich in der ganzen EU ein generelles Tiermehl-Verbot eingeführt.

Allein in England wurden über 200 000 klinisch manifeste Fälle registriert (Brown *et al.* 2001), obgleich die Dunkelziffer wesentlich höher liegen dürfte. Zwar hat die BSE-Epidemie ihren Höhepunkt längst überschritten, das Ausmaß der Prion-Erkrankung für den Konsumenten von potentiell infiziertem Rinder-Material ist aber, infolge der bestehenden langen Inkubationszeit beim Menschen, längst nicht abzusehen (siehe Punkt 1.1.3). Um das Gesundheitsrisiko für den Menschen zu minimieren und entsprechende Maßnahmen zu ergreifen, sind sensitivere Nachweismethoden für die Diagnose subklinischer Fälle und verstärkte Kontrollen der Einhaltung des TM-Fütterungsverbots, sowie strenge Auflagen zur Einfuhr von Tieren oder Tierprodukten notwendig.

1.1.3 Prion-Erkrankungen beim Menschen

Folgende Prion-Erkrankungen sind beim Menschen bekannt (vgl. Tab. 2): die **C**reutzfeldt-**J**akob-**K**rankheit (CJK), das **G**erstmann-**S**träussler-**S**cheinker-Syndrom (GSS), die Kuru-Krankheit und die **F**atale **F**amiliäre **I**nsomnie (FFI) (Creutzfeldt 1920; Jakob 1921; Gerstmann *et al.* 1936; Gajdusek und Zigas 1957; Lugaresi *et al.* 1986).

Krankheit	Jahr der Erstdokumentation und Ort des Auftretens	Ursache
sCJK	1920 Deutschland	unbekannt
fCJK	1924 Deutschland	Keimbahn-Mutation im PrP-Gen
GSS	1928 Österreich	Keimbahn-Mutation im PrP-Gen
Kuru	1957 Neu Guinea	Ritueller Kannibalismus
iCJK	1974 USA	Infektion durch ärztliche Behandlung
FFI	1986 Italien	Keimbahn-Mutation im PrP-Gen
nvCJK	1996 GB	Infektion

Tabelle 2: Prion-Erkrankungen des Menschen. sCJK, fCJK, iCJK, nvCJK: sporadische, familiäre, iatrogene, neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit; GSS: Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom; FFI: Fatale Familiäre Insomnie.

Die ersten Dokumentationen über eine Prion-Erkrankung beim Menschen wurden 1920/21 von zwei deutschen Neurologen, Hans Creutzfeldt und Alfons Jakob, unabhängig voneinander verfasst (Creutzfeldt 1920; Jakob 1921). Sie beschrieben ein seltenes Syndrom, die *spastische Pseudosklerose*. Später wurde die Krankheit nach ihren Erstbeschreibern Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK) benannt. Die CJK gehört mit einer jährlichen Inzidenz von eins zu einer Million zu den seltenen Krankheiten. Man unterscheidet zwischen vier verschiedenen CJK-Formen oder -Varianten.

1. **S**poradische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (**s**CJK)
2. **F**amiliäre Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (**f**CJK)
3. **I**atrogene Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (**i**CJK)
4. **N**eue **V**ariante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (**nv**CJK)

Die häufigste CJK-Form ist die sporadische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (sCJK). Diese stellt 80-90 % aller CJK-Fälle dar und tritt weltweit gleichmäßig verteilt auf. Die Ursache der Krankheitsentstehung ist unbekannt, weshalb die sCJK als idiopathische Erkrankung bezeichnet wird.

Die familiäre Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (fCJK) gehört zu den hereditären Prion-Erkrankungen, welche durch Keimbahnmutation im Prion-Protein-Gen (PRNP) hervorgerufen werden. Die fCJK wird autosomal dominant vererbt und liegt bei etwa 10 % aller CJK-Fälle vor. Es wurden eine Reihe unterschiedlicher Punktmutationen, sowie einige Deletions- und Insertionsmutationen im PRNP betroffener Familien identifiziert. Wie in Abbildung 2 deutlich zu erkennen ist, befinden sich fast alle Mutationen im gut strukturierten C-Terminus des Prion-Proteins (Hsiao *et al.* 1989; Dlouhy *et al.* 1992; Petersen *et al.* 1992; Poulter *et al.* 1992; Gabizon *et al.* 1993). Ebenfalls durch Mutationen im PRNP werden das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) und die Fatale Familiäre Insomnie (FFI) ausgelöst (Hsiao *et al.* 1989; Medori *et al.* 1992).

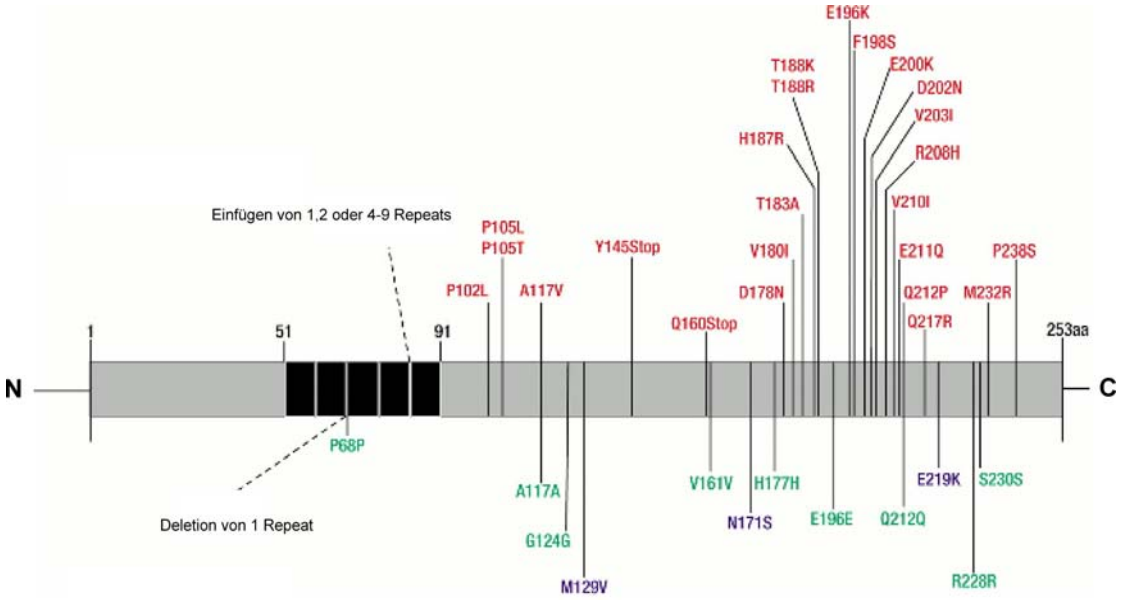

Abbildung 2: Schematische Darstellung des Prion-Protein-Gens (PRNP). Pathogene Mutationen sind rot und polymorphe Varianten grün und blau dargestellt. Abbildung aus (Collinge 2001).

Die iatrogene Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (iCJK) wird durch so genannte medizinische Unfälle verursacht. Diese infektiöse Form tritt seit 1974 auf und umfasst weniger als 1% aller CJK-Fälle. Am häufigsten verbreitet wurde die iCJK durch therapeutische Verabreichung erregerhaltiger Hormonpräparate, die aus Hypophysen von Leichen extrahiert wurden, unter welchen sich ein CJK-Fall befunden hat. Einige iCJK-Fälle gehen auch auf Verwendung kontaminierter chirurgischer Instrumente oder Transplantation von infiziertem Gewebe wie der harten Hirnhaut oder Augenhornhaut zurück (Duffy *et al.* 1974; Bernoulli *et al.* 1977; Kondo und Kuroiwa 1982; Davanipour *et al.* 1984).

Die seit 1996 bekannte neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (nvCJK) wird ebenfalls durch Infektion erworben und geht höchstwahrscheinlich auf eine orale Übertragung mit BSE-infektiösem Material zurück (siehe Punkt 1.1.4).

Die Kuru-Krankheit wurde erstmals im Jahr 1957 von Vincent Zigas und Daniel C. Gajdusek beschrieben. Kuru blieb immer auf Papua Neuguinea (PNG) beschränkt und zwar beim Eingeborenenstamm der Fore und bei einigen Nachbarstämmen im östlichen Hochland von PNG (Gajdusek und Zigas 1957). Wie sich fast dreißig Jahre später herausstellte, wurde Kuru durch Endokannibalismus innerhalb dieser Stämme übertragen (Klitzman *et al.* 1984). Der Verzehr von Menschenhirn Verstorbener diente der Verehrung dieser. Zusätzlich haben sich vor allem Kinder durch Verschmieren von kontaminiertem Gewebe auf der Haut oder in die Augenschleimhäute, sowie Frauen, die für die Zubereitung der rituellen Mahlzeiten verantwortlich waren, parenteral infiziert. Aufgrund der Rezyklierung des Erregers innerhalb dieser relativ isolierten Population, nahm Kuru zeitweise epidemische Ausmaße an. Insgesamt sind seit 1957, dem Beginn der Kuru-Forschung, etwa 2670 Patienten gestorben (Prusiner 1995). Der Höhepunkt der Epidemie wurde zwischen 1957 und 1960 mit über 200 Fällen pro Jahr erreicht (Alpers 1979). Nach Verbot des rituellen Kannibalismus im Jahr 1959 war erstmals ein Rückgang feststellbar. Heute kommen nur noch einige wenige Kuru-Fälle vor, wobei alle Betroffenen vor dem Verbot des Ritus geboren sind.

Alle Prion-Erkrankungen beim Menschen zeichnen sich durch eine lange Inkubationszeit aus. Unterschiede bestehen allerdings in der Krankheitsdauer, der Symptomatik und dem neuropathologischen Bild. Während die sCJK im Durchschnittsalter von 60 Jahren ausbricht, wird die nvCJK bei verhältnismäßig jungen Patienten im Durchschnittsalter von 29 Jahren festgestellt. Das Gerstmann-

Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) kommt, ähnlich wie andere hereditäre Prion-Erkrankungen, im mittleren Alter (Durchschnittsalter: 45 Jahre) vor. Bei der Kuru-Krankheit andererseits besteht infolge der Variabilität der Erregermenge, des Zeitpunkts der Exposition und des Infektionswegs eine breite Altersstreuung zwischen 4 und 60 Jahren. Die durchschnittliche Dauer zwischen dem Ausbruch der Krankheit und dem Eintritt des Todes beträgt bei der sCJK nur zwei bis drei Monate, bei der nvCJK vierzehn und bei der Kuru-Krankheit zwölf Monate. Die Krankheitsdauer bei dem GSS ist mit durchschnittlich fünf Jahren außergewöhnlich lang (Johnson und Gibbs 1998; Collinge 2001). Die vielfältige Symptomatik der Prion-Erkrankungen lässt sich durch den unterschiedlich starken Befall verschiedener Hirnregionen erklären. Während bei den CJK vor allem Demenz im Vordergrund steht, gefolgt von Koordinationsstörungen, ist bei der Kuru-Krankheit, die hauptsächlich pathologische Veränderungen des Kleinhirns nach sich zieht, die Reihenfolge umgekehrt. Dagegen ist beispielsweise bei der Fatalen Familiären Insomnie (FFI) Schlaflosigkeit und Störung des vegetativen Nervensystems vorrangig.

Eine Ablagerung des Prion-Proteins in Form von Plaques im Gehirn gehört zu den pathologischen Hauptmerkmalen der meisten Prion-Erkrankungen (Ausnahmen: siehe Punkt 1.2.7). In einigen Prion-Erkrankungen sind charakteristische Plaque-Formen zu finden. So kommen homogene Ablagerungen, so genannte Kuru-Plaques (Abb. 3a, b), oft bei der Kuru-Krankheit (Klatzko *et al.* 1959) und nur zu 15 % bei der sCJK vor. Multizentrische Plaques (Abb. 3c, d), auch als Kokarden-Plaques bezeichnet, finden sich dagegen regelmäßig bei Patienten mit dem GSS (Brown 1992). Die ungewöhnlichen Florid-Plaques (Abb. 3e, f), die von einem Ring von spongiformen Veränderungen umgeben sind und deren Form an eine Blüte (*floridus*, blühend) erinnern soll, kommen ausschließlich im Gehirn von nvCJK-Patienten vor (Will *et al.* 1996).

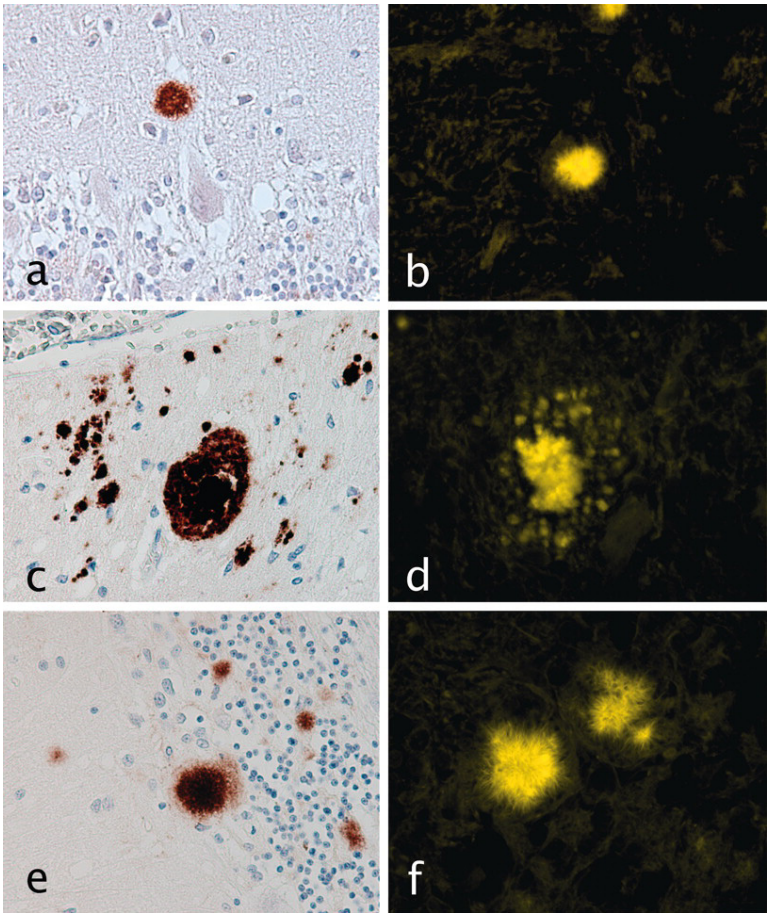

Abbildung 3: Verschiedene Plaque-Formen bei Prion-Erkrankungen des Menschen. Die Gewebeschnitte entstammen jeweils dem Kleinhirn. **(a, b)** Kuru-Plaque bei einem sCJK-Fall. **(c, d)** Multizentrische Plaques bei einem GSS-Fall. **(e, f)** Florid-Plaques bei einem nvCJK-Fall. Standardisierte immunhistochemische Darstellung der Prion-Protein-Ablagerungen (a, c, e) und Plaque-Färbung mit 2-(1-{6-[(2-Fluoroethyl) (Methyl) Amino]-2-Naphthyl} Ethyliden) Malononitril (FDDNP) (b, d, f). Abbildung aus (Bresjanac *et al.* 2003).

1.1.4 Transmissibilität innerhalb derselben und zwischen verschiedenen Spezies

Die ersten Transmissionsexperimente (*transmission*, Übertragung) zum Nachweis der Infektiösität der Prion-Erkrankungen wurden bereits Ende des 18. Jahrhunderts mit Schafen durchgeführt. Damals scheiterten die Versuche gesunde Schafe mit Scrapie zu infizieren daran, dass die Beobachtung der Tiere zu früh abgebrochen wurde und somit die lange Inkubationszeit von ein bis zwei Jahren nicht überbrückt werden konnte (Besnoit 1899). In den dreißiger Jahren wurde schließlich der Beweis erbracht, dass die Scrapie der Schafe auf experimentellem Weg übertragbar ist (Cuille und

Chelle 1936). Über zwanzig Jahre später machte William Hadlow auf die neuropathologische Ähnlichkeit von Scrapie und Kuru, sowie die lange Inkubationszeit von Scrapie aufmerksam (Hadlow 1959), woraufhin im Jahr 1966 der experimentelle Nachweis der Übertragung von Kuru auf Schimpansen gelang (Gajdusek *et al.* 1966). Zwei Jahre darauf wurde gezeigt, dass auch die CJK auf Schimpansen übertragen werden kann (Gibbs *et al.* 1968).

Die Übertragung der Prion-Erkrankungen ist umso effektiver, je direkter der Erreger in das zentrale Nervensystem gelangt und je höher die Infektionsdosis ist, wobei die Inkubationszeit mit der Infektionsdosis korreliert. Bei einer Übertragung auf eine andere Spezies ist teilweise der Grad der Sequenzhomologie zwischen den Prion-Protein-Genen der verschiedenen Spezies entscheidend (Scott *et al.* 1989; Weissmann *et al.* 1994). Eine Übertragung zwischen verschiedenen Spezies ist aber nicht immer möglich. Dieses Phänomen wird als Speziesbarriere bezeichnet (Pattison 1965). So konnte noch nie festgestellt werden, dass die Scrapie der Schafe auf den Menschen übertragbar ist. Dagegen konnte bereits Anfang der sechziger Jahre gezeigt werden, dass Scrapie auf Mäuse übertragen werden kann (Chandler 1961). In den siebziger Jahren erkannte man schließlich, dass Hamster wesentlich sensitiver gegenüber Scrapie sind als Mäuse (Prusiner *et al.* 1982). Trotz dieser Erkenntnisse kann leider nicht vorhergesagt werden, zwischen welchen Spezies eine Übertragung möglich wäre.

Um Informationen über die Epidemiologie und Pathogenese der BSE in Großbritannien zu gewinnen, wurden in den neunziger Jahren weitere Transmissionsexperimente durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die BSE-Erreger der Rinder durch orale Infektion auf andere Spezies, wie Schafe (Bradley und Wilesmith 1993), Ziegen (Bradley und Wilesmith 1993), Mäuse (Barlow und Rennie 1970), aber auch innerhalb derselben Spezies (Anderson *et al.* 1996) übertragen werden können. Dabei ist eine einmalige orale Aufnahme von einem Gramm BSE-infektiösem Hirnmaterial ausreichend, um ein Rind mit BSE zu infizieren. Rinder können auch mit Scrapie-Erregern der Schafe infiziert werden (Cutlip *et al.* 1994). Diese Ergebnisse führten zum Schluss, dass die BSE in Großbritannien durch Scrapie-Erreger hervorgerufen wurde und zusätzlich eine Rezyklierung der BSE-Erreger innerhalb der Rinderpopulation stattgefunden hat (vgl. Abb. 1).

Die Transmissionsexperimente wurden erweitert, um eine mögliche orale Übertragung von BSE auf den Menschen zu erforschen. Indizien für einen

ernährungsbedingten Zusammenhang zwischen der BSE und der nvCJK konnten bereits in den neunziger Jahren aus vielfältigen Experimenten gesammelt werden.
So konnte gezeigt werden, dass Florid-Plaques im Gehirn von verstorbenen nvCJK-Patienten und von experimentell mit BSE infizierten Makaken identisch sind (Lasmézas *et al.* 1996). Außerdem wurde nachgewiesen, dass die pathogene Isoform des Prion-Proteins (PrP^{Sc}) (siehe Punkt 1.2.2) aus dem Gehirn von infizierten Mäusen, Katzen und Makaken dasselbe Glykosilierungsmuster besitzt wie PrP^{Sc} aus dem Gehirn von verstorbenen nvCJK-Patienten (Collinge *et al.* 1996). Beide Prion-Erkrankungen, nvCJK und BSE, unterscheiden sich sowohl hinsichtlich des Glykosilierungsmusters als auch der Plaque-Form bzw. -Bildung deutlich von der sCJK. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass Mäuse, die mit BSE- bzw. nvCJK-Material infiziert wurden, vergleichbare Inkubationszeiten und Läsionsprofile im Gehirn aufweisen (Bruce *et al.* 1997). Ähnliche Resultate wurden mit transgenen Mäusen erzielt, die Rinder-PrP exprimierten und auch mit BSE- bzw. nvCJK-Material infiziert wurden (Scott *et al.* 1997).
Aufgrund dieser deutlichen experimentellen Evidenz gehen heute die meisten Forscher davon aus, dass BSE auf den Menschen durch den Konsum infizierter Rinderbestandteile übertragen wurde. Dafür spricht auch, dass sich die nvCJK hinsichtlich der Pathologie und des Krankheitsbilds deutlich von der sCJK unterscheidet und aus bisher ungeklärten Gründen bei verhältnismäßig jungen Personen auftritt, sowie in zeitlicher und geographischer Übereinstimmung mit der BSE-Epidemie steht. Die nvCJK ist nämlich zehn Jahre nach Beginn der BSE-Epidemie in Großbritannien aufgetreten (Will *et al.* 1996) und hat dort die meisten Opfer gefordert.
Da die nvCJK höchstwahrscheinlich durch orale Aufnahme von BSE-infiziertem Material hervorgerufen wurde, ist es für den Verbraucherschutz außerordentlich wichtig, das Reservoir der Infektiösität im Rindergewebe eindeutig zu bestimmen. Infektiösität war experimentell sehr gut im Gehirn und Rückenmark und in geringem Maß in den Lymphknoten, der Milz und einigen wenigen Organen – jedoch nicht im Muskelgewebe – von infizierten Primaten nachweisbar (Brown *et al.* 1994). Dies führte zu entsprechenden Maßnahmen im Verbraucherschutz, wie beispielsweise dem Verbot von Hirnmaterial in Wurstwaren. Kürzlich gelang es jedoch erstmals, Scrapie-Erreger im Skelettmuskel infizierter Mäuse nach intramuskulärer Injektion nachzuweisen (Bosque *et al.* 2002). Darauf aufbauend konnte gezeigt werden, dass

eine orale Verabreichung von infektiösem Scrapie-Material an Hamster ebenfalls zu einer Erregerausbreitung im Muskelgewebe dieser Tiere führt (Thomzig *et al.* 2003) und die Erreger bereits vor Auftreten der ersten klinischen Symptome in der Muskulatur der Tiere nachweisbar sind (Thomzig *et al.* 2004). Ein Beweis, dass Erreger auch im Muskelgewebe von BSE-kranken Rindern vorkommen, konnte jedoch mit den zur Verfügung stehenden Nachweismethoden bis heute nicht erbracht werden.

1.2 Das Prion-Protein

1.2.1 Auf der Suche nach dem Erreger

Nachdem ausreichend Beweise für die Transmissibilität der Prion-Erkrankungen erbracht waren, hielt man zunächst langsam wirkende Viren (*Slow Virus)* für deren Ursache. Tikvah Alper hatte 1966 erstmals beschrieben, dass Scrapie-Hirnextrakte selbst nach massiver DNA- und RNA- schädigender Strahlung ihre Infektiösität nicht verlieren (Alper *et al.* 1966). Daraus wurde geschlossen, dass der Erreger keine eigene Erbinformation besitzt (Alper *et al.* 1967), was gegen einen Virus oder ein anderes konventionelles infektiöses Agens spricht. Kurz darauf wurde als Erreger ein sich vermehrendes Zellmembranprotein vorgeschlagen (Gibbons und Hunter 1967). Im selben Jahr wurde postuliert, dass ein bloßes Protein, das sich autokatalytisch repliziert, für die Übertragung der Prion-Erkrankungen verantwortlich sein könnte (Griffith 1967).

Stanley Prusiner hat in den siebziger Jahren die Frage nach der wahren Natur des Scrapie-Erregers aufgegriffen. Nach jahrelanger Forschung gelang ihm und seinen Kollegen die Isolierung einer ausreichend reinen, infektiösen Fraktion aus Hirnextrakten experimentell infizierter Hamster. Die Infektiösität der gereinigten Extrakte ließ sich nicht mit Nukleinsäure-schädigenden Verfahren verringern, jedoch mit Substanzen, die Proteine abbauen oder deren natürliche Faltung beeinflussen (Prusiner *et al.* 1981; Prusiner 1982). Die Ergebnisse untermauerten das Modell eines proteinartigen Erregers ohne Nukleinsäure. Diese so genannte Prion-Hypothese sollte zehn Jahre später mit Versuchen an transgenen Mäusen erhärtet werden (siehe Punkt 1.2.5). Um diese neuartige Erregerklasse von bis dahin bekannten Mikroorganismen

wie Viren oder Bakterien abzugrenzen, wurde von Stanley Prusiner der Begriff „Prion“ als Abkürzung für ***pro****teinaceous* ***in****fectious particles* (proteinartige, infektiöse Teilchen) geprägt, wobei die genaue Abkürzung Proin zugunsten der leichteren Aussprache in Prion geändert wurde. Scrapie-Erreger enthielten, wie sich herausstellte, ein einziges Protein, das Prion-Protein (PrP) genannt wurde (Bolton *et al.* 1982; Prusiner 1982).

Schließlich gelang die Bestimmung einiger Aminosäuren vom Ende des isolierten Proteins (Prusiner *et al.* 1984) und somit die Herstellung von DNA-Sonden zum Aufspüren des PrP-Gens (Oesch *et al.* 1985). Es handelte sich nicht wie erwartet um ein Fremd- sondern ein Wirtsgen, das erstmals in Hamsterzellen (Oesch *et al.* 1985) und kurz darauf in Mäusezellen (Chesebro *et al.* 1985) nachgewiesen werden konnte. Es stellte sich heraus, dass das Prion-Protein-Gen (PRNP) in allen untersuchten Spezies, auch beim Menschen, aktiv ist (Basler *et al.* 1986; Stahl *et al.* 1993) und darüber hinaus die meiste Zeit in gesunden und infizierten Tieren gleichermaßen exprimiert wird (Chesebro *et al.* 1985; Oesch *et al.* 1985). Da jeder tierische und menschliche Organismus das Prion-Protein herstellt ohne zu erkranken, ließ sich schlussfolgern, dass zwei verschiedene Formen von PrP existieren: eine normale, harmlose (zelluläre) Form (PrP^{C}, *Prion Protein Cellular*) und eine veränderte pathogene Form (PrP^{Sc}, *Prion Protein Scrapie*).

1.2.2 Die zelluläre Form PrP^{C} im Vergleich zur pathogenen Isoform PrP^{Sc}

Da PrP^{C} und PrP^{Sc} dieselbe Aminosäuresequenz besitzen, geht man davon aus, dass es sich um Konformationsisomere handelt, die sich in ihren biochemischen und physikalischen Eigenschaften unterscheiden (vgl. Tab. 3). Während nicht-infektiöses PrP^{C} hauptsächlich α-helikale Strukturen aufweist und in nicht-ionischen Detergenzien gut löslich ist, besteht infektiöses PrP^{Sc} vor allem aus β-Faltblatt-Strukturen und bildet unlösliche Aggregate (Caughey und Raymond 1991; Gasset *et al.* 1993; Pan *et al.* 1993).

Isomere	PrP^C	PrP^{Sc}
Infektiösität	nein	ja
Struktur	α-helikal	β-Faltblatt
Löslichkeit	ja	nein
PK-Sensitivität	ja	nein

Tabelle 3: **PrP^C und PrP^{Sc} besitzen unterschiedliche biochemische und physikalische Eigenschaften.** Unterschiede bestehen in der Infektiösität, Struktur, Löslichkeit und Proteinase K (PK)-Sensitivität.

Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass PrP^C von Protein-abbauenden Enzymen, wie der Proteinase K (PK), innerhalb kurzer Zeit vollständig abgebaut wird, während PrP^{Sc} resistent gegenüber PK ist (McKinley *et al.* 1983). Diese PK-Resistenz liegt an der Tendenz von PrP^{Sc} zur Aggregation, welche zu einem gegenseitigen Schutz der PrP^{Sc}-Moleküle vor dem Abbau durch PK führt. Durch Einwirkung von PK auf PrP^{Sc} wird lediglich ein N-terminales Peptid von etwa 68 Aminosäuren abgespalten (Oesch *et al.* 1985). Diese verkürzte Form ist dennoch ausreichend, um Infektiösität zu vermitteln und bildet *in vitro* unter Einwirkung von PK und Detergenzien amyloide Strukturen - so genannte Prion Rods - aus (McKinley *et al.* 1991). Ähnliche Strukturen wurden bereits 1981 nach Aufreinigung von infiziertem Hirnmaterial gefunden und als Scrapie-assoziierte Fibrillen (SAF) bezeichnet (Merz *et al.* 1981).

1.2.3 PrP^C besitzt eine globuläre C-terminale Domäne

Die dreidimensionale Struktur des Prion-Proteins konnte aufgrund zu geringer Konzentration und Langzeitstabilität von PrP in Lösung lange Zeit nicht aufgeklärt werden. Nachdem PrP schließlich in ausreichend reiner und löslicher Form rekombinant aus *E.Coli* gewonnen wurde (Hornemann und Glockshuber 1996; Hornemann *et al.* 1997), gelang es Roland Riek und seinen Kollegen, die NMR-Struktur der C-terminalen Domäne von rekombinantem Maus-PrP (PrP 121-231) (Riek *et al.* 1996) und kurz darauf dessen komplette Struktur (PrP 23-231) zu ermitteln (Riek *et al.* 1997). In beiden Molekülen wurde eine identische, selbstständig faltende, globuläre Domäne identifiziert, welche die C-terminale Domäne bildet

(Aminosäuren 121-231). Die N-terminale Domäne (Aminosäuren 23-120) dagegen ist, zumindest unter den für die NMR-Analyse bestehenden Bedingungen, unstrukturiert, nicht faltend und hochbeweglich. Der N-Terminus enthält eine Oktarepeat-Domäne (OR) – eine fünfmalige Wiederholungssequenz von acht Aminosäuren – und eine hydrophobe Domäne (HD). Die ersten 22 Aminosäuren von PrP^{C} werden beim Import in das Endoplasmatische Reticulum (ER) abgeschnitten und stellen die ER-Signalsequenz dar (siehe Punkt 1.2.4).

Abbildung 4: Die dreidimensionale Struktur der C-terminalen Domäne von Maus-PrP (PrP 121-231). Der strukturierte Bereich von Maus-PrP beginnt bei Aminosäure 121 (oberes Ende) und reicht bis Aminosäure 231 (unteres Ende). Die NMR-Struktur zeigt die Lage der zwei antiparallelen β-Stränge (grün) und der drei α-Helices (violett). Abbildung aus (Riek *et al.* 1996).

Die strukturierte C-terminale Domäne enthält zwei antiparallele β-Stränge, die eine β-Faltblattstruktur bilden und drei α-Helices, wobei die kleine erste Helix durch die beiden β-Stränge eingeschlossen wird (Riek *et al.* 1996; Riek *et al.* 1997) (Abb. 4). Helix 2 und 3 sind durch eine Disufidbrücke miteinander verbunden. Die Aminosäureketten der α-Helices 2 und 3 und die des β-Faltblatts bilden zusammen einen stabilen hydrophoben Core des Prion-Proteins (Riek *et al.* 1998). Diese Strukturdaten wurden auch durch NMR-Analysen von Hamster-PrP bestätigt, welche einen sehr ähnlichen Strukturaufbau ergaben (Donne *et al.* 1997; James *et al.* 1997). Die Struktur von PrP^{Sc} konnte bis heute aufgrund der hohen Unlöslichkeit des Proteins nicht geklärt werden.

Die Prion-Proteine der Säugetiere sind mit über 90% Sequenzhomologie außerordentlich stark konserviert (Schatzl *et al.* 1995) und besitzen eine nahezu identische dreidimensionale Struktur (Lopez Garcia *et al.* 2000; Wuthrich und Riek 2001; Lysek *et al.* 2005). Das Maus-PrP^C kann also als repräsentativ für alle zellulären Prion-Proteine der Säugetiere angesehen werden.

Wie unter Punkt 1.3.1 eingehend beschrieben, wird PrP^C zusätzlich durch zwei komplexe Glykosilierungen an den Asparaginen 180 und 196 (Endo *et al.* 1989; Haraguchi *et al.* 1989; Rudd *et al.* 1999; Stimson *et al.* 1999) und Anhängen eines Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-Ankers am Serin 231 (Stahl *et al.* 1987; Stimson *et al.* 1999) posttranslational modifiziert (Aminosäurenummerierung gemäß Maus-PrP^C) (Abb. 5). Aufgrund der identischen chemischen Zusammensetzung von PrP^C und PrP^{Sc}, erhält PrP^{Sc} ebenso einen GPI-Anker und wird komplex glykosiliert.

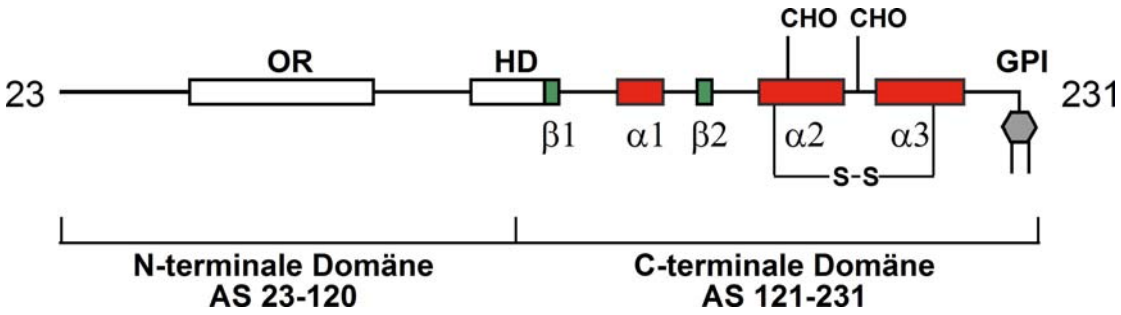

Abbildung 5: Schematische Darstellung der posttranslationalen Modifikationen von Maus-PrP. Die posttranslationalen Modifikationen bestehen aus zwei komplexen Glykosilierungen (CHO) an den Asparaginen 180 und 196, der Bildung einer Disulfidbrücke (S-S) zwischen den zwei Cysteinresten an den Positionen 178 und 213 und dem Anhängen eines Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-Ankers am Serin 231. Die unstrukturierte N-terminale Domäne umfasst die Aminosäuren 23-120, die gut strukturierte C-terminale Domäne die Aminosäuren 121-231. OR: Oktarepeats; HD: hydrophobe Domäne; α1-3: α-Helix 1-3; β1, 2: β-Strang 1, 2.

1.2.4 Die Biogenese von PrP^C

Die Prion-Protein-Gene aller Säugetiere – es sind über siebzig bekannt – besitzen am 5´-Ende zwei kurze Exons, die durch ein langes Intron vom dritten Exon am 3´-Ende getrennt werden. Das letzte Exon enthält den kompletten Leserahmen, der bei der Maus für 256 Aminosäuren kodiert (Oesch *et al.* 1985; Westaway *et al.* 1994). Alternatives Spleißen der mRNA hat daher keinen Einfluss auf die kodierende Region. PrP^C wird in fast allen Geweben exprimiert, die höchste Expressionsrate mit ca. 50 Kopien pro Zelle findet sich jedoch in Neuronen (Kretzschmar *et al.* 1986). Die im Folgenden angegebenen Aminosäure (AS)-Nummerierungen entsprechen dem Maus-PrP^C.

Das Prion-Protein ist ein glykosiliertes Zelloberflächenprotein, das zunächst als Präprotein (256 AS) mit jeweils einer N- und C-terminalen Signalsequenz synthetisiert wird. Die Synthese von PrP^C in Säugetierzellen beginnt an freien Ribosomen im Zytosol (Abb. 6). Die aus dem Ribosom austretende hydrophobe N-terminale Signalsequenz (ER-Signalsequenz) der Polypeptidkette wird von einem Ribonucleoprotein, das als Signalerkennungspartikel (SRP, *signal recognition particle)* bezeichnet wird, erkannt und gebunden. SRP verhindert durch diese Interaktion die weitere Elongation der Polypeptidkette und dirigiert den gesamten Komplex zum ER (Walter und Blobel 1980; Walter und Blobel 1982). Wie die meisten sekretorischen Proteine wird auch PrP^C cotranslational in das ER importiert. Hierfür bindet SRP an den SRP-Rezeptor, der sich an der ER-Membran befindet und mit der Translokationspore (Sec 61-Komplex) interagiert (Meyer und Dobberstein 1980; Gilmore *et al.* 1982; Görlich *et al.* 1992; Sanders *et al.* 1992). Daraufhin wird der SRP-SRP-Rezeptor-Komplex vom Ribosom-Polypeptidketten-Komplex freigelassen (Connolly und Gilmore 1989) und die Elongation am Ribosom fortgesetzt (Pohlschroder *et al.* 1997; Matlack *et al.* 1998; Johnson und van Waes 1999).

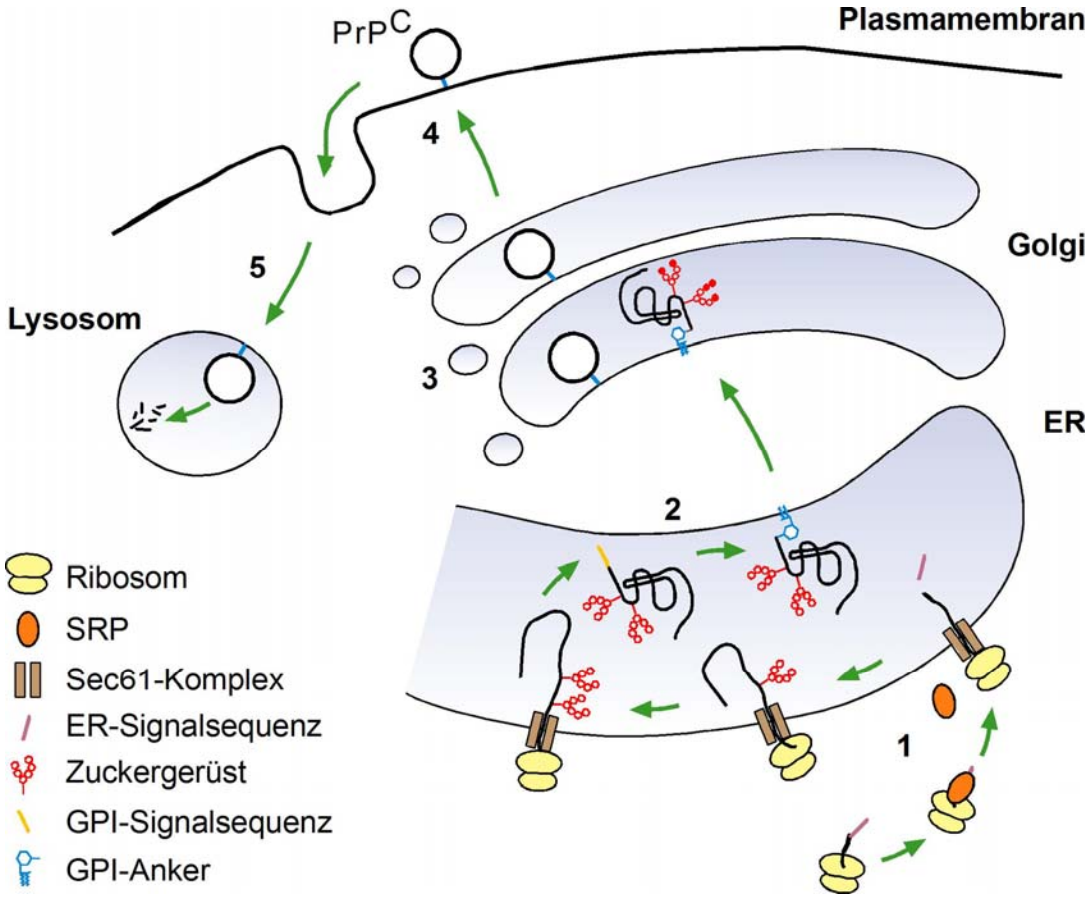

Abbildung 6: Biogenese von PrP^C. **(1)** Cotranslationaler Import in das ER. Die Translation von PrP^C beginnt an freien Ribosomen im Zytosol. SRP bindet an die ER-Signalsequenz (ER-SS) und dirigiert den Ribosom-Polypeptid-Komplex an die ER-Membran. Während des ER-Imports wird die ER-SS abgeschnitten und Zuckerketten werden mit dem wachsenden Protein verknüpft. **(2)** Die GPI-Signalsequenz wird im ER durch einen GPI-Anker ersetzt. Nach der komplexen Glykosilierung im Golgi **(3)** wird PrP^C mit dem GPI-Anker an die äußere Plasmamembran geheftet **(4)**. Nach seiner Internalisierung wird PrP^C im Lysosom abgebaut **(5)**.

Während des cotranslationalen Imports in das ER wird die 22 AS lange N-terminale ER-Signalsequenz abgespalten und Zuckerketten werden mit den Asparaginen 180 und 196 des wachsenden Proteins verknüpft. Die hydrophobe 23 AS lange C-terminale Signalsequenz fungiert als Erkennungssequenz für den GPI-Anker, welcher als Ganzes im ER an Serin 231 des Proteins übertragen wird. Anschließend wandert PrP vom ER über das Golgi, wo die komplexe Glykosilierung der beiden Glykane erfolgt (siehe Punkt 1.3.1), zur Plasmamembran. PrP^C wird mit dem GPI-Anker an die äußere Zellmembran geheftet und kann anschließend internalisiert werden, wobei die N-terminale Domäne des Proteins an diesem Prozess beteiligt ist (Shyng *et al.* 1995;

Nunziante *et al.* 2003; Sunyach *et al.* 2003). Für die Internalisierung von PrP^C wurden zwei verschiedene Wege vorgeschlagen: die Endozytose über so genannte *coated pits* und über caveoläre Strukturen (Shyng *et al.* 1994; Marella *et al.* 2002; Peters *et al.* 2003; Sunyach *et al.* 2003). Für letzteres spricht, dass PrP^C sich *in vivo* an der Zelloberfläche in Cholesterin-reichen Membraneinbuchtungen (*Caveolae*) anreichert (Harmey *et al.* 1995; Vey *et al.* 1996). Während die Endozytose über *coated pits* mit einer Clathrin-abhängigen Einstülpung einhergeht, können sich *Caveolae* von der Plasmamembran abschnüren und ebenfalls über den Endozytoseweg mit Endosomen fusionieren. PrP^C wird schließlich in Lysosomen vollständig abgebaut.

1.2.5 Missfaltung von PrP^C ist kennzeichnend für Prion-Erkrankungen

Gemäß der ursprünglichen Prion-Hypothese von Prusiner (siehe Punkt 1.2.1) ist ein proteinartiger Erreger ohne Nukleinsäure Hauptbestandteil der infektiösen Partikel (Prionen). Eine weitergehende Hypothese, die Prion-Protein-*only*-Hypothese, stellt das Prion-Protein in seiner Scrapie-Form (PrP^{Sc}) als Hauptbestandteil der Prionen dar (Prusiner *et al.* 1981; Prusiner 1982).

Ein Jahrzehnt nach Formulierung dieser Hypothesen haben Experimente mit transgenen Tieren bestätigt, dass das Prion-Protein in Zusammenhang mit der Pathogenese der Prion-Erkrankungen steht. Transgene Mäuse, die kein PrP^C exprimieren ($Prnp^{0/0}$-Mäuse), sind selbst nach intrazerebraler Inokulation mit dem Erreger nicht infizierbar und können den Erreger nicht propagieren (Büeler *et al.* 1993). Sie bleiben symptomfrei und zeigen keine histopathologischen Veränderungen im Gehirn. Kontrolltiere dagegen weisen ca. 140 Tage nach Inokulation neurologische Symptome auf und sterben infolgedessen nach ungefähr weiteren acht Tagen. Durch Wiedereinführung des Prion-Protein-Gens in die $Prnp^{0/0}$-Mäuse kann die Infizierbarkeit wiederhergestellt werden (Büeler *et al.* 1993). Die Ergebnisse konnten mit weiteren Erregertypen in verschiedenen $Prnp^{0/0}$-Mauslinien bestätigt werden (Prusiner *et al.* 1993; Manson *et al.* 1994; Sakaguchi *et al.* 1995). Aus diesen Befunden lässt sich schlussfolgern, dass eine Expression von PrP^C für eine Infektion notwendig ist.

Für die Replikation des infektiösen Materials im Gehirn ist eine Umwandlung von PrP^C in die infektiöse (pathogene) Form PrP^{Sc} notwendig (Pan *et al.* 1993). Es wird

angenommen, dass diese Umwandlung durch direkte Interaktion beider Isoformen entweder in lysosomalen Kompartimenten oder auf der Zelloberfläche stattfindet (Caughey und Raymond 1991; Borchelt *et al.* 1992; Taraboulos *et al.* 1995). Dabei zwingt das eindringende PrP^{Sc} dem zellulären PrP^{C} seine pathogene Konformation auf, was zu einer Umwandlung von PrP^{C} in PrP^{Sc} und somit zu einer Nettoneusynthese der pathogenen Konformation führt.

Der konkrete Mechanismus der Konversion ist noch unbekannt. Es gibt zahlreiche Konversionsmodelle, wobei die Modelle von Prusiner und Landsbury am meisten diskutiert werden. Beide Modelle unterscheiden sich vor allem in der Frage, wie viele Moleküle an der Umfaltung von PrP^{C} beteiligt sind.

Beim Heterodimer-Modell von Prusiner ist die Bildung eines Heterodimers aus PrP^{C} und PrP^{Sc} der kritische Schritt, woraufhin ein PrP^{C}-Molekül in einer autokatalytischen Reaktion durch ein PrP^{Sc}-Molekül umgefaltet wird (Prusiner 1991) (Abb. 7). Der direkte Kontakt beider Moleküle wurde aus Experimenten mit transgenen Mäusen abgeleitet, die zusätzlich zum Maus-PrP^{C} auch Hamster-PrP^{C} exprimierten (Prusiner *et al.* 1990). Nach Infektion mit Hamster- bzw. Maus-Prionen wurde lediglich das jeweilige speziesspezifische PrP^{Sc} in den transgenen Mäusen propagiert.

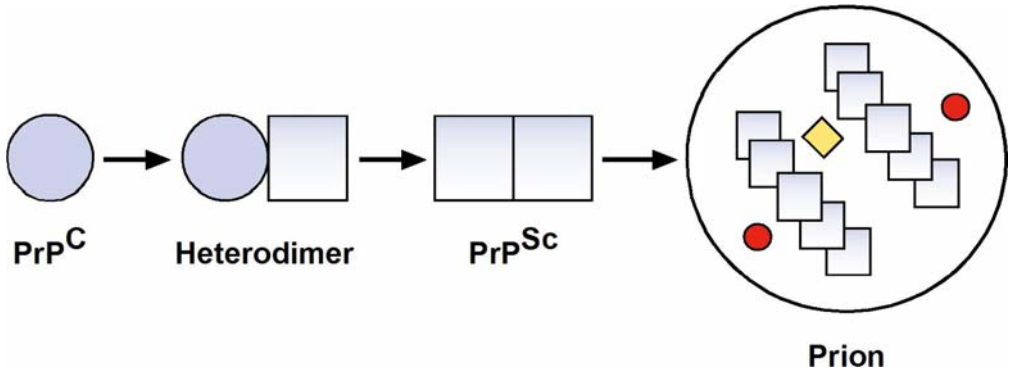

Abbildung 7: Replikation von PrP^{Sc}. Nach dem Heterodimer-Modell von Prusiner findet die Umwandlung von PrP^{C} in PrP^{Sc} durch direkte Interaktion beider Isoformen statt, wobei jeweils ein PrP^{C}-Molekül in einer autokatalytischen Reaktion durch ein PrP^{Sc}-Molekül unter Bildung eines Heterodimers umgefaltet wird. Mehrere PrP^{Sc}-Aggregate bilden eine infektiöse Einheit (Prion), welche außerdem in geringem Anteil Lipide (gelb) und Polysaccharide (rot) enthält.

Beim Nukleations-Modell von Landsbury bildet sich ein Kristallisationskeim (Nukleus), der eine Mindestgröße für den weiteren Einbau von PrP^{Sc} besitzen muss. Somit erfolgt ein irreversibler Einbau von PrP^{Sc} in ein bereits bestehendes PrP^{Sc}-

Oligomer. Im Gegensatz zum Heterodimer-Modell stellt nach Landsbury erst der Nukleus ein infektiöses Partikel dar und nicht bereits das einzelne PrP^{Sc}-Molekül (Jarrett und Lansbury 1993). Der größte Kritikpunkt an den Modellen von Prusiner und Landsbury besteht darin, dass diese nur eine Umwandlung in Lösung berücksichtigen und keine zellulären Bedingungen, wie beispielsweise die Membranverankerung von PrP^{C}, widerspiegeln können (Eigen 1996).

Wie viele PrP^{Sc}-Moleküle tatsächlich für eine Infektion nötig sind, kann aufgrund der derzeit vorhandenen proteinanalytischen Methoden nicht eindeutig geklärt werden. Titrationsversuche haben ergeben, dass eine infektiöse Einheit (Prion) von ca. 10^5 PrP^{Sc}-Molekülen gebildet wird (Bolton *et al.* 1982), von welchen aber theoretisch eine geringere Anzahl wahrhaft infektiös sein könnte. Andererseits könnte die Bildung großer Aggregate tatsächlich für die Infektiösität notwendig sein. Neben PrP^{Sc}-Aggregaten sind auch 10% Polysaccharide und 1% Lipide in Prionen enthalten (siehe Abb. 7). Letztere sind von der Art wie sie in Einschnürungen der äußeren Zellmembran (*Caveolae*) vorkommen und liefern daher einen möglichen Hinweis auf den Entstehungsort von Prionen (Taraboulos *et al.* 1995). Diese weiteren Bestandteile könnten zur Stabilisierung der PrP^{Sc}-Konformation oder zum Kontakt mit Komponenten der Zelloberfläche und somit zur Infektiösität beitragen (Klein *et al.* 1998; Appel *et al.* 1999).

Es wurden zahlreiche Versuche zur Herstellung von infektiösem PrP^{Sc} mittels *in vitro*-Konversion von in Bakterien exprimiertem, rekombinantem PrP unternommen. Diese *in vitro* erzeugten Aggregate waren zwar PK-resistent, jedoch nicht infektiös (Kocisko *et al.* 1994; Kaneko *et al.* 1995; Kaneko *et al.* 1997; Hill *et al.* 1999; Jackson *et al.* 1999; Post *et al.* 2000). Der Grund für die fehlende Infektiösität wurde darin vermutet, dass die in Bakterien nicht stattfindende posttranslationale Modifizierungen von PrP oder ein zusätzlicher in Bakterien nicht vorhandener Faktor, der als Protein X bezeichnet wurde, für die Herstellung der Infektiösität notwendig ist (Telling *et al.* 1995). Dass man nicht die richtigen Bedingungen gefunden hatte, erschien aufgrund der zahlreichen Versuche eher unwahrscheinlich. Kürzlich gelang es jedoch tatsächlich der Gruppe von Prusiner rekombinantes PrP in Bakterien herzustellen, das nach seiner *in vitro*-Konversion und anschließenden intrazerebralen Inokulation in transgene Mäuse, zu histopathologischen Veränderungen und Propagierung von PK-resistentem sowie infektiösem PrP^{Sc} im Gehirn führte (Legname *et al.* 2004). Nach Ausbildung der typischen neurologischen Symptome kam es zum Tod der Tiere.

Somit scheint eine Missfaltung von PrP^C ausreichend für die Übertragung von Prion-Erkrankungen zu sein.

Diese und vorangegangene Ergebnisse bestätigen, dass die Konformationsänderung von PrP^C in PrP^{Sc} ein entscheidender Vorgang der Infektion ist. Damit kann aber nicht nur die Entstehung der durch Infektion erworbenen Prion-Erkrankungen erklärt werden, sondern auch die der sporadischen und hereditären Formen. Bei der sporadischen CJK (sCJK) wird angenommen, dass die Missfaltung von PrP^C spontan entsteht. Die spontan missgefalteten PrP-Moleküle können dann den Ausgangspunkt für die weitere Propagierung der missgefalteten Formen bilden. Der Prozess der Umwandlung müsste wesentlich langsamer und mit weitaus geringerer Wahrscheinlichkeit als bei einer Infektions-bedingten Prion-Erkrankung erfolgen. Dies würde auch das seltene Vorkommen dieser Erkrankungen erklären, von welchen 80-90% den sCJK zugeordnet werden. Bei hereditären Prion-Erkrankungen wird angenommen, dass Mutationen im Prion-Protein Gen (siehe Abb. 2) die Umfaltung von PrP^C in eine pathogene Konformation mehr oder weniger effektiv begünstigen können. Damit erklärt man sich die unterschiedliche Penetranz der familiären Erkrankungen, welche sogar bis zu 100 % betragen kann (Spudich *et al.* 1995).

1.2.6 Rätsel um die Funktion von PrP^C

Die physiologische Funktion des zellulären Prion-Proteins verbleibt auch über zwanzig Jahre nach seiner Entdeckung weitgehend unbekannt. Die hohe Expressionsrate von PrP^C während der frühen Embryogenese und im adulten Organismus (Manson *et al.* 1992), die starke Konservierung innerhalb der Säugetiere (Schatzl *et al.* 1995), sowie die Existenz des PrP-Gens in Vögeln (Gabriel *et al.* 1992), Reptilien (Simonic *et al.* 2000), Amphibien (Strumbo *et al.* 2001) und Fischen (Oidtmann *et al.* 2003) lässt eine wichtige physiologische Funktion von PrP vermuten. Bislang gibt es jedoch lediglich indirekte Hinweise auf mögliche Funktionen.

Aus den ersten Untersuchungen mit $Prnp^{0/0}$-Mäusen konnten keine wesentlichen Erkenntnisse über die Funktion von PrP^C gewonnen werden, da die Tiere keinen signifikanten Phänotyp aufwiesen (Büeler *et al.* 1992). Nach weiteren Studien konnten Abweichungen im zirkadianen Rhythmus, der synaptischen Physiologie und

in einigen elektrophysiologischen Parametern von $Prnp^{0/0}$-Mäusen nachgewiesen werden (Tobler *et al.* 1996).

Aus Analysen in neuronalen Zellen wurden verschiedene Funktionen von PrP^C in der Signaltransduktion und der Protein-Protein-Interaktion in Erwägung gezogen. So wurde nach induzierter Dimerisierung von PrP^C eine darauf folgende Veränderung der Phosphorylierung der Tyrosin-Kinase Fyn beobachtet (Mouillet-Richard *et al.* 2000). Weiterhin wurden der 37 kDa Laminin-Rezeptor (Rieger *et al.* 1997; Graner *et al.* 2000; Gauczynski *et al.* 2001), ein nicht näher charakterisiertes 66 kDa Membranprotein (Martins *et al.* 1997) und das Stress-induzierbare Protein 1 (STI 1) (Zanata *et al.* 2002), auch ein Membranprotein, als mögliche Interaktionspartner von PrP^C vorgeschlagen. Letztere Studie führte zur Vermutung, dass PrP^C eine neuroprotektive Signalwirkung besitzen könnte, da die Interaktion von PrP^C mit STI 1 Neuronen vor einer Anisomycin-induzierten Apoptose schützt.

Eine neuroprotektive Funktion von PrP wurde auch aufgrund neuerer Studien mit transgenen Mäusen vorgeschlagen. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass durch spezifische Antikörperbindung von PrP^C *in vivo* Apoptose in primären Neuronen ausgelöst wird, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass eine neuroprotektive Signalwirkung, die von PrP^C ausgeht, unterbrochen wird (Solforosi *et al.* 2004). Weitere *in vivo*-Untersuchungen deuten darauf hin, dass PrP^C in Prion-Erkrankungen direkt in die neurodegenerative Kaskade involviert ist (Brandner *et al.* 1996; Mallucci *et al.* 2003) (siehe Punkt 1.2.7).

Da $Prnp^{0/0}$-Mäuse keinen signifikanten Phänotyp aufweisen, wurde angenommen, dass diese Tiere bereits früh in der Embryogenese Kompensationsmechanismen entwickeln, um dem Mangel an PrP^C entgegenzuwirken. Die Generierung von CreloxP-Mäusen ermöglicht die PrP-Expression erst zu einem späteren postnatalen Zeitpunkt einzustellen (Mallucci *et al.* 2002). Außer einer Verminderung der Nachhyperpolarisationsströme in hippocampalen Zellen, was auf eine Rolle von PrP^C in der Modulierung neuronaler Erregbarkeit hinweist, konnten jedoch keine weiteren Erkenntnisse über die Funktion gewonnen werden.

Aufgrund der Kupfer-bindenden Eigenschaft von PrP^C (Broussolle *et al.* 1989; Stöckel *et al.* 1998; Viles *et al.* 1999) wird eine Rolle von PrP^C in der Kupfer-Homöostase vorgeschlagen. Die Oktarepeats im unstrukturierten N-Terminus von PrP^C stellen eine Bindestelle für Kupferionen dar (Hornshaw *et al.* 1995; Hornshaw *et al.* 1995; Miura *et al.* 1996; Brown *et al.* 1997). Verschiedene Untersuchungen haben

ergeben, dass PrP^C bevorzugt auf der Oberfläche von synaptischen Endigungen im ZNS lokalisiert ist (Fournier *et al.* 1995; Sales *et al.* 1998; Herms *et al.* 1999). Bei $Prnp^{0/0}$-Mäusen wurde eine signifikante Verminderung der synaptosomalen Kupferkonzentration beobachtet (Collinge *et al.* 1994; Manson *et al.* 1995), was vermutlich auf eine verminderte Wiederaufnahme des bei der synaptischen Vesikelfreisetzung in den synaptischen Spalt gelangenden Kupfers zurückzuführen ist. Zusätzlich wurde bei $Prnp^{0/0}$-Mäusen eine verminderte Aktivität eines Kupfer-abhängigen Enzyms, der Superoxiddismutase (SOD), festgestellt (Brown *et al.* 1997). SOD fängt schädliche Radikale ab. PrP^C könnte möglicherweise auch eine Rolle bei der Resistenz gegen oxidativen Stress spielen. Veränderungen im Schlaf-Wach-Rhythmus von $Prnp^{0/0}$-Mäusen (Tobler *et al.* 1996; Tobler *et al.* 1997) könnten durch eine beeinträchtigte Kupferaufnahme von PrP^C und eine verminderte Aktivität Kupfer-abhängiger Enzyme, wie der Monaminoxidase, erklärt werden (Oxenkrug und Requintina 1998). Dieses Enzym ist für die Synthese des für den Schlafrhythmus wichtigen Hormons Melatonin essentiell (McArthur *et al.* 1991. Die meisten Veränderungen, die bei $Prnp^{0/0}$-Mäusen beobachtet wurden, sind Folgeerscheinungen der verminderten Kupferbindung oder -fehlverteilung. Es bleibt zu klären, ob die Bindung und Wiederaufnahme von Kupfer in die Präsynapse eine primäre Funktion von PrP^C darstellt {Shyng, 1994 #612; Pauly und Harris 1998).

1.2.7 Missfaltung von PrP^C kann zur Bildung von infektiösen Prionen und / oder Neurodegeneration führen

Der Mechanismus der Neurodegeneration bei Prion-Erkrankungen ist derzeit unbekannt. Man geht aber davon aus, dass die Missfaltung von PrP^C (siehe Punkt 1.2.5) eine zentrale Rolle spielt. Bei den meisten Prion-Erkrankungen kommt es neben einer äußerst progressiven Neurodegeneration zur Bildung von Proteinase K (PK)-resistentem und infektiösem PrP^{Sc}, welches sich in Form von Plaques im Gehirn ablagert (vgl. Abb. 3).

In einer neueren Studie jedoch konnte festgestellt werden, dass im Gehirn einiger Patienten mit sporadischer CJK lediglich infektiöse Formen von PrP gebildet werden, welche zwar eine missgefaltete Konformation erhalten, aber keine PK-Resistenz besitzen (Safar *et al.* 2005).

Interessanterweise wurde auch bei sehr wenigen hereditären Prion-Erkrankungen trotz einer stark vorhandenen Neurodegeneration keine Bildung von PrP^{Sc} beobachtet (Hsiao und Prusiner 1990; Medori *et al.* 1992; Budka *et al.* 1997). Im Gehirn der betroffenen Patienten konnten also keine Plaques gefunden werden. Tatsächlich haben folgende Experimente gezeigt, dass weitere missgefaltete Spezies von PrP existieren, die in Abwesenheit von PrP^{Sc} Neurodegeneration vermitteln können.

Bei der zunächst vorgestellten Spezies handelt es sich um eine alternative Topologie von PrP an der ER-Membran. Versuche in zellfreien Translationssystemen mit Weizenkeimextrakten und Kaninchen-Retikulolysat haben ergeben, dass das Prion-Protein neben seiner GPI-Verankerung an der Zelloberfläche zum geringen Anteil auch eine transmembrane Form an der ER-Membran annehmen kann (Lopez *et al.* 1990; Yost *et al.* 1990; Hegde *et al.* 1998). Dabei ist PrP an seiner putativen Transmembrandomäne, auch als hydrophobe Domäne (HD) bezeichnet (AS 112-135), in die ER-Membran integriert, woraus sich zwei unterschiedliche Topologien ergeben können: ^{NTM}PrP mit dem N-Terminus und ^{CTM}PrP mit dem C-Terminus im ER-Lumen. Mutationen in der HD-Domäne und in der N-terminalen Signalsequenz von PrP modulieren den relativen Anteil dieser Topologien (Hegde *et al.* 1998; Kim *et al.* 2001). So liegt sowohl bei Patienten mit der A117V Mutation als auch in entsprechend transgenen Mausmodellen eine erhöhte Synthese von ^{CTM}PrP vor. Diese alternative ER-Membran-Topologie ist ausreichend, um auch bei den Tieren eine Neurodegeneration zu vermitteln (Hegde *et al.* 1999).

Als weitere pathogene Spezies konnte eine zytosolische Form von PrP identifiziert werden. Transgene Mäuse, die aufgrund einer fehlenden N-terminalen ER-Signalsequenz eine zytosolische PrP-Form exprimierten, entwickelten ebenfalls eine starke Neurodegeneration. Darüber hinaus konnte nach Behandlung von neuronalen Zellen mit proteasomalem Inhibitor Zelltod nachgewiesen werden, was einen Anstieg an unglykosiliertem und unlöslichem PrP im Zytosol zur Folge hatte (Ma *et al.* 2002). Eine weitere zytosolische Form von PrP wurde für eine pathogene Stoppmutante (Y145 Stopp) beschrieben (Kitamoto *et al.* 1993; Zanusso *et al.* 1999). Eine mechanistische Studie in neuronalen Zellen hat ergeben, dass die C-terminale Domäne von PrP^{C} entscheidend für den Import des Proteins in das ER ist. Pathogene Stoppmutanten mit deletierten Domänen innerhalb des C-Terminus, wie Y145 Stopp oder auch Q160 Stopp, beeinträchtigen den Import von PrP in das ER. Als Folge

darauf besitzt ein signifikanter Anteil dieser Mutanten eine ungeschnittene ER-Signalsequenz und liegt somit im Zytosol vor (Heske *et al.* 2004).

Mutationen, die eine Fehlregulierung in der Biogenese von PrP^{C} oder eine alternative Topologie des Proteins an der ER-Membran zur Folge haben, können also in Abwesenheit von PrP^{Sc} Neurodegeneration verursachen. Interessanterweise ist umgekehrt auch eine Propagierung von PrP^{Sc} ohne darauf folgende Neurodegeneration möglich. Dies wurde eindrucksvoll durch folgende *in vivo* Experimente belegt.

Neuroektodermales Gewebe von transgenen PrP-überexprimierenden Tieren (tg20-Mäuse) wurde in das Gehirn von $Prnp^{0/0}$-Mäusen transplantiert, die daraufhin mit Scrapie-Erregern intrazerebral inokuliert wurden (Brandner *et al.* 1996). Nach einer für tg20-Mäusen typischen Inkubationszeit von ca. siebzig Tagen entwickelten die Transplantate im Gegensatz zum restlichen Gehirn histopathologische Veränderungen, die später zu einer starken Neurodegeneration führten. Darüber hinaus wurde zwar PrP^{Sc}, das aus dem infizierten Transplantat stammte, in Form von Plaques auch im Gehirn der Empfänger-Mäuse gefunden, aber selbst nach über einem Jahr konnten keine pathologischen Veränderungen in der Nachbarschaft dieser Plaques festgestellt werden. PrP^{Sc} scheint also auf Neuronen, welche kein PrP^{C} exprimieren, nicht toxisch zu wirken.

Weitere wichtige Einblicke lieferten erst kürzlich Experimente mit transgenen MloxP-Mäusen, bei welchen acht Wochen nach Inokulation mit dem Scrapie-Erreger ausschließlich die neuronale Expression von PrP^{C} eingestellt wurde (Mallucci *et al.* 2003). Zu diesem Zeitpunkt waren pathologische Veränderungen in Form einer frühen Spongiose zu erkennen. Während jedoch in Kontrollmäusen zwölf Wochen nach der Inokulation ein starker Neuronenverlust vorlag, der zum Tod führte, zeigten die transgenen MloxP-Mäuse bereits zu diesem Zeitpunkt einen Rückgang der Spongiose und entwickelten selbst achtundvierzig Wochen später keine Neurodegeneration. Im nicht-neuronalen Gewebe dieser Tiere, in welchem PrP^{C} weiterhin exprimiert wurde, erfolgte eine starke Ablagerung von PrP^{Sc}, die vergleichbar war mit der von infizierten Kontrollmäusen im Endstadium ihrer Erkrankung. Trotz der starken PrP^{Sc}-Propagierung blieben die Tiere symptomfrei. Eine Propagierung von PrP^{Sc} in nicht-neuronalem Gewebe scheint also keine pathogenen Auswirkungen zu haben.

Die Missfaltung von PrP^{C} kann einerseits zu einer Bildung von PrP^{Sc} und Neurodegeneration führen, andererseits aber – wie die hier vorgestellten Studien

zeigen – auch zu einer Bildung von PrP^{Sc} ohne Neurodegeneration (Brandner *et al.* 1996; Mallucci *et al.* 2003) oder zu einer Neurodegeneration ohne die Bildung von PrP^{Sc} (Muramoto *et al.* 1997; Chiesa *et al.* 1998; Hegde *et al.* 1998; Hegde *et al.* 1999; Ma *et al.* 2002).

Diese Befunde führen zu einer interessanten Hypothese, welche PrP^{Sc} – ähnlich wie die Prion-Protein-*only*-Hypothese (siehe Punkt 1.2.5) – als infektiöses Agens darstellt, das die Transmission von Prion-Erkrankungen vermittelt, aber nicht auch als neurotoxisches Agens. Die Identifizierung des neurotoxischen Agens bleibt weiterhin eine große Herausforderung.

1.3 Maturierung und Faltung sekretorischer Proteine

Da Analysen der posttranslationalen Modifikationen und der Proteinfaltung wesentlicher Bestandteil der vorliegenden Arbeit sind, wird in diesem Kapitel näher auf die komplexe Glykosilierung und GPI-Verankerung von Proteinen eingegangen (siehe Punkt 1.3.1). Außerdem werden verschiedene Qualitätskontrollmechanismen der Zelle vorgestellt, welche dazu dienen die Bildung und den weiteren Transport missgefalteter Proteine zu verhindern (siehe Punkt 1.3.2).

1.3.1 PrP^{C} erhält zwei komplexe Glykosilierungen und eine GPI-Verankerung

Das Prion-Protein wird durch zwei komplexe Glykosilierungen an den Asparaginen 180 und 196 (Aminosäurenummerierung gemäß Maus-PrP) posttranslational modifiziert (Endo *et al.* 1989; Haraguchi *et al.* 1989; Rudd *et al.* 1999; Stimson *et al.* 1999). Die Zuckerreste werden durch N-glykosidische Bindungen an die zwei Asparaginseitenketten von PrP^{C} geknüpft, die jeweils Teil eines typischen Erkennungsmotivs sind.

Für die N-Glykosilierung von Proteinen gibt es zwei verschiedene Erkennungssequenzen: N-X-S (Asparagin - beliebige AS außer Prolin - Serin) und wie im Fall von PrP^{C} N-X-T (Asparagin - X ist bei PrP^{C} Isoleucin bzw. Phenylalanin -

Threonin). *In vitro*-Analysen haben ergeben, dass das Motiv N-X-T eine vierzigmal effizientere Glykosilierung der Proteine ermöglicht als N-X-S (Bause 1983).
Die N-Glykosilierung aller Proteine beginnt cotranslational im ER, also noch während des ER-Imports, mit dem Transfer der Core Glykane. Bei einem Teil der Proteine – so auch bei PrP^C – erfolgt nach weiterer Prozessierung im Golgi-Apparat eine Umwandlung der Core Glykane in komplexe Strukturen (terminale Glykosilierung). Während im ER die Core Glykane aller Proteine eine einheitliche Struktur und Zusammensetzung der Oligosaccharide besitzen und unter anderem eine Rolle in der Proteinfaltung und Qualitätskontrolle einnehmen, nehmen die Proteine im Golgi-Apparat diverse komplexe Strukturen mit heterogener Oligosaccharid-Zusammensetzung an, die Zelltyp- und Spezies-spezifisch sind und verschiedene Funktionen der reifen Proteine, wie Zellerkennung oder Signalwirkung, vermitteln (Kornfeld und Kornfeld 1985; Paulson 1989; Varki 1993).

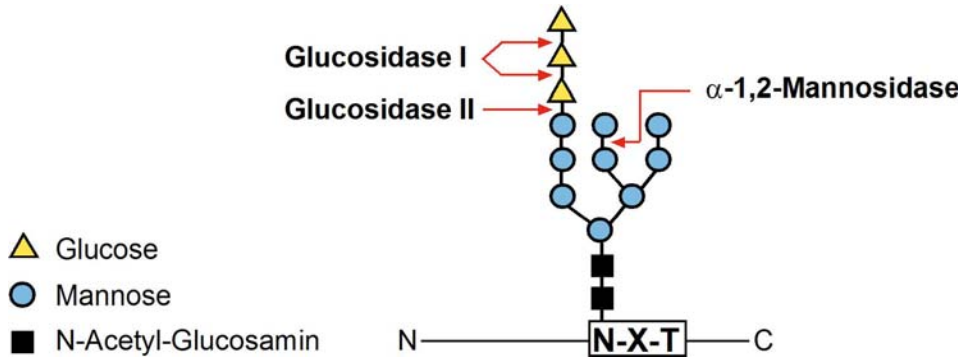

Abbildung 8: Struktur eines N-glykosidisch verknüpften Core Glykans im ER. Die N-Glykosilierung im ER erfolgt cotranslational durch Bindung der Core Glykane an die zwei Asparaginseitenketten von PrP^C, die jeweils Teil des Erkennungsmotivs N-X-T (Asparagin - Isoleucin bzw. Phenylalanin - Threonin) sind. Die drei Glucosereste- und ein Mannoserest werden im ER mit Hilfe der Glucosidase I und II und der α-1,2-Mannosidase entfernt. N: N-Terminus von PrP^C; C: C-Terminus von PrP^C.

Die Biosynthese der N-glykosidischen Oligosaccharide beginnt damit, dass im Zytosol des ERs eine Oligosaccharid-Einheit bestehend aus fünf Mannose- und zwei N-Acetyl-Glucosamin-Resten (Man5 GlucNAc2) an ein an der ER-Membran lokalisiertes Carrier-Lipid (Dolicholphosphat) gebunden wird. Dieser stark hydrophobe Carrier transferiert die Zucker-Einheit durch „Umklappen“ aus dem Zytosol in das Lumen des ERs. Hier erhält das Dolicholphosphat durch aufeinander

folgende Addition von Monosacchariden ein aktiviertes Core Oligosaccharid (Kornfeld und Kornfeld 1985; Gahmberg und Tolvanen 1996; Burda und Aebi 1999). Dieser Oligosaccharid-Block (Core Glykan, Abb. 8) bestehend aus drei Glucose-, neun Mannose- und zwei N-Acetyl-Glucosamin-Resten (Glc3 Man9 GlucNAc2) wird als Ganzes mit Hilfe der Oligosaccharyl-Transferase cotranslational vom Lipid-Carrier auf eine Asparaginseitenkette der wachsenden Polypeptidkette übertragen (Silberstein und Gilmore 1996). Darauf folgend werden mit Hilfe der Glucosidase I und II und der α-1,2-Mannosidase die drei Glucose- und einer der Mannose-Reste abgespalten (Kornfeld und Kornfeld 1985; Moremen *et al.* 1994) (Abb. 8, 9). Letzteres stellt das Signal für den Export des Proteins in den Golgi-Komplex dar. Mit Hilfe der Glucosyl-Transferase werden missgefaltete oder ungefaltete Proteine reglucosiliert und somit erneut in den Calnexin-Zyklus im ER überführt (siehe Punkt 1.3.3).

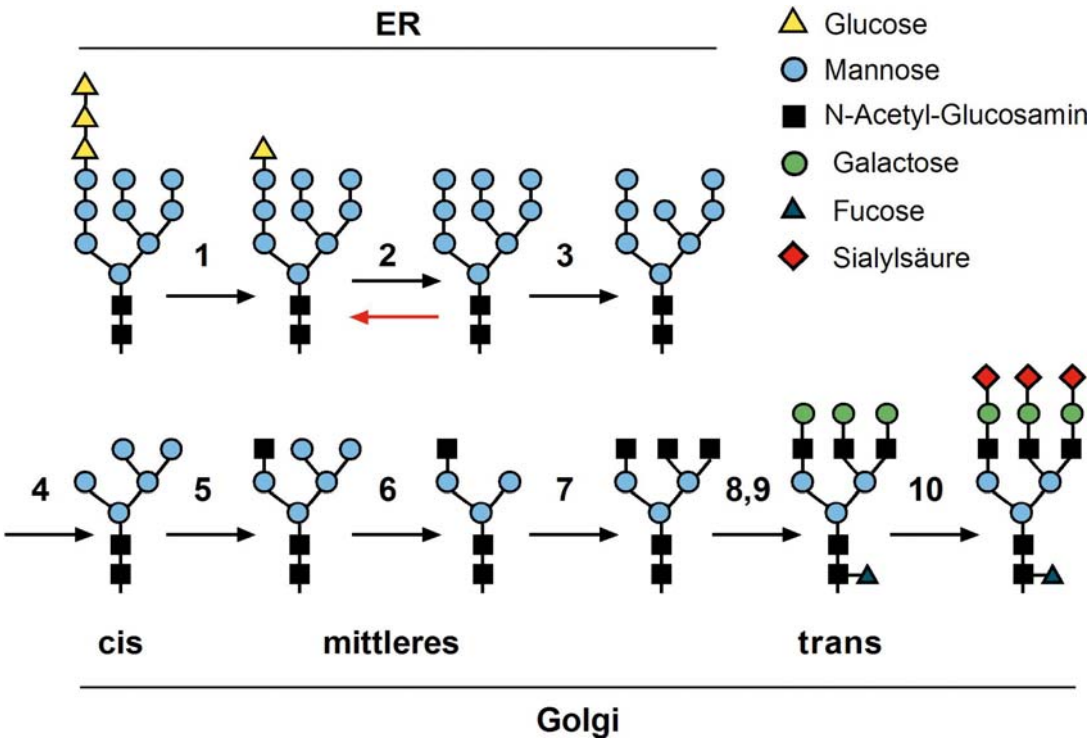

Abbildung 9: Prozessierung der an Asparagin gebundenen Oligosaccharide im ER und den drei Golgi-Kompartimenten. Folgende Enzyme sind an der Prozessierung beteiligt: **(1)** Glucosidase I, **(2)** Glucosidase II, **(3)** α-1,2-Mannosidase des ERs, **(4)** Mannosidase I des Golgi-Apparats, **(5)** GlcNAc-Transferase I, **(6)** Mannosidase II des Golgi-Apparats, **(7)** GlcNAc-Transferase II und IV, **(8)** Fucosyl-Transferase, **(9)** Galactosyl-Transferase, **(10)** Sialyl-Transferase. Der rote Pfeil symbolisiert die Reglucosilierung, welche den erneuten Eintritt in den Calnexin-Zyklus ermöglicht.

Die Proteine gelangen vom ER in das *cis*-Golgi, wo weitere drei Mannose-Reste entfernt werden (Abb. 9). Im mittleren Golgi folgt auf eine Addition eines N-Acetyl-Glucosamin-Restes die Abspaltung weiterer zwei Mannose-Einheiten. Bei der terminalen Glykosilierung im *trans*-Golgi erfolgt die Addition der terminalen Zuckerreste bestehend aus N-Acetyl-Glucosaminen, Galactose, Sialylsäure und Fucose. Das Protein ist nun komplex glykosiliert. Dabei sind lediglich zwei N-Acetyl-Glucosamin- und drei Mannose-Reste des ursprünglichen Core Glykans aus dem ER erhalten. Ebenso wie PrP^{C}, ist die pathogene Isoform PrP^{Sc} komplex glykosiliert. PrP^{Sc} besitzt jedoch eine unterschiedliche Oligosaccharid-Zusammensetzung (Rudd *et al.* 1999).

Eine weitere posttranslationale Modifizierung von PrP^{C} ist die Anheftung des GPI-Ankers, der das reife Protein an die äußere Plasmamembran heftet (Stahl *et al.* 1987). Der GPI-Anker wird im ER als Ganzes synthetisiert und besteht aus einem Distearat, das über eine Oligosaccharid-Einheit mit Ethanolaminphosphat verknüpft wird. Der vorgeformte GPI-Anker wird im ER über die NH_2-Gruppe des Ethanolaminphosphats mittels einer Transamidase-Reaktion an die carboxyterminale Akzeptoraminosäure (Serin 231 von PrP^{C}) – die so genannte ω-site – übertragen (Englund 1993). Dabei wird die hydrophobe 23 AS lange C-terminale GPI-Signalsequenz (GPI-SS) von PrP^{C} abgeschnitten.

Die GPI-SS von PrP^{C} besitzt ähnliche Eigenschaften wie die anderer GPI-verankerter Proteine: an der ω-site, sowie an den Positionen ω+1 und ω+2, befinden sich lediglich einfache Aminosäuren (AS) mit kleinen Seitenketten – im Fall von PrP^{C} drei Serinreste – gefolgt von einer 10-12 AS langen hydrophoben Domäne (Ferguson und Williams 1988; Moran *et al.* 1991; Nuoffer *et al.* 1991; Kodukula *et al.* 1993; Nuoffer *et al.* 1993).

1.3.2 Qualitätskontrollmechanismen im ER können die Bildung und den weiteren Transport missgefalteter Proteine verhindern

Wie unter Punkt 1.2.5 erläutert, ist die Missfaltung von PrP^C kennzeichnend für alle Prion-Erkrankungen. In diesem Zusammenhang ist es interessant die verschiedenen Qualitätskontrollmechanismen im ER zu betrachten, mit welchen die Zelle ausgestattet ist, um eine Missfaltung von Proteinen zu verhindern oder bereits missgefaltete Proteine zu erkennen und gegebenenfalls zu eliminieren. Zu den wichtigsten Qualitätskontrollmechanismen im ER gehören der Calnexin-Zyklus, die ER-assoziierte Degradierung (*ER associated degradation*, ERAD) und die *Unfolded Protein Response* (UPR).

Der Calnexin-Zyklus ist im ER fast aller Eukaryoten zu finden (Helenius *et al.* 1997; Zapun *et al.* 1999; Parodi 2000). Nachdem durch die Glucosidase I zunächst zwei der drei Glucose-Reste der neu synthetisierten Proteine im ER abgespalten werden (siehe Abb. 9, Schritt 1), werden die Proteine, die nur noch einen Glucose-Rest besitzen (Glc1 Man9 GlucNAc2), von zwei ER-Chaperonen, dem membrangebundenen Calnexin und dem zytosolischen Calreticulin, erkannt und gebunden (Ou *et al.* 1993; Hammond *et al.* 1994). Diese Lektine bilden jeweils Komplexe mit ERp57, einer Thiooxidreduktase, die den faltenden Proteinen bei der Ausbildung von Disulfidbrücken assistiert (Oliver *et al.* 1997; Molinari und Helenius 1999). Die Interaktion mit den beiden Lektinen und ERp57 verlangsamt die Faltung vieler Proteine und erhöht damit deren Effizienz. Nachdem der übrige Glucose-Rest des neu synthetisierten Proteins durch die Glucosidase II abgespalten wird (Abb. 9, Schritt 2), dissoziieren die Komplexe. Lediglich missgefaltete oder ungefaltete Proteine werden erneut mit Hilfe der Glucosyl-Transferase reglucosiliert und binden wieder an die Lektine (Suh *et al.* 1989; Sousa *et al.* 1992; Trombetta *et al.* 1996). Der Calnexin-Zyklus wird so oft durchlaufen bis das Protein richtig gefaltet oder zur Degradierung freigegeben wird (Hebert *et al.* 1995). Ist ein Protein schließlich korrekt gefaltet, wird es nicht mehr reglucosiliert, sondern durch Abspaltung eines Mannose-Restes für den Export zum Golgi-Apparat freigegeben (siehe Abb. 9, Schritt 3). Die Rolle des Calnexin-Zyklus in der Qualitätskontrolle besteht also darin zu verhindern, dass missgefaltete Proteine aus dem ER exportiert werden.

Die *Unfolded Protein Response* (UPR) ist eine komplexe Signaltransduktionskaskade, die ausgelöst wird, wenn sich missgefaltete Proteine im ER anhäufen (Lee 1987; Kozutsumi *et al.* 1988; Gething und Sambrook 1992). Hierbei wird die Transkription verschiedener Gene induziert, die für unterschiedliche Chaperone codieren (Mori *et al.* 1992). Chaperone - die *molekularen Anstandsdamen* der Zelle - sind essentiell für das Überleben der Zelle. Sie unterstützen die Proteinfaltung, indem sie ungefaltete oder missgefaltete Proteine reversibel binden und somit entweder passiv einer Proteinaggregation vorbeugen oder aktiv eine korrekte Faltung vermitteln (Hartl 1996; Netzer und Hartl 1998; Ellis und Hartl 1999; Agashe und Hartl 2000; Hartl und Hayer-Hartl 2002; Walter und Buchner 2002). Die UPR bewirkt unter anderem die Transkription der ER-Chaperone BiP und Grp94, der Protein-Disulfid-Isomerase, die eine Ausbildung korrekter Disulfidbrücken katalysiert (Dorner *et al.* 1990; Little und Lee 1995) und der Proteasomuntereinheiten, was zu einem verstärkten proteasomalen Abbau der missgefalteten Proteine im Zytosol führt (Ng *et al.* 2000).

Die ER-assoziierte Degradierung (ERAD) ist ein Mechanismus zur selektiven Entfernung missgefalteter Proteine aus dem ER für die anschließende Degradierung dieser durch das 26S-Proteasom (Finley *et al.* 1984; Jentsch *et al.* 1987; Hurtley und Helenius 1989; Klausner und Sitia 1990; Sommer und Jentsch 1993; Jensen *et al.* 1995). Missgefaltete Proteine im ER werden mit Hilfe von Chaperonen sowie der Glykosilierungsmaschinerie erkannt (McCracken und Brodsky 1996; Plemper *et al.* 1997; Jakob *et al.* 1998) und retrograd in das Zytosol zurücktransportiert (Wiertz *et al.* 1996; Plemper *et al.* 1997; Zhou und Schekman 1999). Für den Abbau vorgesehene Proteine werden im Zytosol durch Polyubiquitinierung markiert und anschließend rasch durch das 26S-Proteasom degradiert (Schlesinger *et al.* 1975; Chau *et al.* 1989).

ERAD und UPR sind eng miteinander gekoppelt. So bewirkt eine fehlende ERAD die konstitutive Aktivierung der UPR. Mutationen, die beide Mechanismen ausschalten, sind synthetisch letal (Friedlander *et al.* 2000; Ng *et al.* 2000; Travers *et al.* 2000). Im Vergleich dazu ist auch eine fehlende Expression von Calreticulin für transgene Mäuse im embryonalen Stadium letal (Mesaeli *et al.* 1999).

1.4 Therapeutische Ansätze bei Prion-Erkrankungen

Eine Therapie der Prion-Erkrankungen ist derzeit nicht möglich. Zur Entwicklung bisheriger therapeutischer Ansätze haben zahlreiche Studien mit transgenen Tier- und Zellkulturmodellen beigetragen, die experimentell mit Prion-Erregern infiziert wurden. Dabei sind nur sehr wenige Zelllinien für eine dauerhafte Infektion mit Prionen geeignet. N2a-Zellen sind immortalisierte neuronale Zellen der Maus, die mit Hirnhomogenat aus Scrapie (Sc)-infizierten Mäusen infizierbar sind und Proteinase K (PK)-resistentes und infektiöses PrP^{Sc} replizieren können (Butler *et al.* 1988; Caughey *et al.* 1989).

Anhand der unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften in der Löslichkeit und PK-Resistenz (siehe Punkt 1.2.2) kann PrP^{Sc} mit Hilfe eines Western Blots (vgl. Abb. 10) leicht nachgewiesen werden. Für die Erstellung eines Löslichkeitsprofils werden die Zellen nach der Zellernte in Detergenz lysiert und durch Zentrifugation in eine lösliche (S) und unlösliche (P) Fraktion aufgetrennt. Für die Analyse der PK-Resistenz werden die Zelllysate vor der Zentrifugation mit PK inkubiert. Wie auf dem Western Blot in Abbildung 10 erkennbar ist, befindet sich PrP^{C} ausschließlich in der löslichen (S) Fraktion und ist vollständig PK-sensitiv (Abb. 10, N2a, +PK). Im Gegensatz dazu ist PrP^{Sc} in der unlöslichen (P) Fraktion zu finden und besitzt eine hohe Resistenz gegen eine PK-Behandlung (Abb. 10, ScN2a, +PK).

Durch einen Verdau mit PK wird lediglich ein N-terminales Peptid von etwa 68 Aminosäuren von PrP^{Sc} proteolytisch abgespalten (Oesch *et al.* 1985). Dementsprechend wird das ursprüngliche Molekulargewicht von 33-35 kDa auf 27-30 kDa reduziert, wobei die Variation der Größe auf eine heterogene Glykosilierung zurückzuführen ist. Der Unterschied der beiden Isoformen in der PK-Resistenz wird bei der Diagnose von Prion-Erkrankungen genutzt.

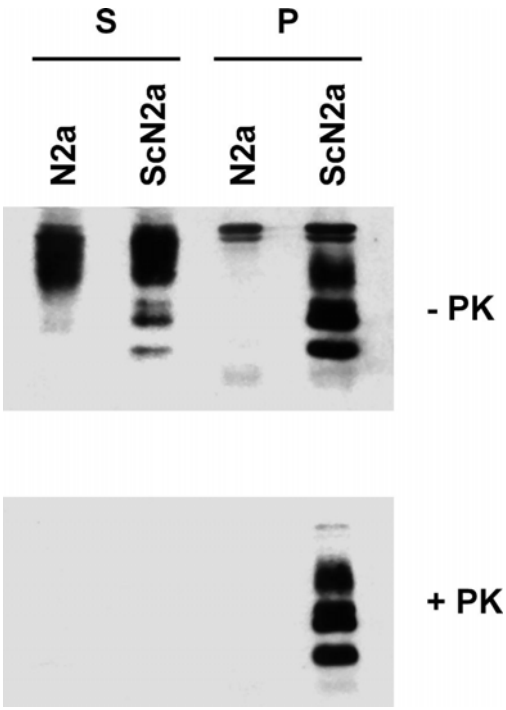

Abbildung 10: Western Blot Analyse der Löslichkeit und Proteinase K (PK)-Resistenz von PrP^C und PrP^{Sc}. N2a- und Scrapie-infizierte N2a-Zellen (ScN2a) wurden in 0.5% Triton-DOC lysiert. Durch Zentrifugation wurde die lösliche (S) von der unlöslichen (P) Fraktion getrennt. Ein Teil der Lysate wurde zuvor mit PK versetzt (+PK). PrP^C ist im Gegensatz zu PrP^{Sc} ausschließlich in der Detergenz-löslichen (S) Fraktion zu finden. Während PrP^C vollständig mit PK abgebaut wird, verbleibt PrP^{Sc} resistent gegen einen PK-Verdau. Abbildung aus (Winklhofer und Tatzelt 2000).

Mit Hilfe Prion-infizierter Zellkulturmodelle konnten verschiedene Anti-Prion-Substanzen identifiziert werden: polyanionische Komponenten (Caughey und Raymond 1993), Kongo-Rot (Caughey und Raymond 1993), chemische Chaperone (Tatzelt *et al.* 1996), Porphyrine (Caughey *et al.* 1998), Derivate von Phenothiazin, wie das Malariamittel Quinacrin (Korth *et al.* 2001), kationische Lipopolyamine (Winklhofer und Tatzelt 2000) und Suramin (siehe Abb. 11) (Gilch *et al*. 2001; Kiachopoulos *et al*. 2004). Diese Substanzen beeinflussen zwar eine Propagierung von PrP^{Sc} in Zellen, erzielen jedoch keinen langfristigen Effekt *in vivo*. Infizierte Tiere zeigen lediglich eine Verlängerung der Inkubationszeit, meist bei gleichzeitiger Verabreichung des Prion-Inokulums (Ladogana *et al.* 1992; Ingrosso *et al.* 1995; Tagliavini *et al.* 1997; Priola *et al.* 2000; Gilch *et al.* 2001). Dabei wirken die meisten Substanzen nur nach einer peripheren Infektion der Tiere. Eine Ausnahme stellt Pentosanpolysulfat dar, das auch nach intrazerebraler Infektion von Mäusen den klinischen Krankheitsausbruch verzögert (Doh-ura *et al.* 2004).

Es gibt unterschiedliche Strategien, um die Konversion von PrP^{C} in PrP^{Sc} direkt oder indirekt zu beeinflussen. Im Folgenden werden anhand ausgewählter Beispiele verschiedene Mechanismen der Intervention vorgestellt.

Eine der möglichen Strategien ist eine Stabilisierung der PrP^{C}-Konformation, um eine Umwandlung in PrP^{Sc} zu erschweren. Es gibt verschiedene Substanzen, die eine native Proteinkonformation stabilisieren können (Gekko und Timasheff 1981; Gekko und Timasheff 1981; Schein 1990). Diese werden als chemische Chaperone bezeichnet. Tatsächlich wurde in Scrapie-infizierten (ScN2a) Zellen gezeigt, dass Glycerol und Dimethylsulfoxid (DMSO) die Propagierung von PrP^{Sc} effektiv hemmen (Tatzelt *et al.* 1996). Allerdings konnte auf diese Weise das bereits in ScN2a-Zellen bestehende PrP^{Sc} nicht eliminiert werden, weshalb chemische Chaperone als therapeutische Kandidaten unbefriedigend sind.

Anders dagegen verhält es sich bei kationischen Lipopolyaminen. Diese Membran-assoziierte Klasse der Anti-Prion-Substanzen verhindert die Bildung von PrP^{Sc} in ScN2a-Zellen, bewirkt aber auch einen Abbau bereits vorhandener PrP^{Sc}-Aggregate (Winklhofer und Tatzelt 2000). Der exakte Mechanismus ist noch nicht erforscht, es wird jedoch angenommen, dass die Lipopolyamine direkt mit den PrP^{Sc}-Aggregaten interagieren und einen Abbau dieser induzieren. Ähnliche Ergebnisse wurden zuvor mit verzweigten Polyaminen erzielt (Supattapone *et al.* 1999).

Eine andere Anti-Prion-Strategie besteht darin, in die Biogenese von PrP^{C} einzugreifen. Es wird angenommen, dass die Zelloberfläche ein Kompartiment für die Umwandlung von PrP^{C} in PrP^{Sc} darstellt (Caughey und Raymond 1991). Außerdem ist PrP^{C} für eine Propagierung von PrP^{Sc} notwendig (Büeler *et al.* 1993). Wenn PrP^{C} also nicht mehr an der Plasmamembran lokalisiert ist, könnte einer Propagierung von PrP^{Sc} vorgebeugt werden. In diesem Zusammenhang wird die Substanz Suramin vorgestellt, die als Grundlage für eine mechanistische Studie in der vorliegenden Arbeit diente (siehe Punkt 4.2). Suramin ist ein Hexasulfon-Naphthalin-Harnstoff-Derivat (Abb. 11), das ursprünglich zur Behandlung der Afrikanischen Schlafkrankheit (Trypanosomiasis) eingesetzt wurde (Dressel und Oesper 1961).

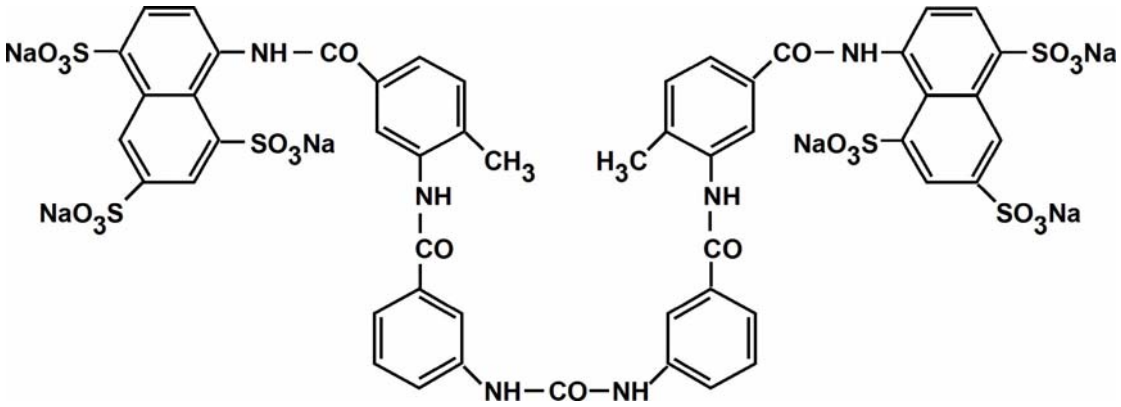

Abbildung 11: Chemische Struktur der Anti-Prion-Substanz Suramin. Suramin ist ein Hexasulfon-Naphthalin-Harnstoff-Derivat (C_{51} H_{34} N_6 Na_6 O_{23} S_6).

Suramin interferiert mit der Propagierung von PrP^{Sc} in ScN2a-Zellen und verzögert den Ausbruch der Prion-Erkrankung in Scrapie-infizierten Mäusen, wobei es eine Missfaltung von PrP^{C} induziert (Gilch *et al.* 2001). Die Suramin-induzierte Missfaltung bewirkt eine rasche Entfernung von der Zelloberfläche durch Internalisierung und vollständige lysosomale Degradierung von PrP^{C} (Kiachopoulos *et al.* 2004).

Eine weitere Anti-Prion-Strategie besteht in der Abschirmung von PrP^{C} durch die Bindung mit monoklonalen Anti-PrP^{C}-Antikörpern, die spezifisch ein Epitop von PrP^{C} erkennen und keine oder lediglich geringe Affinität für PrP^{Sc} besitzen. An der Zelloberfläche gebundenes PrP^{C} ist folglich nicht mehr zugänglich für PrP^{Sc}, welches daraufhin in Zellkultur nicht weiter propagiert wird (Enari *et al.* 2001; Peretz *et al.* 2001; Gilch *et al.* 2003). Studien mit peripher infizierten Mäusen zeigen, dass monoklonale Antikörper Prion-Replikation auch *in vivo* inhibieren, was eine signifikante Verlängerung der Inkubationszeit zur Folge hat (White *et al.* 2003). Da Antikörper jedoch wie die meisten oben genannten Wirkstoffe die Blut-Hirn-Schranke nicht effizient passieren können, zeigen diese keinen protektiven Effekt bei intrazerebral infizierten Tieren. Außerdem können monoklonale Antikörper als Anti-Prion-Substanzen nur beschränkt und mit größter Vorsicht genutzt werden, da direkte Injektion hoch dosierter Anti-PrP^{C}-Antikörper in das Gehirn eine massive Apoptose primärer Neuronen auslöst (Solforosi *et al.* 2004) (siehe Punkt 1.2.6).

Viele der bekannten Wirkstoffe, wie Pentosanpolysulfat oder Quinacrin, wurden bereits an einer geringen Anzahl von CJK-Patienten getestet, besitzen jedoch starke

Nebenwirkungen und keinen nachweisbar therapeutischen Effekt. Dennoch kann in bestimmten Fällen eine Linderung der Symptome erzielt werden. Die Entwicklung geeigneter therapeutischer Produkte ist dadurch erschwert, dass nach Auftreten der klinischen Symptome der Krankheitsverlauf – anders als beispielsweise bei der Alzheimer Krankheit – äußerst progressiv ist. Außerdem kann eine eindeutige Diagnose beim Menschen erst *post mortem* durch eine histologische Untersuchung des Gehirns erfolgen. Dies hängt damit zusammen, dass Prionen keine körpereigene Entzündungsreaktion oder Immunantwort hervorrufen, da diese dieselbe vom Wirts-Gen (PRNP) codierende Aminosäuresequenz besitzen (Basler *et al.* 1986). Ein Nachweis der Erreger im Blut ist aufgrund der dort befindlichen geringen Prionen-Konzentration mit heutigen Bluttests nicht möglich.

1.5 Zielsetzung

Die vorliegende Doktorarbeit umfasst zwei verschiedene Themenbereiche: zum einen die Untersuchung humanpathogener PrP-Mutanten und zum anderen die Analyse des Wirkungsmechanismus einer Anti-Prion-Substanz. Beide Studien wurden in geeigneten Zellkulturmodellen durchgeführt.

Im ersten Teil der Arbeit sollte die Faltung und Maturierung zweier pathogener Mutanten (T183A und F198S), die beim Menschen Prion-Erkrankungen auslösen können, in murinen (N2a) Neuroblastomzellen untersucht werden. Diese Studie sollte in erster Linie eine mechanistische Erklärung für die bei Prion-Erkrankungen vorhandene Missfaltung von PrP^C geben. Da die Substitution T183A die erste Akzeptorstelle für die N-Glykosilierung zerstört und diese Mutante somit nur eine intakte Glykosilierungsstelle besitzt, sollte in einer vergleichenden Analyse mit anderen monoglykosilierten Mutanten zunächst geklärt werden, ob eine fehlende Glykosilierungsstelle einen Einfluss auf die Faltung und Maturierung des Proteins besitzt. Eine mechanistische Studie mit weiteren Mutanten sollte Aufschluss darüber geben, ob T183A und F198S möglicherweise zu einer Destabilisierung des hydrophoben Cores der globulären C-terminalen Domäne von PrP führen können. Für eine eingehende Analyse der Biogenese aller Mutanten sollte die Glykosilierung und die GPI-Verankerung, sowie der weitere Proteintransport an die Zelloberfläche untersucht werden. Schließlich sollte die Proteinfaltung analysiert werden. Es sollte auch geprüft werden, ob eine ER-assoziierte Degradierung möglicher missgefalteter Mutanten stattfindet.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte der Wirkungsmechanismus der Anti-Prion-Substanz Suramin im Zellkulturmodell untersucht werden. In einer vorangegangenen Analyse wurde gezeigt, dass Suramin eine Missfaltung von PrP^C induziert und mit der Propagierung von PrP^{Sc} in Scrapie-infizierten (ScN2a) N2a-Zellen interferiert, sowie den Ausbruch der Prion-Erkrankung in Scrapie-infizierten Mäusen verzögert (Gilch *et al.* 2001). Die vorliegende Studie sollte zum besseren Verständnis der Anti-Prion-Aktivität von Suramin beitragen und somit Ansätze für die Entwicklung von effizienteren Anti-Prion-Strategien liefern. Hierbei sollte der Effekt von Suramin auf die Biogenese von PrP^C in N2a-Zellen untersucht werden. Weiterhin sollten Domänen des Prion-Proteins identifiziert werden, welche an einer Suramin-induzierten

Missfaltung beteiligt sind, sowie Zellkompartimente, in welchen eine Suramin-induzierte Missfaltung stattfindet. Außerdem sollte geklärt werden, ob missgefaltetes PrP^{C} – anders als infektiöses PrP^{Sc} – in neuronalen Zellen eliminiert werden kann.

2. Material

2.1 Biologisches Material

2.1.1 Zelllinien

SH-SY5Y	Typ: humane Neuroblastomzellen DSMZ-Nr. ACC 209
N2a	Typ: murine Neuroblastomzellen ATCC-Nr. CCL 131
ScN2a	Typ: N2a-Zellen, die mit Prionen infiziert sind, welche aus Gehirnextrakten Scrapie (Sc)-infizierter Mäuse isoliert wurden.

2.1.2 Vektoren und Plasmide

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

2.1.3 Bakterienstämme

DH5α	Genotyp: *sup*E44, Δ*lac*169, (Φ80*lac*ZΔM15), *hsd*R17, *rec*A1, *end*A1, *gyr*A96, *thi*-1, *rel*A1 Herkunft: Hanahan, 1983

2.1.4 Antikörper

3F4	Signet Laboratories, Dedham, MA, USA Verdünnung: 1:5000
A7	Hergestellt durch Immunisierung von Kaninchen mit gereinigtem rekombinaten PrP (Winklhofer *et al.* 2003) Verdünnung: 1: 2500
Anti-Kaninchen Antikörper (HRP-gekoppelt) aus Esel	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Anti-Maus Antikörper (HRP-gekoppelt) aus Schaf	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Anti-Maus Antikörper Cy3	Dianova, Hamburg
Streptavidin (HRP-gekoppelt)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

2.1.5 Enzyme und Proteine

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

2.1.6 Standardgrößenmarker für Proteine und Nukleinsäuren

Referenzproteine für SDS-Page:

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

DNA-Längenstandards:

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

2.1.7 Synthetische Oligonukleotide

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

Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen:

A/AGCTT *Hind III*
G/GCGCC *KasI*
C/TCGAG *Xho I*
G/GTNACC *BstE II*

Primer:	5´-Ende	3´-Ende
HindIII-5':	AAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACT	
KasI-3':	CTCGAGGGCGCCATCCCCAAACAGTGGCTTCTT	
XhoI-3':	CCCTCTAGACTCGAGGGCGCCATCCCCAAACAGTGG	
BstEII-5':	TATCACCATCAAGCAGCACACGGTCACCACCACCAC	
Δgpi-5':	AAGGAGTCCCAGGCCTATTACTGAGGGAGGCCTTCCTGCTTG	
Δgpi-3':	CAAGCAGGAAGGCCTCCCTCAGTAATAGGCCTGGGACTCCTT	
M204S-5':	TTCACCGAGACCGATGTGAAGAGTATGGAGCGCGTGGTGGA	
M204S-3':	CTCCACCACGCGCTCCATACTCTTCACATCGGTCTCGGTGAA	
ΔN-5':	GGCCTCTGCAAAAAGCGGCCACAAGGAGGGGGTACCCATAA	
ΔN-3':	ATTATGGGTACCCCCTCCTTGTGGCCGCTTTTTGCAGAGGCC	

Δ27-156-5':	GGCCTCTGCAAAAAGCGGCCACCTAACCAAGTGTACTACAG
Δ27-156-3':	CCTGTAGTACACTTGGTTAGGTGGCCGCTTTTTGCAGAGGCC
Δ2-22-5':	GATCTAGAATCAGTCATCATGAAAAAGCGGCCAAAGCCTGG
Δ2-22-3':	TCCAGGCTTTGGCCGCTTTTTCATGATGACTGATTCTAGATCT
T182A-5':	CACGACTGCGTCAATATCGCCATCAAGCAGCACACGGTC
T182A-3':	GACCGTGTGCTGCTTGATGGCGATATTGACGCAGTCGTG
N180Q-5':	TTCGTGCACGACTGCGTCCAAATCACCATCAAGCAGCACA
N180Q-3':	GTGCTGCTTGATGGTGATTTGGACGCAGTCGTGCACGAA
F197S-5':	ACCACCAAGGGGGAGAACTCCACCGAGACCGATGTGAAG
F197S-3':	ACATCGGTCTCGGTGGAGTTCTCCCCCTTGGTGGTGGT
V160S-5':	TACCGCTACCCTAACCAATCGTACTACAGGCCAGTG
V160S-3':	CACTGGCCTGTAGTACGATTGGTTAGGGTAGCGGTA
V160W-5':	TACCGCTACCCTAACCAATGGTACTACAGGCCAGTGGAT
V160W-3':	ATCCACTGGCCTGTAGTACCATTGGTTAGGGTAGCGGTA

2.2 Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt
Agarose	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Boehringer Mannheim, Mannheim
Amplify	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
APS	USB, Cleveland, OH, USA
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Bafilomycin A1	Calbiochem, Darmstadt
Biotin LC-sulfo-NHS-(+)	Molecular Bio Sciences, Boulder, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Complete Protease-Inhibitor	Boehringer Mannheim, Mannheim
Desoxycholat	Sigma, Deisenhofen
Desoxymannojirimycin	Calbiochem, Darmstadt
Desoxynucleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Sigma, Deisenhofen

Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
EDTA	USB, Cleveland, OH, USA
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
FCS	Invitrogen, Karlsruhe
Ficoll 400	Merck, Darmstadt
Filipin III	Sigma, Deisenhofen
Formamid	Merck, Darmstadt
Geniticin	Sigma, Deisenhofen
Glycerol	USB, Cleveland, OH, USA
Glycin	USB, Cleveland, OH, USA
Harnstoff	Sigma, Deisenhofen
Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Immersionsöl	Merck, Darmstadt
Instant-Magermilchpulver	Uelzena, Uelzen
Kaliumacetat	Sigma, Deisenhofen
Kaliumchlorid	USB, Cleveland, OH, USA
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kupfersulfat	Sigma, Deisenhofen
Lachsspermien-DNA	Roche Diagnostics, Mannheim
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	USB, Cleveland, OH, USA
Manganchlorid	Sigma, Deisenhofen
Meglumin-Diatrizoat	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt
MG 132	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natrium-Diatrizoat	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck, Darmstadt
Oligolabeling-Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
PBS Dulbecco’s +/+ Mg/Ca	Invitrogen, Karlsruhe

PBS Dulbecco's -/- Mg/Ca	Invitrogen, Karlsruhe
Pefabloc SC	Roche Diagnostics, Mannheim
Pepstatin	Roche Diagnostics, Mannheim
Pepton	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen
Polyacrylamid/Bisacrylamid (29:1) 40%	Roth, Karlsruhe
Poly-D-Lysin	Sigma, Deisenhofen
ProMix ^{35}S-Methionin/Cystein	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Protein A-Trisacryl-Matrix	Pierce, KMF Laborchemie, St. Augustin
Rubidiumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Sarkosyl	USB, Cleveland, OH, USA
SDS	Roth, Karlsruhe
Sojabohnen Trypsin-Inhibitor	Invitrogen, Karlsruhe
Suramin	Sigma, Deisenhofen
TEMED	USB, Cleveland, OH, USA
Transfektionsreagenz:	
Lipofectamine Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Plus Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Tris	USB, Cleveland, OH, USA
Triton X-100	USB, Cleveland, OH, USA
Trypan Blau	Invitrogen, Karlsruhe
Trypton	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Tween-20	USB, Cleveland, OH, USA
Penicillin/Streptomycin/Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe

2.3 Lösungen und Puffer

APS-Lösung	10% Ammoniumperoxodisulfat in PBS-/-
Bafilomycin A1	100 µM in DMSO

Biotin LC-sulfo-NHS-(+)	50 mg/ml in DMSO
Blocking Milk für Western Blot	5% Magermilchpulver in 1x PBST
BSA 100x	New England Biolabs, Schwalbach
Coomassie-Entfärbelösung	40% Methanol
	7% Essigsäure
Denhardt 100x	2% Ficoll 400
	2% PVP
	2% BSA
DEPC-Wasser	1ml DEPC in 1l Wasser
	O/N 37°C, dann autoklavieren
Desoxymannojirimycin	5 mg/ml in PBS -/-
Detergenzpuffer, nichtionisch	0,1% Triton X-100 in PBS -/-
Detergenzpuffer, ionisch	0,5% Triton X-100
	0,5% DOC
	in PBS -/-
DNA-Probenpuffer (6x)	0.25% Bromphenolblau
	30% Glycerol
Elutionspuffer 1	8M Harnstoff
	100mM Natriumacetat, pH4.6
Elutionspuffer 2	8M Harnstoff
	200mM Imidazol
	100mM Natriumphosphat, pH7
Filipin III	5 µg/µl in DMSO
IP-Puffer	0,5% Triton X-100
	0.5% DOC
	Protease-Inhibitor-Tablette in PBS -/-
Kupfersulfat	500 mM in autoklaviertem Wasser
Laemmli-Probenpuffer (2x)	120 mM Tris pH 6.8
	2% SDS
	20% Glycerol
	0.5% Bromphenolblau
	2% Mercaptoethanol
Laemmli-Probernpuffer (4x)	240 mM Tris pH 6.8

	4% SDS
	40% Glycerol
	1% Bromphenolblau
	4% Mercaptoethanol
Laufpuffer für SDS-Page (10x)	250 mM Tris, pH 6,8
	1,9 M Glycin
	1% SDS
Leupeptin	10 µg in autoklaviertem Wasser
MG132	10 mM MG132 in DMSO
PBS (10x)	80 g NaCl
	2 g KCl
	14,4 g Na_2HPO_4 x 2 H_2O
	2,4 g KH_2PO_4
PBST (10x)	1% Tween 20 in 1 x PBS
Pefabloc SC	200 mM in PBS -/-
Pepstatin	50 mM in DMSO
Pfu-Polymerase-Puffer (10x)	Promega, Mannheim
Poly-D-Lysin	0,1 mg/ml in PBS -/-
Ponceau S – Färbelösung	0,2 g Ponceau S
	5 ml Essigsäure
	H_2O ad 100 ml
Sammelgelpuffer für SDS-Page	0,5M Tris, pH 6,8
(*Upper Tris*)	0,4% SDS
	pH 6,8
Shrimp-Alkaline-Phosphatase-Puffer	Roche Diagnostics, Mannheim
Suramin	50 µg in PBS -/-
T4-DNA-Ligase-Puffer (10x)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris-Base
	57,1 ml Eisessig
	50 mM Na_2 EDTA x 2H_2O, pH 8,0
	H_2O ad 1000 ml
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 7,5
	1 mM EDTA, pH 8,0

TELT	50 mM Tris/HCl
	62,5 mM EDTA
	0,4% Triton X-100
	2,5 M LiCl
TFB1-Puffer	30 mM K-Acetat
	100 mM RbCl
	10 mM $CaCl_2$
	50 mM $MnCl_2$
	15% Glycerol
	pH 5,8
TFB2-Puffer	10 mM MOPS
	75 mM $CaCl_2$
	10 mM RbCl
	15% Glycerol
	pH 6,5
Transferpuffer für Western Blot	20 mM Tris-Base
	150 mM Glycin
	0,01% SDS
	20% Methanol
Trenngelpuffer für SDS-Page	1,5M Tris, pH 8,8
(*Lower Tris*)	0,4% SDS
	pH 8,8

2.4 Medien

Dulbecco's Modified	Invitrogen, Karlsruhe
Eagle's Medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
Minimal Essential Medium (MEM)	Invitrogen, Karlsruhe
Minimal Essential Medium	Invitrogen, Karlsruhe
ohne L-Methionin	
OPTIMEM 1	Invitrogen, Karlsruhe
LB-Medium	1% NaCl

	1% Bacto Trypton 0,5% Hefeextrakt Ampicillin wird nach dem Autoklavieren (20 min, 120 °C) in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben
LB-Agar	LB-Medium + 1,5% Bacto Agar Ampicillin wird nach dem Autoklavieren (20 min 120 °C) in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben.

2.5 Kits

ECL RPN 2106	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
QIAprep Spin Plasmidextraktionskit Mini/Maxi	Qiagen, Hilden
QIAquick Gelextraktionskit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR-Reinigungskit	Qiagen, Hilden

2.6 Geräte

Agarosegel-Elektrophoresekammern	Zentralwerkstatt, Max-Planck-Institut, Martinsried
Autoklav GE2606	Getinge Van Dilk, Straelen
Brutschränke	Heraeus, Hanau
Filmentwickler X-Omat	Kodak, Stuttgart
Gefrierschränke:	
Forma Scientific Bio Freezer (-80°C)	ThermoQuest, Egelsbach
AEG Öko-Arctis (-20°C)	AEG, Frankfurt am Main
Gelbetrachter	MWG Biotech, Ebersberg

Geltrockner SGD300	Savant, Holbrook, NY, USA
Kühlschrank AEG Öko Santo	AEG, Frankfurt am Main
Kultur-Schüttler Forma Scientific 4518	ThermoQuest, Egelsbach
Mikroskope:	
Axiovert 25	Carl Zeiss, Göttingen
Axiovert 200M	Carl Zeiss, Göttingen
mit Software Axiovision	
Leica TCSNT/DMIRB	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Kühlschrank AEG Öko Santo	AEG, Frankfurt am Main
Kultur-Schüttler Forma Scientific 4518	ThermoQuest, Egelsbach
Mikrowelle M633	Samsung, Schwalbach
PCR-Geräte:	
T3 Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen
GeneAmp PCR-System 2400	Perkin Elmer, Shelton, CT, USA
pH-Meter	Fischer Scientific, Nidderau
Phosphoimager FLA-2000	Fuji Photo Film, Düsseldorf
mit Software AIDA	
Pipetten Gilson	Abimed, Langenfeld
P2, P10, P20, P200, P1000	
Pipettierhilfe pipet-aid Drummond	Scientific, Broomall, PA, USA
Polyacrylamidgel-Elektrophorese-kammer Hoefer SE600	Pharmacia Biotech, Freiburg
mit Power Supply EPS	
Reinstwasseranlage Milli-Q_{PLUS}	Millipore, Eschborn
Schwenktisch GFL 3017	Merck eurolab, Ismaning
Spektralphotometer DU-640	Beckmann, Unterschleissheim
Thermoblöcke	Zentralwerkstatt, Max-Planck-Institut, Martinsried
Transferkammer Hoefer TE-Serie	Pharmacia Biotech, Freiburg
mit Power Supply EPS 2A200	
Überkopfmischer Heidolph REAX 2	Merck eurolab, Ismaning
Ultraschallbad	Roth, Karlsruhe
UV-Tisch Foto/UV 21	Fotodyne, Hartland, WI, USA
Vortex	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz

Waagen:	
Laborwaage Mettler Toledo PB602	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Analysenwaage Mettler Toledo AG285	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Wasserbad MT	Roth, Karlsruhe
Zählkammer, Neubauer	Merck eurolab, Ismaning
Zellkulturschränke	ThermoQuest, Egelsbach
Zentrifugen:	
Kühlzentrifuge GS-6R mit Rotor GH3.8	Beckmann, Unterschleissheim
Kühlzentrifuge J2-21M mit Rotor JA-14	Beckmann, Unterschleissheim
Tischzentrifuge Biofuge A	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge TLX-120 mit Rotor TLA-120.2	Beckman, Unterschleissheim

2.7 Sonstige Materialien

Deckgläschen	neoLab, Heidelberg
Einmalkanülen Neolus 26G 0.45mm	Terumo, Tokyo. Japan
Einmalpipetten, steril	Nunc, Wiesbaden
Einmal-Pasteurpipetten	neoLab, Heidelberg
Einmalspritzen Omnifix-F1ml	Braun, Melsungen
Einmalspritzen 50 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Expositionskassetten	Fischer Scientific, Nidderau
Faltenfilter ∅ 90 mm	Schleicher & Schüll, Dassel
Gelladespitzen Sörensen	Roth, Karlsruhe
Objektträger 76 x 26 mm	neoLab, Heidelberg
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen für Gilson P-Serie	Continental Lab Products, San Diego, CA, USA
Polypropylen-Zentrifugenröhren	Falcon, Heidelberg

Polysterol-Röhrchen, steril, 18 x 95 mm	Greiner, Frickenhausen
Protran Nitrocellulose Nucleinsäure- und Proteintransfer	Schleicher & Schüll, Dassel
Röntgenfilme Kodak Biomax MR	Sigma, Deisenhofen
Reaktionsgefäße:	
Safe-Lock Micro Test Tubes 1,5ml und 2ml	Eppendorf, Hamburg
Schraubdeckel – Reaktionsgefäße 1,5ml und 2ml	Sarstedt, Nürnbrecht
PCR-Reaktionsgefäße 0,2ml	Abgene, Hamburg
Skalpellklinge	Bayha, Tuttlingen
Sterilfilter Millex®-HA 0,45µm	Millipore, Eschborn
Sterilfilter Millex®-GS 0,22µm	Millipore, Eschborn
Whatman Chromatographie-Papier 3MM Chr	Schleicher & Schüll, Dassel
Zellkulturflaschen	BD Biosciences Falcon, Heidelberg
Zellkulturschalen ∅3,5cm	BD Biosciences Falcon, Heidelberg
Zellschaber	Corning Inc., Corning, NY, USA

3. Methoden

3.1 Rekombinante Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction,* PCR) (Saiki *et al.* 1988) dient der selektiven Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels thermostabiler DNA-Polymerase und spezifischer Oligonukleotide (Primer). Die in vorliegender Arbeit durchgeführte rekombinante PCR wird eingesetzt, um verschiedene Genabschnitte ohne Einfügen von Restriktionsschnittstellen miteinander zu verknüpfen (Higuchi 1990). Dabei werden in zwei getrennten Ansätzen Genfragmente mit Primern mit überlappender Sequenzhomologie amplifiziert (Abb. 12 A), welche dann in einer zweiten Reaktion als Matrize eingesetzt werden. Die hybridisierenden Sequenzhomologien dienen als interne Primer. Durch entsprechende Wahl der internen Primer können Mutationen, wie z. B. Punktmutationen, Insertionen oder Deletionen, in ein Gen eingefügt werden. Die externen Primer enthalten jeweils eine Schnittstelle für eine Restriktionsendonuklease und dienen der Amplifikation des Produktes (Abb. 12 B).

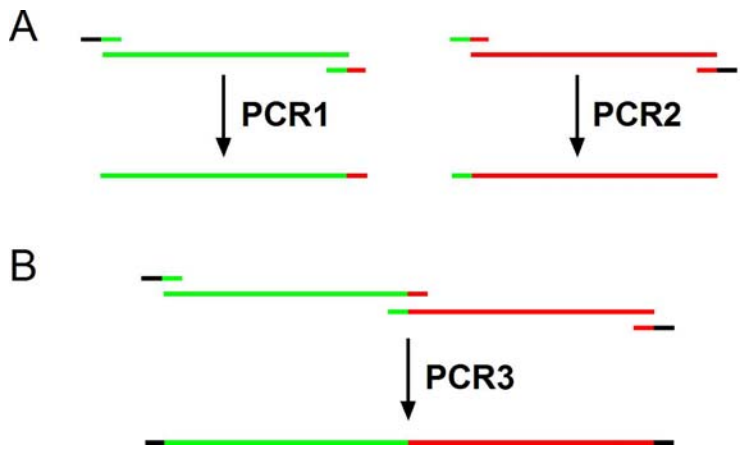

Abbildung 12: Verknüpfung zweier Genfragmente mittels rekombinanter PCR. (A) Die beiden zu verknüpfenden Fragmente werden separat per PCR amplifiziert (PCR1 und PCR2). Dabei enthalten die internen Primer am 5‘-Ende jeweils Sequenzen des anderen Fragments. **(B)** In der folgenden PCR-Reaktion (PCR3) lagern sich die überlappenden Sequenzen aneinander und fungieren somit als interne Primer. Fragmente mit der vollständigen Länge werden durch die externen Primer amplifiziert. Grün und rot: Fragmente 1 bzw. 2; schwarz: nicht-homologe Sequenzen mit Restriktionsschnittstellen.

3.1.1 Bedingungen für die PCR

Die PCR-Reaktionen wurden mit 15 pmol Primern, je 0,25 mM dNTP´s (dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 50 ng Matritzen-DNA, 2,5 U Pfu-DNA-Polymerase und dem vom Hersteller gelieferten Reaktionspuffer angesetzt.

Folgende Bedingungen gelten für alle PCR-Reaktionen:

Denaturierung	3 Minuten bei 96°C
Denaturierung	45 Sekunden bei 96°C
Primer-Anlagerung	45 Sekunden bei 50°C
Elongation	2 Minuten bei 72°C

Die zweite Denaturierung, die Primer-Anlagerung, sowie die Elongation wurden in 28 Zyklen wiederholt. Abschließend wurde die Reaktion 10 Minuten bei 72°C inkubiert und bis zur weiteren Verarbeitung auf 4°C gekühlt.

3.1.2 Sequenzierungen

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

3.1.3 Klonierung von PrP-Mutanten

Alle PrP-Fragmente wurden in den Vektor pcDNA3.1/ZEO(+), der unter der Kontrolle des CMV-Promotors steht, ligiert, um eine Expression in den verschiedenen Zelllinien zu ermöglichen. Das Plasmid pcDNA3.1-3F4, in dem PRND so modifiziert ist, dass es PrP mit den Mutationen L108M und V111M exprimiert diente als Matrize. Beide Mutationen entsprechen den Aminosäuren des menschlichen PrP und erlauben eine Detektion des Proteins mit dem monoklonalen Antikörper 3F4 (Serban *et al.* 1990). Die Klonierung der PrP-Mutanten wurde, soweit nicht anders vermerkt, nach folgendem Schema durchgeführt:

Ausgehend vom Plasmid pcDNA3.1-3F4 wurde das N-terminale Fragment mit den Primern *HindIII*-5' und X-3' und das C-terminale Fragment mit den Primern *XhoI*-3' (bzw. *KasI*-3´) und X-5' amplifiziert. Der Buchstabe X steht für die jeweilige Konstruktbezeichnung. Die Amplifikation des Produkts erfolgte dann mit den externen Primern *HindIII*-5' und *XhoI*-3' (bzw. *KasI*-3´). Über die Schnittstellen *HindIII* und *XhoI* (bzw. *KasI*-3´) wurde das Produkt in das Plasmid pcDNA3.1 ligiert. Die folgenden Aminosäurenangaben beziehen sich ausschließlich auf die Sequenz von Maus-PrP.

3.1.3.1 PrP mit deletiertem N-Terminus: PrP ΔN

Hergestellt wurde das Konstrukt unter Verwendung der Primerpaare *HindIII*-5' / ΔN-3' und *Kas*I-3' / ΔN-5'.

Es wurden die Aminosäuren 27 bis einschließlich 89 deletiert. Die Deletion umfasst den gesamten unstrukturierten Bereich von PrP.

3.1.3.2 PrP mit verkürztem N-Terminus und ohne GPI-Anker: PrP Δ27-156 ΔGPI

Hergestellt wurde zunächst das Konstrukt PrP ΔGPI unter Verwendung der Primerpaare *HindIII*-5' / Δgpi-3' und *KasI*-3' / Δgpi-5'. Dieses Konstrukt kodiert PrP ohne die GPI-Anker-Erkennungssequenz bis zur Aminosäure 229.

Davon ausgehend wurde das N-terminale Fragment mit den Primern *HindIII*-5' und Δ27-156-3' und das C-terminale Fragment mit den Primern *KasI*-3' und Δ27-156-5' amplifiziert. Die Fragmente wurden verknüpft und über die Schnittstellen *HindIII* und *KasI* in das Plasmid ΔGPI ligiert.

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

3.1.3.3 PrP mit heterologem CD4-Anker

Ausgehend vom Plasmid pcDNA3.1-CD4-flag, welches einen Flag-Tag enthält, wurde ein den CD4-Anker enthaltendes Fragment mittels der Primer *BstEII*-5' und

XhoI-3' amplifiziert. Über die Schnittstellen *BstEII* und *XhoI* wurde das Fragment in das Plasmid pcDNA3.1 ligiert.
An Stelle des GPI-Ankers enthält dieses Konstrukt den C-terminalen Membrananker des T-Zell-Oberflächenproteins CD4 der Maus.

3.1.3.4 PrP mit pathogenen Punktmutationen

PrP T182A

Hergestellt wurde das Konstrukt unter Verwendung der Primerpaare *HindIII*-5' / T182A-3'und *XhoI*-3' / T182A-5'.
Die Aminosäure Threonin an der Stelle 182 wurde durch die Aminosäure Alanin ersetzt. Dieses Konstrukt enthält eine pathogene Mutation in der Erkennungssequenz der ersten Gykosilierungsstelle von PrP. Somit ist dieses Plasmid monoglykosiliert.

PrP F197S

Hergestellt wurde das Konstrukt unter Verwendung der Primerpaare *HindIII*-5' / F197S-3'und *XhoI*-3' / F197S-5'.
Die Aminosäure Phenylalanin an der Stelle 197 wurde durch die Aminosäure Serin ersetzt.

3.1.3.5 PrP mit Punktmutationen

PrP M204S

Hergestellt wurde das Konstrukt unter Verwendung der Primerpaare *HindIII*-5' / M204S-3' und *KasI*-3' / M204S-5'.
Die unpolare Aminosäure Methionin an Stelle 204 wurde durch die ungeladene polare Aminosäure Serin ersetzt. Dadurch wird die Helix 1 von PrP destabilisiert (Winklhofer *et al.* 2003).

PrP N180Q

Hergestellt wurde das Konstrukt unter Verwendung der Primerpaare *HindIII*-5' / N180Q-3'und *XhoI*-3' / N180Q-5'.

Die Aminosäure Asparagin an der Stelle 180 wurde durch die Aminosäure Glutamin ersetzt. Dieses Konstrukt enthält eine Mutation in der Erkennungssequenz der ersten Gykosilierungsstelle von PrP. Dieses Plasmid ist somit monoglykosiliert.

PrP V160S

Hergestellt wurde das Konstrukt unter Verwendung der Primerpaare *HindIII*-5' / V160S-3'und *XhoI*-3' / V160S-5'.
Die Aminosäure Valin an der Stelle 160 wurde durch die Aminosäure Serin ersetzt.

PrP V160W

Hergestellt wurde das Konstrukt unter Verwendung der Primerpaare *HindIII*-5' / V160W-3'und *XhoI*-3' / V160W-5'.
Die Aminosäure Valin an der Stelle 160 wurde durch die Aminosäure Tryptophan ersetzt.

3.1.3.6 PrP mit Punktmutation und ohne GPI-Anker: V160W ΔGPI

Analog des Konstrukts PrP V160W wurde das Plasmid V160W ΔGPI hergestellt. Als Matrize diente hier das Plasmid PrP ΔGPI.
Somit hat dieses Plasmid keine GPI-Anker-Erkennungssequenz, beinhaltet jedoch die Punktmutation V160W.

3.1.3.7 PrP mit zytosolischer Lokalisierung: zyto PrP

Hergestellt wurde das Konstrukt unter Verwendung der Primerpaare *HindIII*-5' / Δ2-22-3' und *XhoI*-3' / Δ2-22-5'.
Es wurden die Aminosäuren 2 bis einschließlich 22 deletiert. Die Deletion umfasst den gesamten Bereich der ER-Signalsequenz von PrP. Somit wird dieses Plasmid ausschließlich in das Zytosol gelenkt.

3.2 Bakterienkultur

3.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Um Zellen von *E.Coli* (*Escherichia Coli*) kompetent zu machen, d.h. diese zur Aufnahme von Plasmid-DNA zu befähigen, wird eine Kultur bis zur logarithmischen Phase angezogen und mit divalenten Kationen behandelt. Dieses Verfahren führt zu einer Destabilisierung der Zellwand (Sambrook *et al.* 1989).

Zunächst wurde eine Vorkultur hergestellt: 2 ml *Luria Broth* (LB)-Medium wurden mit einer Bakterienkolonie des *E.Coli* - Stammes DH5α beimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Der Ansatz wurde anschließend in 250 ml LB-Medium gegeben und 2-3 h lang bei 37°C kultiviert bis zu einem OD_{590}-Wert zwischen 0,4 und 0,6. Die Kultur wurde 5 min bei 4°C und 3750 rpm zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 100 ml eiskalten TFB1-Puffer resuspendiert, die Suspension 5 min lang auf Eis inkubiert und anschließend 5 min lang bei 4°C und 3750 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml kaltem TFB2-Puffer resuspendiert, 15-60 min auf Eis inkubiert und anschließend aliquotiert (100µl/Reaktionsgefäß). Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert.

3.2.2 Transformation kompetenter Bakterien

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

Aliquots kompetenter Bakterien (100µl/Reaktionsgefäß) wurden auf Eis aufgetaut und mit 5 µl Ligationsansatz bzw. 1 µg Plasmid-DNA vermischt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Suspension 90 Sekunden bei 42°C inkubiert (Hitzeschock) und anschließend 5 min auf Eis gestellt. Es wurden 400 µl LB-Medium ohne Zusatz von Antibiotika zugegeben. Die Kulturen wurden 1 h bei 37°C geschüttelt und in unterschiedlichen Konzentrationen auf ampicillinhaltigen Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden 16-20 h lang bei 37°C inkubiert.

3.3 DNA-Präparation

Zur Herstellung von Plasmid-DNA wurde der Qiagen-Mini- bzw. Qiagen-Maxi-Kit verwendet. Dabei wurde nach Angaben des Herstellers Qiagen verfahren.

3.4 Zellkultur

3.4.1 Kultivierung von Zellen

Neuroblastomzellen aus drei verschiedenen Zelllinien wurden als adhärenter Einzelzellrasen kultiviert.

Humane Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) wurden in DMEM (*Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium*) unter Zusatz von 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum und 1% Antibiotika-Lösung (Endkonzentration: 1U/ml Penicillin G, 1µg/ml Streptomycin und 2 mM Glutamin) in Zellkulturschalen bzw. -flaschen bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert.

Murine Neuroblastomzellen (N2a) wurden in MEM (*Minimal Essential Medium*) unter Zusatz von 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum und 1% Antibiotika-Lösung (Endkonzentration: 1U/ml Penicillin G, 1µg/ml Streptomycin und 2 mM Glutamin) in Zellkulturschalen bzw. -flaschen bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert.

Mit Prionen infizierte murine Neuroblastomzellen (ScN2a) wurden in MEM (*Minimal Essential Medium*) unter Zusatz von 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum, 1% Antibiotika-Lösung (Endkonzentration: 1U/ml Penicillin G, 1µg/ml Streptomycin und 2 mM Glutamin) sowie zusätzlich 1 mg/ml Geniticin in Zellkulturschalen bzw. Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert.

3.4.2 Passagierung

Die Passagierung der N2a und SH-SY5Y Zellen erfolgte alle fünf Tage, wobei die Zellen im Verhältnis 1:8 und 1:16 gesplittet wurden. ScN2a Zellen dagegen wurden alle sieben Tage im Verhältnis 1:10 und 1:20 gesplittet.

Zur Passagierung wurde das Zellkulturmedium aus einer 25 cm^2-Zellkulturflasche abgesaugt. Die Zellen wurden mit 5 ml PBS-/- (*Phosphate Buffered Saline*) gespült und anschließend mit 0,5 ml Trypsin (0,5 g/l Trypsin) 2-3 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden durch leichtes Abklopfen von ihrer Unterlage gelöst, in 8 ml vorgewärmtem Vollmedium sorgfältig resuspendiert und im gewünschten Verhältnis aufgeteilt. Nach Zusatz von Vollmedium (ad 5 ml Gesamtvolumen) wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

3.4.3 Ausplattieren

Zum Ausplattieren von N2a- und SH-SY5Y Zellen wurde zunächst die vorhandene Zellmenge ermittelt. Hierbei wurde ein Aliquot der mit Trypsin gelösten Zellen (siehe 3.4.2.) entnommen und mit Hilfe einer Neubauer-Kammer gezählt. SH-SY5Y Zellen wurden in einer Dichte von 7 x 10^5 Zellen auf 3,5 cm-Schalen ausplattiert. N2a-Zellen wurden in einer Dichte von 1 x 10^6 Zellen auf 3,5 cm-Schalen bzw. in einer Dichte von 2,6 x 10^6 Zellen auf 6 cm-Schalen ausplattiert.
Für Immunfluoreszenz wurden die Zellen dünner ausplattiert, um vereinzelte Zellen besser zu erkennen. In diesem Fall wurden 7 x 10^5 Zellen (N2a) bzw. 5 x 10^5 Zellen (SH-SY5Y) auf 3,5 cm-Schalen, welche ein Deckgläschen mit einem Durchmesser von 18 mm enthielten, ausplattiert.
ScN2a-Zellen wurden direkt aus einer konfluenten 25 cm^2-Zellkulturflasche im Verhältnis 1:3 auf 6 cm-Schalen ausplattiert.

3.4.4 Transfektion

Die Transfektion der Zellen mit 1 µg Plasmid-DNA erfolgte 24 Stunden nach dem Ausplattieren mit dem Transfektions-Kit Lipofectamine plus nach Angaben des Herstellers Invitrogen. Die Zellen wurden vor der Transfektion zweimal mit MEM gewaschen. Die transfizierten Zellen wurden 3 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert und anschließend mit 1ml Vollmedium versetzt.

3.4.5 Zellernte

Die Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektion geerntet. Hierzu wurden die Zellen zweimal mit PBS-/- gewaschen und anschließend in PBS-/- mit einem Zellschaber abgeschabt. Restliche Zellen wurden mit PBS-/- von den Zellkulturschalen runtergespült. Die Zellen wurden für 20 Sekunden bei 13000 rpm abzentrifugiert und das Zellpellet bis zur Zelllyse (siehe 3.5.1) auf Eis gestellt.

3.5 Proteinpräparation und -analyse

3.5.1 Nachweis der Löslichkeit

Die Zellen wurden in kaltem, ionischem Detergenzpuffer lysiert, 5 Minuten auf Eis inkubiert und 20 Minuten bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Zelllysat wurde aufgetrennt in eine detergenz-lösliche (Überstand) und eine detergenz-unlösliche (Pellet) Fraktion. Überstand und Pellet wurden in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und 10 Minuten bei 100°C inkubiert. Die genomische DNA in der detergenz-unlöslichen Fraktion wurde durch mehrmaliges Aufziehen der Probe mit Hilfe einer 1 ml-Einwegspritze mit einer 26G-Kanüle geschert. Die Proben wurden auf einem SDS-Gel analysiert.

3.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch eindimensionale, diskontinuierliche SDS-PAGE (Laemmli 1970). Je nach der Größe des zu untersuchenden Proteins wurde eine Polyacrylamid-Konzentration zwischen 10% und 14% für das Trenngel und 4% für das Sammelgel verwendet. Die Elektrophorese der im Sammelgel befindlichen Proteine wurde mit 150 V und der im Trenngel befindlichen Proteine mit 220 V in einer Hoefer-SE600-Kammer durchgeführt.

3.5.3 Proteintransfer auf Nitrocellulose (Western Blot)

Die Proteine wurden zum Zwecke der Immundetektion (siehe 3.5.4.) mit Transferpuffer auf eine Nitrozellulose-Membran der Porengröße 0,45 µm transferiert (Towbin *et al.* 1979). Der Transfer erfolgte 2 Stunden bei einer festen Stromstärke von 1 A bei 4°C.

3.5.4 Immundetektion von Proteinen

Proteine wurden mit dem ECL (*Enhanced Chemiluminescenc*)-System nach Angaben des Herstellers detektiert. Die Nitrozellulose-Membran wurde zur Blockierung unspezifischer Bindungen eine halbe Stunde in PBST mit 5% Milchpulver bei Raumtemperatur geschwenkt und über Nacht bei 4°C mit den angegebenen Verdünnungen der primären Antikörper bzw. Antiseren inkubiert. Die Membran wurde dreimal 10 Minuten mit PBST gewaschen und 40 Minuten mit dem sekundären Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelten Schaf-Anti-Maus- bzw. Esel-Anti-Kaninchen-Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 in PBST inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal 10 Minuten mit PBST gewaschen und 1 min mit ECL inkubiert. Die Signale wurden durch Exposition eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

3.5.5 Nachweis der Glykosilierung

Es wurden verschiedene Methoden angewandt, um den Status der Glykosilierung zu bestimmen.

3.5.5.1 Hemmung der Glykosilierung mit Desoxymannojirimycin (DMJ)

Um die N (Asparagin-gekoppelte)-Glykosilierung der Proteine zu blockieren, wurde das Enzym α-1,2-Mannosidase des ERs unter Verwendung des Inhibitors Desoxymannojirimycin (DMJ) gehemmt. Dadurch wurde die Prozessierung der Zucker im ER unmittelbar nachdem die drei endständigen Glucosereste abgespalten

wurden, also direkt nach Abschluss des Calnexin-Zyklus, gestoppt (siehe Abbildung 9, Schritt 3). Die transfizierten Zellen wurden hierfür 16 Stunden mit 10 µg/ml DMJ bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nach der Zellernte erfolgte die Zelllyse und anschließende Immundetektion der Proteine.

3.5.5.2 Verdau mit N-Glycosidase F (PNGase F)

Um zu untersuchen, ob eine terminale N-Glykosilierung der Proteine vorliegt, wurde ein enzymatischer Verdau mit PNGase F nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Durch PNGase F können Zucker von terminal glykosilierten Proteinen abgespalten werden. Das Zellpellet (siehe 3.4.5) wurde mit 1% SDS 10 Minuten bei 100°C inkubiert. Die Zelllyse erfolgte unter Zugabe von Triton X-100 (0.9% Endkonzentration). Das Zelllysat wurde mehrmals durch eine 1 ml-Einwegspritze mit einer 26G-Kanüle gezogen und 10 Minuten bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Ein Aliquot des Überstandes (50 µg Protein) wurde mit Glycosidase F versetzt und 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine mit TCA (*trichloraceticacid*) gefällt (siehe 3.5.8). Die Probe wurde mit Laemmli-Probenpuffer versetzt und auf einem SDS-Gel analysiert.

3.5.5.3 Verdau mit Endoglycosidase H (Endo H)

Um zu untersuchen, ob eine Asparagin-gekoppelte Core Glykosilierung in Form einer High Mannose Struktur der Proteine vorliegt, wurde ein enzymatischer Verdau mit Endoglycosidase H (Endo H) nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Endo H spaltet spezifisch Hybridstrukturen, sowie zwischen zwei N-Acetyl-Glucosamin-Resten, an welchen mindestens fünf Mannose Einheiten gekoppelt sind (siehe Abbildung 9, einschließlich Schritt 5), jedoch keine komplexe Glykane (Robbins *et al.* 1984; Maley *et al.* 1989). Ein Aliquot des Überstandes (siehe 3.5.1.) wurde mit Denaturierungspuffer versetzt, 10 Minuten gekocht und anschließend 5 Minuten auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von Reaktionspuffer und Enzym wurde die Probe eine Stunde bei 37°C inkubiert, mit Laemmli-Probenpuffer versetzt und auf einem SDS-Gel analysiert.

Zur Analyse radioaktiv markierter Proteine (siehe 3.5.12) mit Endo H wurde das nach der Immunpräzipitation gewaschene Protein A Pellet (siehe 3.5.13) mit 0.5% SDS

versetzt und 10 Minuten gekocht. Der Überstand wurde 2 Minuten auf Eis gekühlt. Ein Aliquot wurde entnommen und mit Reaktionspuffer und Enzym eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Probe wurde mit Laemmli-Probenpuffer versetzt, auf ein SDS-Gel geladen und wie unter 3.5.14 beschrieben, analysiert.

3.5.6 Nachweis von Oberflächenproteinen

Es wurden verschiedene Methoden angewandt um zu untersuchen, ob ein Protein an der Plasmamembran lokalisiert ist.

3.5.6.1 Verdau mit Trypsin

Um alle Proteine, die sich an der Zelloberfläche befinden abzuspalten, wurde ein extrazellulärer Trypsin-Verdau durchgeführt. Dazu wurden transfizierte Zellen mit kaltem PBS-/- gewaschen und mit 500 µl Trypsin 5 Minuten bei 4°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in ein Reaktionsgefäß überführt, die Schale mit 500 µl Trypsin-Inhibitor nachgespült und mit den Zellen vereinigt. Die Zellen wurden 20 Sekunden bei 13000 rpm abzentrifugiert und das Zellpellet erneut mit Trypsin-Inhibitor gewaschen. Abschließend wurde das Zellpellet in Lysepuffer resuspendiert und wie unter 3.5.1. beschrieben weiterverarbeitet.

3.5.6.2 Oberflächenbiotinilierung

Zur Markierung aller sich an der Zelloberfläche befindlichen Proteine wurde eine Oberflächenbiotinilierung mit Plasmamembran-impermeantem Biotin durchgeführt. Transfizierte Zellen, die in Poly-D-Lysin beschichteten Schalen kultiviert wurden, wurden mit kaltem PBS-/- gewaschen und mit 0.5 mg/ml Biotin eine Stunde bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS-/- gewaschen und mit 10 mM kaltem Glycin 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach Lyse des Zellpellets wurde eine Immunpräzipitation (siehe 3.5.13) durchgeführt. Die Proben wurden mit Laemmli-Probenpuffer versetzt, auf ein SDS-Gel geladen und mittels Western Blot analysiert. Hierbei wurde die Nitrozellulose-Membran 40 Minuten bei Raumtemperatur mit Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppeltem Streptavidin in

einer Verdünnung von 1:1000 in PBST inkubiert. Die Signale wurden, wie unter Punkt 3.5.4 beschrieben, visualisiert.

3.5.7 Untersuchung der Membranverankerung

Zur Bestimmung der Art der Membranverankerung wurde ein Phosphatidylinositol-Phospholipase C (PIPLC) - Verdau durchgeführt. PIPLC schneidet selektiv den GPI-Anker ab. Dazu wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS-/- gewaschen und mit 0,5 U/ml PIPLC in PBS-/- versetzt. Die Zellkulturschalen wurden 3 Stunden bei 4°C geschwenkt. Der Überstand wurde abgenommen und die Proteine mit TCA gefällt (siehe 3.5.8.). Die Zellen wurden zweimal mit PBS-/- gewaschen, geerntet (siehe 3.4.5.) und wie unter 3.5.1. beschrieben analysiert.

3.5.8 Nachweis der Sekretion

Um zu untersuchen, ob eine Sekretion der Proteine in den Zellkulturüberstand vorliegt, wurden die Zellen zweimal mit MEM gewaschen und mit 1 ml MEM 3 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Das Medium wurde abgenommen und vorhandene Proteine mit TCA (*trichloraceticacid*) gefällt.
Für die TCA-Fällung wurden die Proben mit 1/10 Volumen 50% TCA-Lösung versetzt, 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 10 Minuten bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 500 µl Aceton gewaschen, an der Luft getrocknet und in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen. Die sekretierten Proteine wurden mittels Western Blot analysiert.

3.5.9 Nachweis der Wiederaufnahme von sekretierten Proteinen

Um festzustellen, ob sekretierte Proteine in Zellen wieder aufgenommen werden, wurden transfizierte Zellen mit MEM gewaschen und 3 Stunden mit 1 ml MEM bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Anschließend wurde der Zellmediumüberstand, abgenommen, filtriert, um abgelöste Zellen zu entfernen und auf untransfizierte Zellen gegeben. Nach 48 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO_2 wurden die

untransfizierten Zellen geerntet (siehe 3.4.5.), lysiert und wie unter Punkt 3.5.1. beschrieben weiterverarbeitet.
Für eine Untersuchung mittels Immunfluoreszenz wurde der Zellmediumüberstand auf untransfizierte Zellen gegeben, die in Zellkulturschalen mit 18 mm Deckgläschen kultiviert wurden. Die Immunfluoreszenz wurde, wie unter Punkt 3.5.19 beschrieben, durchgeführt.

3.5.10 Nachweis der Protease-Resistenz

Zum Nachweis der Protease-Resistenz wurde das Zelllysat von N2a-Zellen mit einer Konzentration zwischen 0.15 bis 1.2 µg/ml Proteinase K (PK) 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Lysate von ScN2a-Zellen dagegen wurden mit 1 µg PK pro 300 µg Protein eine Stunde bei 4°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von PMSF (Endkonzentration: 1 mM) und Laemmli-Probenpuffer gestoppt. Die Proben wurden auf einem SDS-Gel analysiert.

3.5.11 Nachweis der *in vitro*-Aggregation

Um eine Aggregation des Prion-Proteins unter Einfluss der Substanz Suramin (siehe 3.5.18) *in vitro* nachzuweisen, wurden die Zellen zunächst ohne Zugabe von Detergenz aufgebrochen. Dazu wurde das Zellpellet in 500 µl PBS+/+ resuspendiert und kurz auf Trockeneis gestellt. Sobald das Pellet gefroren war, wurde es bei 37°C aufgetaut. Nach erneutem Einfrieren und Auftauen wurde die Zellsuspension mehrmals durch eine 1 ml-Einwegspritze mit einer 26G-Kanüle gezogen und in zwei Aliquots aufgeteilt, wobei ein Aliquot mit 300 µg/ml Suramin versetzt wurde. Die Proben wurden 16 Stunden bei 4°C in einem Überkopf-Dreher inkubiert, anschließend mit ionischem Detergenzpuffer (0.5% Endkonzentration) versetzt und wie unter 3.5.1 beschrieben weiterverarbeitet.

3.5.12 Radioaktive Markierung

Einen Tag nach Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 30 Minuten in 1 ml MEM ohne Methionin (1x PenStrepGlu) inkubiert, um vorhandenes Methionin (Met) aufzubrauchen (Hungern). Für die radioaktive Markierung wurde das Medium abgenommen und durch 500 µl frisches MEM ohne Methionin mit [^{35}S]-Met (ProMix, 150 µCi/ml) ersetzt. Nach 30 Minuten bzw. einer Stunde wurden die Schalen, die zur Untersuchung der während der *pulse*-Phase synthetisierten Proteine bestimmt waren, mit kaltem PBS-/- gewaschen, geerntet und die Zellen mit Lysepuffer (PBS, 0,5% Triton X-100, 0,5% DOC, Complete Protease-Inhibitor) lysiert (*pulse*-Proben). Die restlichen Schalen wurden mit vorgewärmtem Vollmedium gewaschen und für die angegebene Zeit mit Vollmedium bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Die Lyse erfolgte wie oben beschrieben (*chase*-Proben). Die Proben wurden mittels einer Immunpräzipitation analysiert.

3.5.13 Immunpräzipitation (IP)

Die Zelllysate wurden 5 Minuten auf Eis gestellt und 20 Minuten bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Zelllysat wurde aufgetrennt in eine Detergenz-lösliche (Überstand) und eine -unlösliche (Pellet) Fraktion.
Die Fraktion mit dem Überstand wurde auf eine Endkonzentration von 0,5% Sarkosyl gebracht. Die Pellet-Fraktion wurde folgendermaßen verarbeitet: sie wurde mit 100 µl Lysepuffer (PBS, 0,5% Triton X-100, 0,5% DOC) und 1% SDS versetzt und 10 Minuten bei 100°C inkubiert. Nach Zugabe von 900 µl Lysepuffer wurden die Proben durch eine1 ml-Einwegspritze mit einer 26G-Kanüle gezogen und schließlich auf eine Endkonzentration von 0,5% Sarkosyl gebracht.
Beide Fraktionen wurden mit 1 µl Antikörper bzw. Antiserum über Nacht bei 4°C in einem Überkopf-Dreher inkubiert. Um die Protein/Antikörper-Komplexe zu isolieren, wurden 30 µl einer in IP-Puffer gewaschenen Protein A-Trisacryl-Matrix zugefügt und die Inkubation eine Stunde bei 4°C in einem Überkopf-Dreher fortgesetzt. Die Komplexe wurden kurz abzentrifugiert, zweimal mit IP-Puffer und zuletzt einmal mit

PBS-/- gewaschen und in 60 µl Laemmli-Probenpuffer 10 min gekocht. Je 40 µl der Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und autoradiographisch analysiert.

3.5.14 Autoradiodiagramme

Gele mit radioaktiv markierten Proteinen wurden 30 Minuten fixiert (40% Methanol, 7% Essigsäure) und anschließend für eine weitere halbe Stunde mit Amplify inkubiert. Auf einem Whatman-Papier wurden sie dann in einem Geltrockner eine Stunde bei 72°C unter Vakuum getrocknet. Die markierten Proteine wurden durch Exposition eines Röntgenfilms visualisiert.

3.5.15 Behandlung mit proteasomalem Inhibitor

Um das Proteasom zu hemmen, wurden die Zellen mit dem proteasomalen Inhibitor MG132 (Tsubuki *et al.* 1993) behandelt. Für eine Analyse mit Western Blot wurden die Zellen einen Tag nach ihrer Transfektion mit 30 µM MG132 für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Für eine Immunpräzipitation dagegen wurde MG 132 in einer Konzentration von 50 µM während des Hungerns, der *pulse*- (30 Minuten) und der *chase*-Phase (2 Stunden) zu den Zellen gegeben.

3.5.16 Behandlung mit lysosomalem Inhibitor

Eine Hemmung des Lysosoms wurde durch folgende Substanzen erzielt:
Die Wirkung von Bafilomycin beruht auf einer spezifischen Hemmung der Protonenpumpen von Vakuolen. Dazu wurden die Zellen 9 Stunden nach ihrer Transfektion mit 1 µM Bafilomycin für 16 Stunden bei 37°C inkubiert.
Die Protease-Inhibitoren Leupeptin und Pepstatin wurden in Kombination angewandt. Dabei hemmt Leupeptin Serin- und Cysteinproteasen, Pepstatin dagegen spezifisch saure Proteasen, insbesondere Aspartasen. Hierfür wurden die Zellen 9 Stunden nach ihrer Transfektion mit jeweils 200 µM dieser Protease-Inhibitoren versetzt und für 16 Stunden bei 37°C inkubiert.

3.5.17 Behandlung mit endozytotischem Inhibitor

Um die Endozytose des Prion-Proteins spezifisch zu hemmen, wurden die Zellen mit Filipin behandelt, einem Antibiotikum, das an Sterole der Zellmembran bindet und dabei caveoläre Strukturen (*Caveolae*) zerstört. Dazu wurden die Zellen 9 Stunden nach der Transfektion mit 0.25 µg/ml Filipin für 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Analyse mit Western Blot und eine Immunfluoreszenz mit permeabilisierten Zellen (siehe 3.5.19).

3.5.18 Behandlung mit Suramin

N2a- und SH-SY5Y-Zellen wurden 9 Stunden nach der Transfektion mit 150 µg/ml bzw. 300 µg/ml Suramin 16 Stunden bei 37°C inkubiert und nach der Ernte, wie unter Punkt 3.5.1 beschrieben, analysiert. Gleiche Bedingungen galten für die Immunfluoreszenz (siehe 3.5.20). ScN2a-Zellen wurden 9 Stunden nach der Transfektion mit 150 µg/ml Suramin 4 Tage inkubiert und wie die N2a- und SH-SY5Y-Zellen mit Western Blot analysiert.
Der Nachweis der Suramin-induzierten *in vitro*-Aggregation ist unter Punkt 3.5.11 dargestellt.
Bei der Oberflächenbiotinilierung (siehe 3.5.6.2) wurden die Zellen nach der Behandlung mit Glycin mit vorgewärmtem Vollmedium gewaschen und bis zu ihrer Zelllyse 4 Stunden mit Suramin (300 µg/m) bei 37°C inkubiert. Der weitere Versuchsverlauf erfolgt wie unter Punkt 3.5.6.2 beschrieben.

3.5.19 Behandlung mit Kupfer

N2a-Zellen wurden einen Tag nach der Transfektion mit MEM gewaschen und 4 Stunden mit Kupfer in einer Konzentration von 50-500 µM in MEM bei 37°C inkubiert und mittels Western Blot analysiert. Gleiche Bedingungen galten für die Immunfluoreszenz (siehe 3.5.20). ScN2a-Zellen dagegen wurden 3 Tage in 0.5 µM Kupfer kultiviert und anschließend einem PK-Verdau (siehe 3.5.10) unterzogen.

3.5.20 Indirekte Immunfluoreszenz

Um die zelluläre Lokalisierung von Proteinen in lebenden Zellen zu bestimmen, wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit permeabilisierten und nicht-permeabilisierten Zellen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in 3,5 cm-Schalen, welche ein Deckgläschen mit einem Durchmesser von 18 mm enthielten, ausplattiert (siehe 3.4.3.). Das Deckgläschen wurde zuvor mit absolutem Ethanol gespült und abgeflammt. Einen Tag nach der Transfektion (siehe 3.4.4.) wurden die Glasplättchen mit vorgewärmtem PBS+/+ gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellen wurden die Deckgläschen 10 Minuten in Methanol (-20°C) fixiert (permeabilisierte Zellen). Zellen, die nicht permeabel sein sollten, wurden hingegen 30 Minuten bei 4°C mit 3% Paraformaldehyd (PFA) inkubiert (nicht-permeabilisierte Zellen). Anschließend wurden die Glasplättchen zum Rehydrieren 3 min mit PBS-/- (4°C) gewaschen und mit 80 µl monoklonalem Antikörper 3F4 in einer Verdünnung von 1:200 in PBS-/- mit 1% BSA (*bovine serum albumin*) luftblasenfrei versehen. Die Deckgläschen wurden eine Stunde bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS-/- (je 3 Minuten) wurden 80 µl des Fluoreszenz-markierten Zweitantikörpers Cy3 (1:200 in PBS-/-, 1% BSA) luftblasenfrei auf die Plättchen getropft. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Präparate erneut dreimal 3 Minuten in PBS-/- gewaschen und auf einem Objektträger eingebettet. Nach 16-stündiger Aushärtung bei Raumtemperatur wurden die Proben unter Lichtschutz bei 4°C gelagert und mittels eines Fluoreszenz-Mikroskops ausgewertet.

4. Ergebnisse

4.1 Pathogene Mutationen innerhalb des hydrophoben Cores des Prion-Proteins beeinflussen die Faltung und Maturierung

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wird die Faltung und Maturierung humanpathogener PrP-Mutanten im Zellkulturmodell untersucht.
Verschiedene Mutationen im Prion-Protein-Gen (vgl. Abb. 2) können beim Menschen Prion-Erkrankungen auslösen können. Obwohl der Mechanismus der Neurodegeneration unbekannt ist, geht man davon aus, dass die Missfaltung von PrP^C eine entscheidende Rolle spielt. Es wird angenommen, dass PrP-Mutationen die Umfaltung von PrP^C in eine pathogene Konformation begünstigen.
Eine biochemische und zellbiologische Analyse krankheitsassoziierter PrP-Mutanten könnte nicht nur zur Klärung der PrP^C-Missfaltung bei hereditären Prion-Erkrankungen führen, sondern auch dazu beitragen, den Mechanismus der Missfaltung bei sporadischen und erworbenen Prion-Erkrankungen besser zu verstehen. In der vorliegenden Studie wurden die beiden pathogenen Mutationen T183A und F198S (Dlouhy *et al.* 1992; Nitrini *et al.* 1997) untersucht. Die Substitution T183A hat eine Zerstörung der ersten Akzeptorstelle für die Asparagin-gekoppelten Glykane zur Folge. Diese Mutante besitzt daher nur eine intakte Glykosilierungsstelle. In einer vergleichenden Analyse mit weiteren monoglykosilierten Mutanten wurde zunächst untersucht, ob der Verlust einer Glykosilierungsstelle einen Einfluss auf die Faltung und Maturierung von PrP besitzt. Da gemäß NMR-Strukturanalysen die Seitenketten der Aminosäuren Threonin 183 (T183) und Phenylalanin 198 (F198) zur Stabilisierung des hydrophoben Cores der globulären C-terminalen Domäne von PrP beitragen könnten (Riek *et al.* 1998), wurde als nächstes analysiert, ob die Mutationen T183A und F198S möglicherweise zu einer Destabilisierung der Tertiärstruktur führen. Hierfür wurden T183A und F198S mit anderen Mutationen verglichen, die einen destabilisierenden Effekt auf den hydrophoben Core haben könnten. In einer umfassenden Studie der Biogenese aller Mutanten wurde analysiert, ob diese eine Core Glykosilierung erhalten und eine mögliche Umwandlung der Core Glykane in komplexe Strukturen, sowie eine

Anheftung des GPI-Ankers erfolgt. Außerdem wurde untersucht, ob der weitere Proteintransport an die Zelloberfläche beeinflusst wird. Neben der Analyse der Proteinfaltung wurde auch geprüft, ob mögliche missgefaltete Mutanten über eine ER-assoziierte Degradierung eliminiert werden können.

4.1.1 Die pathogene Mutation T183A beeinflusst die Maturierung des Prion-Proteins

Um die humanpathogenen Mutanten in Maus-Neuroblastomzellen (N2a-Zellen) zu untersuchen, wurden der Maussequenz entsprechende äquivalente Konstrukte hergestellt. So wurde zunächst das Konstrukt T182A kloniert, das der humanpathogenen Mutante T183A entspricht. Da dieser Mutante die erste Glykosilierungsstelle fehlt, stellt sich zunächst die Frage, ob dieser Verlust die Biogenese von PrP beeinflusst. Eine vergleichende Analyse mit N180Q, einer Mutante, die ebenfalls durch den Verlust der ersten Glykosilierungsstelle ausgezeichnet ist, sollte dies klären. Ferner wurden Wildtyp PrP (wt, entspricht dem Maus-PrP^C) und die Mutante N196Q hinzugezogen, welcher die zweite Glykosilierungsstelle fehlt.

4.1.1.1 Die Mutation T182A verhindert die Umwandlung von High Mannose Glykanen in komplexe Strukturen

Es gibt unterschiedliche Glykosilierungsstadien eines Proteins: eine unglykosilierte Form, eine High Mannose Glykosilierungsform und eine komplexe Glykosilierung (vgl. Punkt 1.3.1). Die Verwendung bestimmter Enzyme ermöglicht eine Untersuchung des Glykosilierungsstatus. Die Endoglycosidase H (Endo H) spaltet spezifisch zwischen zwei N-Acetyl-Glucosamin-Resten, an denen mindestens fünf Mannose-Einheiten (vgl. Abb. 9, einschließlich Schritt 5) gekoppelt sind (Robbins *et al.* 1984; Maley *et al.* 1989). Folglich werden durch dieses Enzym lediglich Zucker von Proteinen mit High Mannose Formen, jedoch nicht mit komplexen Glykanen abgespalten. Durch einen Verdau mit N-Glycosidase F (PNGase F) hingegen können Zucker von komplex glykosilierten Proteinen abgetrennt werden. Proteine, die

sensitiv für einen Endo H- oder einen PNGase F-Verdau sind, weisen auf einem SDS-Gel eine erhöhte elektrophoretische Mobilität auf.

Um den Glykosilierungsstatus der verschiedenen Mutanten zu bestimmen, wurden diese, ebenso wie Wildtyp PrP, in N2a-Zellen exprimiert. Die Proteinextrakte wurden einem Verdau mit Endo H oder PNGase F unterzogen. PrP wurde mittels Western Blot unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 3F4 auf einem SDS-Gel analysiert. Aufgrund seiner komplexen Glykosilierung ist Wildtyp PrP (wt) nicht sensitiv für Endo H (Abb. 13 A) sondern lediglich für PNGase F (Abb. 13 B), wie aus der deutlich erhöhten elektrophoretischen Mobilität nach dem Verdau ersichtlich ist. Auch N180Q und N196Q sind nicht sensitiv gegenüber einem Endo H-Verdau (Abb. 13 A), woraus sich schlussfolgern lässt, dass das restliche Glykan an der ersten (N196Q) bzw. zweiten (N180Q) Glykosilierungsstelle der jeweiligen Mutante in eine komplexe Struktur umgewandelt wurde. So ist N180Q, ähnlich wie wt, sensitiv für PNGase F (Abb. 13 B). T182A ist als einzige Mutante sensitiv für Endo H (Abb. 13 A), was darauf hindeutet, dass das restliche Glykan von T182A lediglich in einer High Mannose Form vorliegt (oberer Pfeil).

Um die bei T182A fehlende Ausbildung einer komplexen Struktur näher zu untersuchen, wurden transfizierte Zellen radioaktiv markiert und PrP mittels einer Immunpräzipitation entweder direkt analysiert (*pulse*) oder zuvor eine Stunde in frischem Medium inkubiert (*chase*). Während N180Q in der *pulse*-Phase noch teilweise Endo H-sensitiv ist, entwickelt sich dann in der *chase*-Phase eine vollständige Resistenz gegen Endo H (Abb. 13 C), was verdeutlicht, dass eine Umwandlung des Core Glykans in eine komplexe Struktur erfolgt ist. Im Gegensatz dazu, verbleibt das restliche Glykan von T182A auch nach Inkubation der Zellen in frischem Medium (*chase*) Endo H-sensitiv und ist somit nicht in eine komplexe Struktur umgewandelt worden.

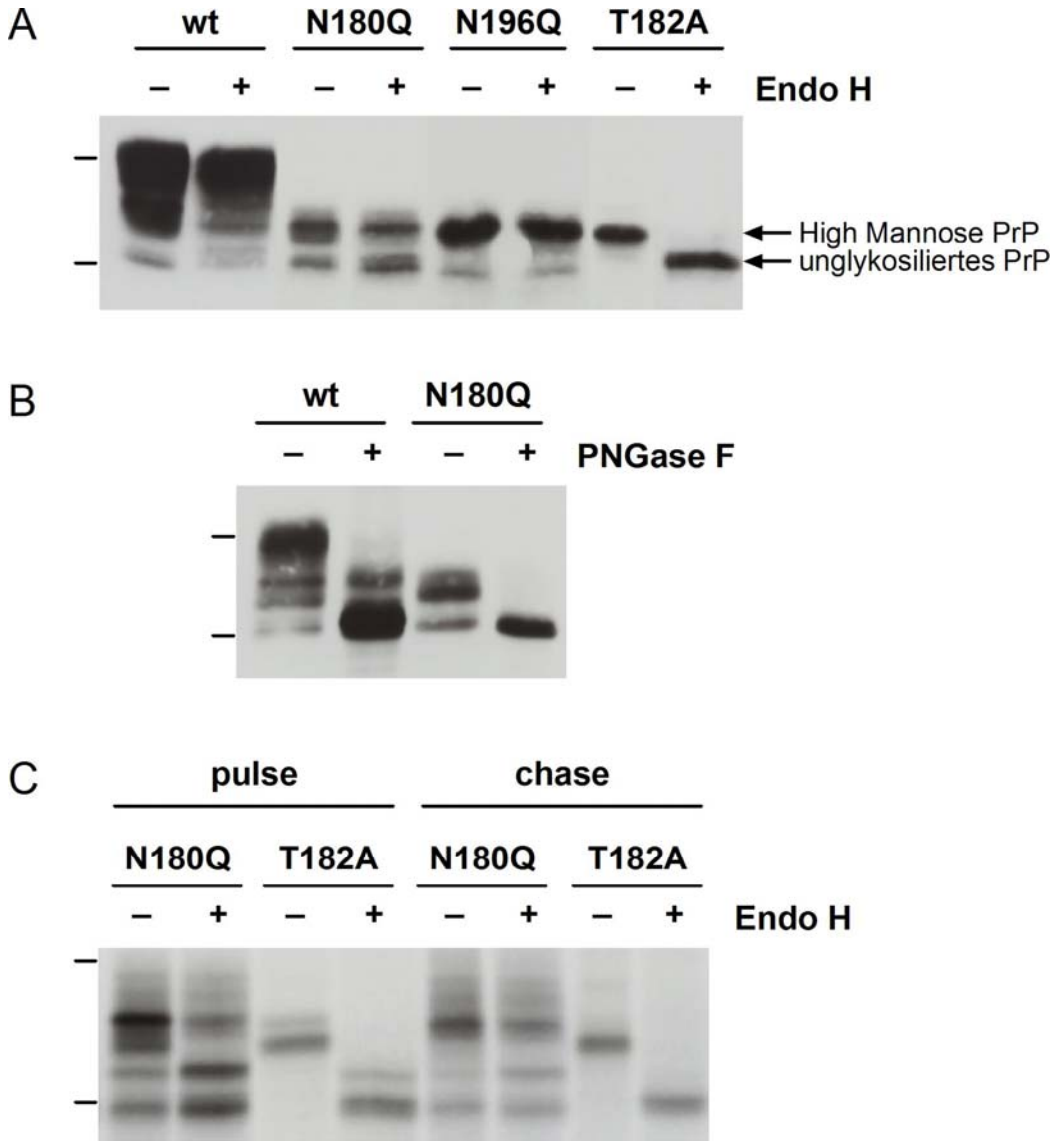

Abbildung 13: Die pathogene Mutante T182A erhält keine komplexe Glykosilierung. N2a-Zellen wurden transient mit wt und Mutanten, welchen die erste (N180Q und T182A) bzw. zweite (N196Q) Glykosilierungsstelle fehlt, transfiziert. **(A, B)** Das Zelllysat wurde in zwei Aliquots aufgeteilt, wobei jeweils ein Aliquot mit Endo H **(A)** bzw. PNGase F **(B)** inkubiert wurde. Die PrP-Expression wurde mittels Western Blot analysiert. Die Pfeile kennzeichnen die unterschiedlichen Glykosilierungsformen von T182A vor und nach dem Endo H-Verdau. **(C)** Die transfizierten Zellen wurden 30 Minuten mit [^{35}S]-Methionin radioaktiv markiert und entweder direkt analysiert (*pulse*) oder eine Stunde in frischem Medium inkubiert (*chase*). PrP wurde mit dem monoklonalen Antikörper 3F4 immunpräzipitiert. Die Produkte wurden in zwei Aliquots aufgeteilt, wovon eines jeweils mit Endo H inkubiert wurde. Die Größenmarker 36 und 22 kDa sind jeweils links am Rand als Striche dargestellt.

Die ersten Untersuchungen zeigen, dass zwei verschiedene PrP-Mutanten, welchen jeweils die erste Glykosilierungsstelle fehlt (T182A und N180Q), einen unterschiedlichen Glykosilierungsstatus besitzen. Während bei N180Q ebenso wie bei N196Q und Wildtyp PrP eine komplexe Glykosilierung erfolgt, erhält T182A

lediglich eine Core Glykosilierung, was verdeutlicht, dass das Protein zwar in das ER importiert wird, die terminale Glykosilierung jedoch ausbleibt.

4.1.1.2 Die Mutation T182A verhindert die Übertragung des GPI-Ankers

Nach der Core Glykosilierung der Proteine erfolgt im ER auch die Anheftung des GPI-Ankers (vgl. Abb. 6). Als nächstes wurde untersucht, ob sich die verschiedenen Mutanten an der Plasmamembran befinden und ob sie dort mit Hilfe des GPI-Ankers verankert sind. In die folgenden Analysen wurde die Mutante M204S miteinbezogen. Wie aus einer vorangegangenen Studie hervorgeht, wird durch diese Aminosäuresubstitution wahrscheinlich eine Interaktion zwischen Helix 1 und 3 des Prion-Proteins zerstört (Winklhofer *et al.* 2003). Als Konsequenz darauf erhält M204S keinen GPI-Anker und wird in das Zellkulturmedium sekretiert.

Als erster Anhaltspunkt für die zelluläre Lokalisierung der Konstrukte diente ein extrazellulärer Trypsinverdau. Versetzt man intakte, transfizierte Zellen mit Trypsin, so werden alle an der Zelloberfläche befindlichen Proteine abgespalten. Nach einer Western Blot Analyse mit dem 3F4-Antikörper kann an der Plasmamembran befindliches PrP im Zelllysat nicht mehr detektiert werden. Sowohl Lysate von wt- als auch von N180Q-exprimierenden Zellen haben nach Behandlung mit Trypsin den größten Anteil an PrP verloren (Abb. 14 A, +Trypsin). Somit ist N180Q ebenso wie Wildtyp PrP an der Plasmamembran lokalisiert. Im Gegensatz dazu ist der relative Anteil von T182A wie auch von M204S nach dem extrazellulären Trypsinverdau in der Detergenz-löslichen (S) und -unlöslichen (P) Fraktion unverändert geblieben. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass T182A nicht an der Plasmamembran lokalisiert ist.

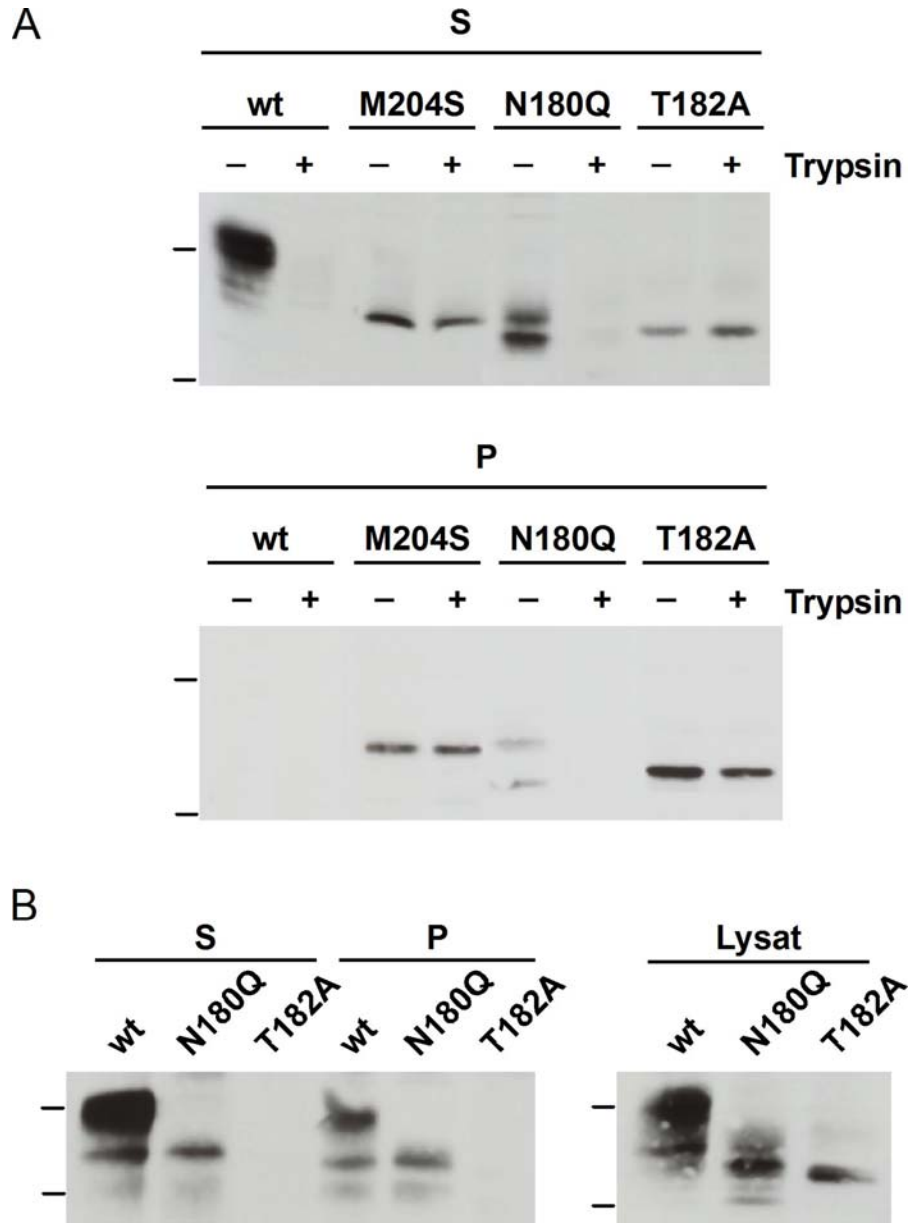

Abbildung 14: T182A ist nicht an der Plasmamembran lokalisiert. Die Zellen wurden mit den Konstrukten wt, N180Q, T182A und M204S transient transfiziert. **(A)** Intakte Zellen wurden bei 4°C mit Trypsin inkubiert, um Oberflächenproteine abzulösen, oder zur Kontrolle unbehandelt belassen. Nach der Zelllyse und Zentrifugation in der Detergenz-löslichen (S) und -unlöslichen (P) Fraktion verbleibendes PrP wurde mittels Western Blot analysiert. **(B)** Biotinilierung von PrP an der Plasmamembran. Transfizierte Zellen wurden mit Plasmamembran-impermeantem Biotin inkubiert und anschließend lysiert. PrP in der Detergenz-löslichen (S) und -unlöslichen (P) Fraktion wurde mit dem monoklonalen Antikörper 3F4 immunpräzipitiert. Die Produkte wurden mit Streptavidin auf einem Western Blot analysiert (linker Blot). Zum Nachweis der Zellexpression wurde ein Aliquot aus dem Lysat entnommen und mittels Western Blot mit dem 3F4-Antikörper analysiert (rechter Blot). Die Größenmarker 36 und 22 kDa sind jeweils links am Rand als Striche dargestellt.

Um die Lokalisierung der verschiedenen Konstrukte näher zu untersuchen, wurde eine Oberflächenbiotinilierung durchgeführt, welche ausschließlich eine Detektierung von

Proteinen ermöglicht, die an der Plasmamembran lokalisiert sind. Transfizierte Zellen wurden zur Markierung aller sich an der Zelloberfläche befindlichen Proteine mit Plasmamembran-impermeantem Biotin inkubiert. Nach der Lyse wurde PrP immunpräzipitiert und mittels Western Blot analysiert (Abb. 14 B, links). Wildtyp PrP (wt) befindet sich an der Zelloberfläche und ist daher biotiniliert. Dasselbe trifft für N180Q zu. Im Gegensatz dazu ist kein biotiniliertes T182A in der Detergenz–löslichen (S) oder -unlöslichen (P) Fraktion zu finden, was verdeutlicht, dass dieses Konstrukt nicht an der Plasmamembran lokalisiert ist. Als Kontrolle dafür, dass T182A in den Zellen exprimiert wird, wurde jeweils ein Aliquot aus den biotinilierten Lysaten entnommen und direkt mittels Western Blot analysiert. Diese Untersuchung zeigt, dass T182A eine vergleichbare Expressionsrate wie Wildtyp PrP (wt) und N180Q besitzt (Abb. 14 B, rechts).

Aufgrund der fehlenden Lokalisierung von T182A an der Plasmamembran, wurde die GPI-Verankerung genauer untersucht. Dazu wurden intakte, transfizierte Zellen mit Phosphatidylinositol-Phospholipase C (PIPLC) inkubiert. PIPLC schneidet spezifisch den GPI-Anker der Proteine. GPI-verankerte Proteine befinden sich daher nach einem Verdau mit PIPLC im Zellkulturmedium und können in dieser Fraktion mittels Western Blot detektiert werden. Um eine Lokalisierung der Proteine im Zellkulturmedium durch eine möglich stattfindende Sekretion zu vermeiden, wurde der Verdau bei 4°C vollzogen. Wie erwartet ist GPI-verankertes Wildtyp PrP (wt) nach einem PIPLC-Verdau nicht mehr im Zelllysat (Abb. 15, +PIPLC, Lysat), sondern im Zellkulturmedium (Abb. 15, +PIPLC, Medium) zu finden. Die Analysen zeigen, dass auch N180Q mit einem GPI-Anker versehen ist. Dagegen sind T182A und M204S nach Behandlung der Zellen mit PIPLC nicht im Zellkulturmedium detektierbar. Die relativen Proteinmengen dieser Mutanten jedoch bleiben im Zelllysat nach einer Inkubation mit PIPLC unverändert (Abb. 15, +PIPLC, Lysat). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass T182A im Gegensatz zu wt und N180Q nicht mit einem GPI-Anker an der Plasmamembran lokalisiert ist.

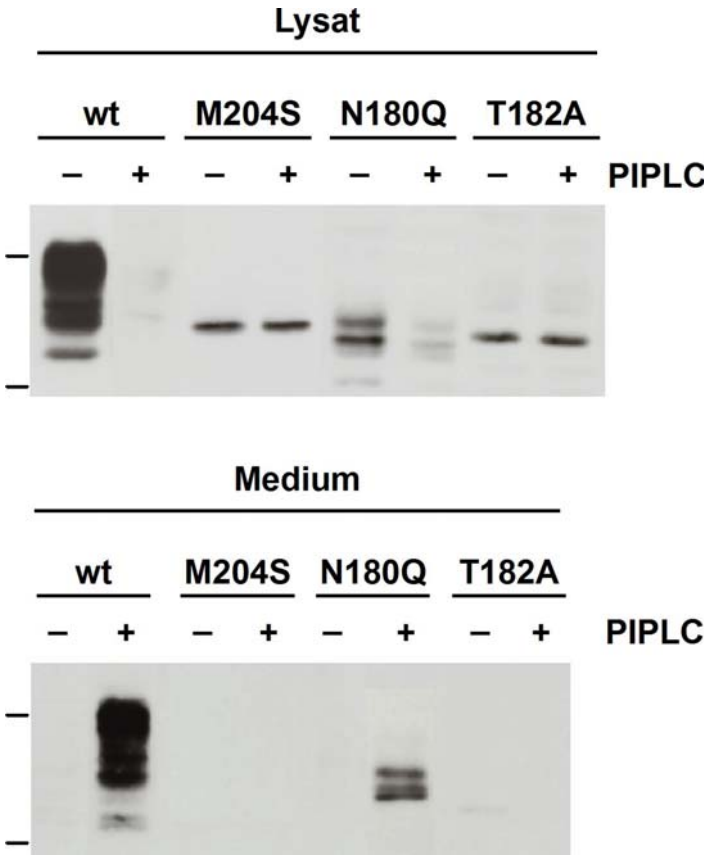

Abbildung 15: T182A besitzt keinen GPI-Anker. Intakte, transient transfizierte Zellen wurden mit PIPLC bei 4°C inkubiert, um GPI-verankerte Proteine von der Plasmamembran abzuspalten oder zur Kontrolle unbehandelt belassen. Im Zelllysat (Lysat) oder im Zellkulturmedium (Medium) befindliches PrP wurde mittels Western Blot analysiert. Die Größenmarker 36 und 22 kDa sind jeweils links am Rand als Striche dargestellt.

Nach den biochemischen Untersuchungen zur Klärung der zellulären Lokalisierung der verschiedenen Konstrukte wurde eine Analyse in lebenden Zellen durchgeführt. Dazu wurde nach der Transfektion eine indirekte Immunfluoreszenz in permeabilisierten und nicht-permeabilisierten murinen (N2a) sowie humanen (SH-SY5Y) Neuroblastomzellen vorgenommen. In nicht-permeabilisierten Zellen kann der Antikörper nicht in die Zellen gelangen. Somit wird lediglich PrP detektiert, das sich an der Zelloberfläche befindet. Bei permeabilisierten Zellen dagegen ist eine Visualisierung von PrP sowohl außerhalb als auch innerhalb der Zellen möglich.

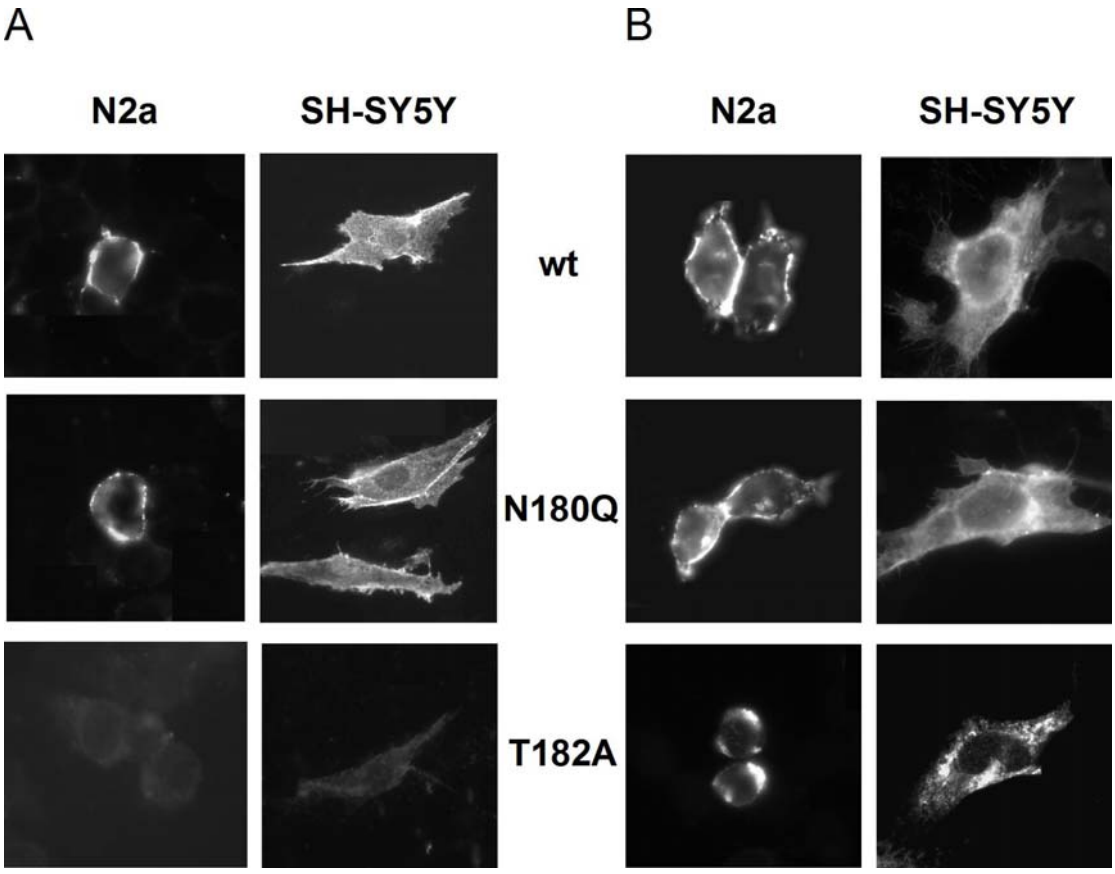

Abbildung 16: Zelluläre Lokalisierung von PrP in intakten Zellen. N2a- und SH-SY5Y-Zellen wurden auf Glasplättchen kultiviert und mit den Konstrukten wt, N180Q und T182A transfiziert. Die Lokalisierung von PrP wurde durch indirekte Immunfluoreszenz in nicht-permeabilisierten **(A)** und permeabilisierten **(B)** Zellen unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 3F4 visualisiert.

In nicht-permeabilisierten (Abb. 16 A) und in permeabilisierten (Abb. 16 B) Zellen ist Wildtyp PrP (wt) und - wie aufgrund der vorangegangen biochemischen Analysen zu erwarten - auch N180Q gut detektierbar, wobei überall eine klare Lokalisierung von PrP an der Zelloberfläche zu erkennen ist. Dagegen kann T182A in nicht-permeabilisierten Zellen nicht visualisiert werden (Abb. 16 A), wodurch bestätigt wird, dass diese Mutante nicht an der Zelloberfläche lokalisiert ist. Da in permeabilisierten Zellen jedoch eine Visualisierung von T182A möglich ist, kann eine intrazelluläre Lokalisierung angenommen werden (Abb. 16 B).

4.1.1.3 Die Mutation T182A bewirkt eine Sekretion

Wie bisher beschrieben, ist die pathogene Mutante T182A weder komplex glykosiliert noch mit einem GPI-Anker an der Plasmamembran lokalisiert. Diese Ergebnisse bestätigen vorherige Studien, die aufgrund ähnlicher Daten zum Schluss kamen, dass T182A im ER zurückgehalten wird (Rogers *et al.* 1990; Lehmann und Harris 1997). Tatsächlich ist eine derartige Schlussfolgerung voreilig. Zwar werden Endo H-sensitive Glykane oft als diagnostische Marker für Proteine verwendet, die im ER zurückgehalten werden, andererseits ist aber eine terminale Prozessierung der Glykane für den weiteren Transport von PrP nicht notwendig. So wird beispielsweise eine PrP-Mutante, die keine GPI-Signalsequenz besitzt überhaupt nicht glykosiliert, jedoch effizient sekretiert (Rogers *et al.* 1993; Blochberger *et al.* 1997; Winklhofer *et al.* 2003). Auch verschiedene PrP-Mutanten, die wie M204S lediglich in einer High Mannose Form vorliegen, werden nicht im ER zurückgehalten sondern sekretiert (Winklhofer *et al.* 2003). Andererseits kann auch GPI-verankertes PrP, das nur High Mannose Glykane besitzt, an der Plasmamembran lokalisiert sein (Winklhofer *et al.* 2003).

Basierend auf diesen Kenntnissen wurde nun experimentell untersucht, ob T182A aufgrund eines fehlenden GPI-Ankers in das Zellkulturmedium sekretiert wird. Dazu wurden die transfizierten Zellen drei Stunden bei 37°C inkubiert und das Zellkulturmedium mittels Western Blot auf sekretiertes PrP untersucht.

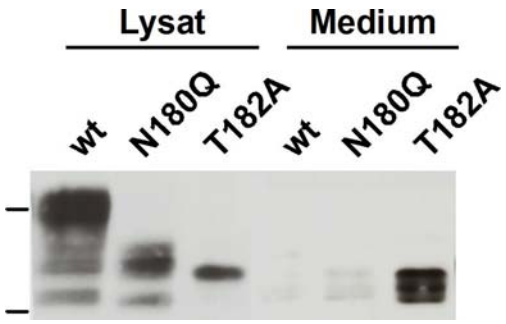

Abbildung 17: T182A wird in das Zellkulturmedium sekretiert. Transient transfizierte Zellen wurden 3 Stunden bei 37°C in Serum-freiem Medium inkubiert. PrP im Zelllysat (Lysat) und im Zellkulturmedium (Medium) wurde mittels Western Blot analysiert. Die Größenmarker 36 und 22 kDa sind jeweils links am Rand als Striche dargestellt.

Wie in Abbildung 17 zu erkennen ist, werden Wildtyp PrP (wt) und N180Q aufgrund ihrer GPI-Verankerung nicht in das Zellkulturmedium sekretiert, wohingegen T182A tatsächlich eine effiziente Sekretion aufweist (Abb. 17, Medium). Zum Nachweis der Expression wurde auch das Zelllysat analysiert (Abb. 17, Lysat).
Die umfangreiche Analyse der Maturierung hat ergeben, dass die humanpathogene Mutante T182A im Gegensatz zu Wildtyp PrP und N180Q weder komplex glykosiliert wird noch an der Zelloberfläche verankert ist. Allerdings wird T182A nicht im ER zurückgehalten, sondern aufgrund eines fehlenden GPI-Ankers effizient in das Zellkulturmedium sekretiert. Die Ergebnisse zeigen auch, dass N180Q, eine Mutante, die wie T182A durch den Verlust der ersten Glykosilierungsstelle ausgezeichnet ist, ähnlich wie Wildtyp PrP komplex glykosiliert wird und an der Plasmamembran lokalisiert ist. Aus dieser vergleichenden Analyse lässt sich schlussfolgern, dass die beschriebenen Effekte von T182A auf die Maturierung von PrP nicht auf den Verlust der ersten Glykosilierungsstelle zurückzuführen sind.

4.1.2 Die Mutation T182A hat eine Missfaltung von PrP zur Folge

Als nächstes sollte analysiert werden, ob die pathogene Mutation einen Einfluss auf die Faltung von PrP hat. Hierfür wurden alle Mutanten auf ihre Löslichkeit und Proteinase K-Resistenz untersucht.
Zum Erstellen des Löslichkeitsprofils wurden die transfizierten Zellen nach der Lyse zentrifugiert und die Lysate jeweils in eine Detergenz-lösliche (S) und -unlösliche (P) Fraktion aufgeteilt (Abb. 18). Wie für ein lösliches Protein zu erwarten, ist Wildtyp PrP (wt) ausschließlich in der Detergenz-löslichen Fraktion zu finden. Die monoglykosilierten Mutanten N180Q und N196Q befinden sich zu einem geringen Anteil auch in der Detergenz-unlöslichen Fraktion. Im Gegensatz dazu ist der größte Anteil von T182A in der Detergenz-unlöslichen Fraktion zu finden.

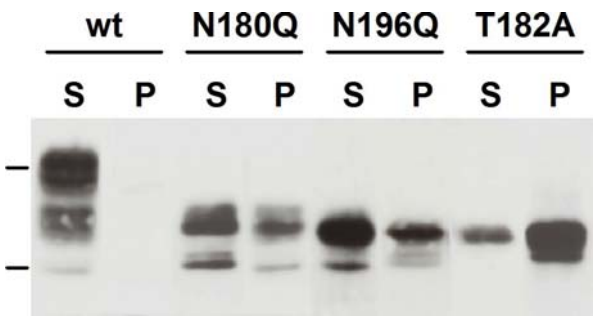

Abbildung 18: T182A erhält eine missgefaltete Konformation. N2a-Zellen wurden mit den Konstrukten wt, N180Q, N196Q, und T182A transient transfiziert. Nach der Zelllyse und Zentrifugation wurden die Lysate jeweils in eine Detergenz-lösliche (S) und -unlösliche (P) Fraktion aufgeteilt. PrP wurde mittels Western Blot analysiert. Die Größenmarker 36 und 22 kDa sind links am Rand als Striche dargestellt.

Da T182A hauptsächlich in der unlöslichen Fraktion detektierbar ist, könnte eine Missfaltung dieser Mutante vorliegen. Um dies zu bestätigen, wurde ein proteolytischer Verdau durchgeführt. Proteinextrakte aus transfizierten Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Proteinase K (PK) bei 4°C inkubiert. Verbleibendes PrP wurde mit einem Western Blot analysiert. Wie in Abbildung 19 deutlich zu erkennen ist, verringert sich mit ansteigender PK-Konzentration die Proteinmenge von Wildtyp PrP (wt) und N180Q auf ähnliche Weise. Beide Mutanten besitzen also eine vergleichbare Sensitivität gegenüber PK. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass N180Q eine ähnliche Konformation wie Wildtyp PrP besitzt. Im Gegensatz dazu ist T182A äußerst PK-resistent. Diese Resistenz hält selbst bis zu einer PK-Konzentration an, die für die komplette Degradierung von Wildtyp PrP (wt) bzw. N180Q ausreichend ist (Abb. 19, 1.2 µg/ml).

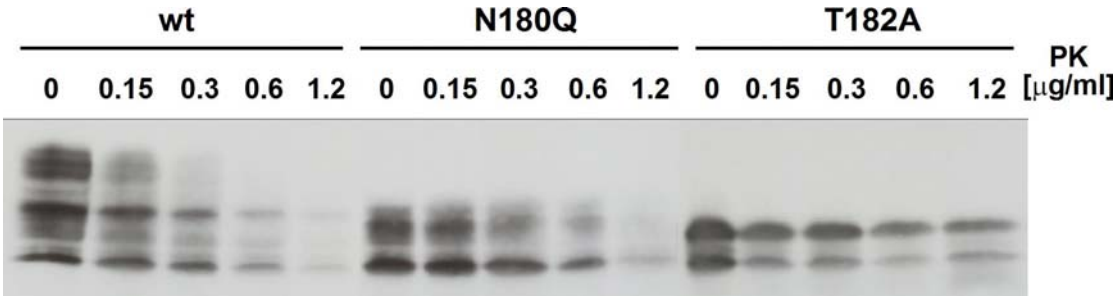

Abbildung 19: T182A ist partiell Protease-resistent. Proteinextrakte aus transient transfizierten Zellen wurden 30 Minuten mit den angegebenen Proteinase K (PK)-Konzentrationen bei 4°C versetzt. Verbleibendes PrP wurde mit einem Western Blot analysiert.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die pathogene Mutation T182A zu einer Missfaltung von PrP führt, was sich in der Detergenz-Unlöslichkeit und erhöhten PK-Resistenz widerspiegelt. Der Vergleich mit den monoglykosilierten Mutanten N180Q und N196Q zeigt, dass die Missfaltung von T182A ebenso wenig wie die unvollständige Maturierung (siehe Punkt 4.1.4) auf den Verlust der einen Glykosilierungsstelle zurückzuführen ist.

4.1.3 Sekretiertes PrP kann von Zellen wieder aufgenommen werden

Wie unter Kapitel 4.1.1.3 beschrieben, wird T182A infolge einer fehlenden GPI-Verankerung effizient in das Zellkulturmedium sekretiert. Um zu untersuchen, ob sekretiertes T182A wieder von heterologen Zellen aufgenommen werden kann, wurde das Zellkulturmedium transfizierter Zellen, welches sekretierte Proteine enthält, abgenommen und auf untransfizierte Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von achtundvierzig Stunden wurde mittels Western Blot analysiert, ob eine Wiederaufnahme von sekretiertem PrP möglich ist. Durch Verwendung des monoklonalen Antikörpers 3F4 wurde sichergestellt, dass lediglich transfiziertes, nicht jedoch endogenes PrP^C detektiert wird.

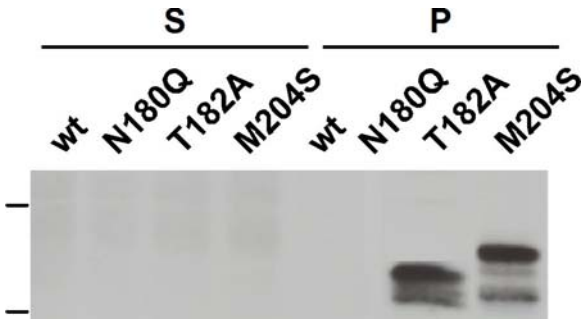

Abbildung 20: Sekretiertes T182A kann von heterologen Zellen wieder aufgenommen werden. Mit wt, N180Q, T182A und M204S transfizierte N2a-Zellen wurden 3 Stunden in Serum-freiem Medium bei 37°C inkubiert. Das Zellkulturmedium wurde filtriert und auf untransfizierte Zellen gegeben. Nach 48 Stunden wurden die untransfizierten Zellen lysiert. und durch Zentrifugation jeweils in eine lösliche (S) und unlösliche (P) Fraktion aufgeteilt. Aufgenommenes PrP wurde mit dem Antikörper 3F4 auf einem Western Blot analysiert. Die Größenmarker 36 und 22 kDa sind jeweils links am Rand als Striche dargestellt.

Wildtyp PrP (wt) und N180Q sind auf dem Western Blot nicht detektierbar, da diese Konstrukte, wie zu erwarten, auf Grund einer GPI-Verankerung nicht sekretiert und folglich von heterologen Zellen nicht aufgenommen werden können (Abb. 20). Im Gegensatz dazu kann sekretiertes T182A, ebenso wie sekretiertes M204S (Winklhofer *et al.* 2003), von heterologen Zellen wieder aufgenommen werden, wie aus der Detektierung beider Mutanten in der unlöslichen (P) Fraktion hervorgeht.

Um sicherzustellen, dass T182A nicht mit der Zelloberfläche der heterologen Zellen assoziiert ist sondern tatsächlich internalisiert wurde, wurde eine indirekte Immunfluoreszenz in permeabilisierten und nicht-permeabilisierten N2a-Zellen (vgl. Punkt 4.1.1.2) unter Verwendung des Antikörpers 3F4 durchgeführt. Zuvor wurden die Zellen analog zur biochemischen Analyse mit dem Medium von N180Q- bzw. T182A-exprimierenden Zellen inkubiert. PrP kann nur in permeabilisierten Zellen visualisiert werden, die mit Medium von T182A-exprimierenden Zellen behandelt wurden (Abb. 21 A). In nicht-permeabilisierten Zellen hingegen ist T182A nicht detektierbar (Abb. 21 B). In Zellen, die mit Medium von N180Q-exprimierenden Zellen behandelt wurden, ist PrP wie erwartet nicht zu finden (Abb. 21 A, B). Diese Ergebnisse bestätigen, dass zuvor sekretiertes T182A nun intrazellulär lokalisiert ist und somit tatsächlich von heterologen Zellen internalisiert werden kann.

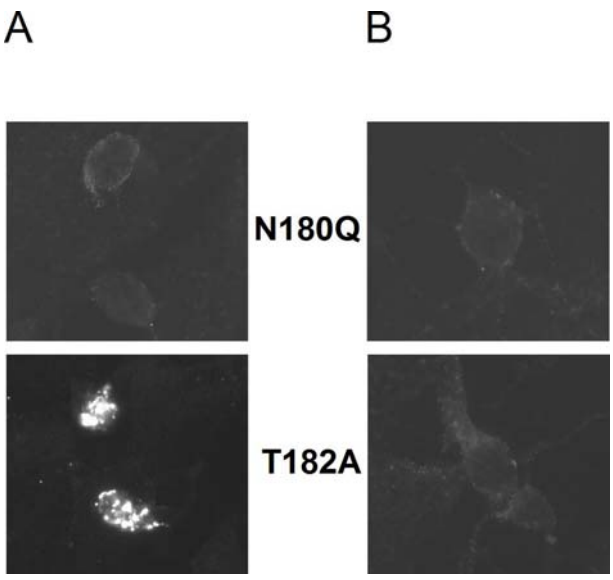

Abbildung 21: Zelluläre Lokalisierung von internalisiertem T182A in intakten, heterologen Zellen. Zellen wurden mit N180Q und T182A transfiziert und 3 Stunden in Serum-freiem Medium bei 37°C inkubiert. Das Zellkulturmedium wurde filtriert und auf untransfizierte, auf Glasplättchen kultivierte Zellen gegeben. Nach 48 Stunden wurde eine indirekte Immunfluoreszenz in permeabilisierten **(A)** und nicht-permeabilisierten **(B)** Zellen mit dem 3F4-Antikörper durchgeführt.

4.1.4 Missgefaltetes T182A unterliegt keiner ER-assoziierten Degradierung

Die bisherigen Resultate haben eine Missfaltung von T182A im ER und eine anschließende Sekretion aufgezeigt. Als nächstes sollte geklärt werden, ob und gegebenenfalls in welchen Kompartimenten T182A degradiert werden kann.
Im ER können missgefaltete Proteine durch die ER-assoziierte Degradierung (ERAD) eliminiert werden (siehe Punkt 1.3.2). Dieser Degradierungsweg beinhaltet die Erkennung der missgefalteten Proteine, den retrograden Transport aus dem ER in das Zytosol und eine anschließende Degradierung durch das Proteasom. Experimentell wird die ERAD mit Hilfe des proteasomalen Inhibitors MG132 analysiert. Proteine, die über diesen Degradierungsweg abgebaut werden können, akkumulieren nach einer Behandlung mit MG132, was durch eine Zunahme der Intensität der Proteinbande auf dem SDS-Gel angezeigt wird.
Um zu untersuchen, ob T182A über eine ERAD eliminiert werden kann, wurden transfizierte N2a-Zellen mit MG132 behandelt. Es wurde zunächst eine metabolische Markierung mit anschließender Immunpräzipitation durchgeführt. Als Kontrolle wurde eine PrP-Mutante hinzugezogen, die keine N-terminale ER-Signalsequenz besitzt und daher ausschließlich im Zytosol lokalisiert ist (Heske *et al.* 2004). Da diese zytosolische Form (zyto PrP) rasch proteasomal degradiert wird, ist zyto PrP in der *chase*-Phase nicht mehr detektierbar (Abb. 22 A, -MG132, *chase*). Nach Behandlung mit MG 132 wird zyto PrP jedoch aufgrund der nun ausbleibenden Degradierung durch das Proteasom stabilisiert (Abb. 22 A, +MG132, *chase*). Im Gegensatz dazu nimmt die Intensität der Proteinbande von T182A nach Inkubation mit MG132 in der *chase*-Phase nicht zu. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass missgefaltetes T182A nicht über eine ERAD abgebaut wird.
Um die Resultate der Immunpräzipitation zu bestätigen, wurde die Auswirkung einer proteasomalen Inhibierung zusätzlich unter *steady state*-Bedingungen in SH-SY5Y-Zellen untersucht. Hierfür wurden die transfizierten Zellen mit MG132 inkubiert, lysiert und mittels eines Western Blots analysiert. Unter diesen Bedingungen kann zyto PrP aufgrund seiner raschen Degradierung erst nach proteasomaler Inhibierung detektiert werden (Abb. 22 B, +MG 132). Im Gegensatz dazu bleiben die relativen

Proteinmengen von Wildtyp PrP (wt) und T182A, wie erwartet, nach Behandlung mit MG132 unverändert.

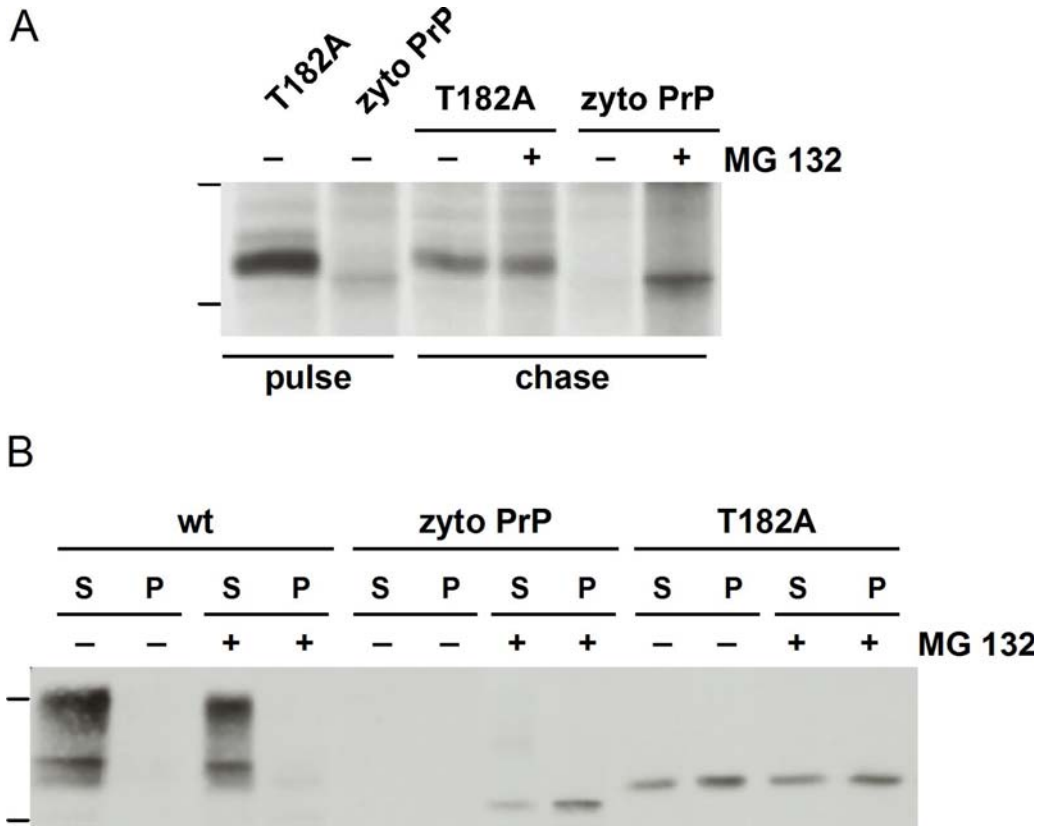

Abbildung 22: T182A wird nicht durch das Proteasom degradiert. N2a- und SH-SY5Y-Zellen wurden mit wt, T182A und zyto PrP transfiziert. **(A)** N2a-Zellen wurden 30 Minuten metabolisch mit [^{35}S]-Methionin markiert und direkt analysiert (*pulse*) oder nach 2-stündiger Inkubation mit frischem Medium (*chase*). Ein Teil der Zellen wurde während der *pulse*- und *chase*-Phase mit 50 µM MG132 versetzt. **(B)** SH-SY5Y-Zellen wurden 3 Stunden mit 30 µM MG132 inkubiert oder unbehandelt belassen. PrP in der löslichen (S) und unlöslichen (P) Fraktion wurde mittels Western Blot analysiert. Die Größenmarker 36 und 22 kDa sind jeweils links am Rand als Striche dargestellt.

Ein weiterer Degradierungsweg besteht über einen lysosomalen Proteinabbau. Um zu untersuchen, ob T182A in Lysosomen degradiert werden kann, wurden transfizierte SH-SY5Y-Zellen vor der Western Blot Analyse mit dem lysosomalen Inhibitor Bafilomycin behandelt. Es ist bekannt, dass Wildtyp PrP (wt) lysosomal abgebaut wird (siehe Punkt 1.2.4), was sich in einer Stabilisierung der Proteinbanden nach einer Inkubation mit Bafilomycin zeigt (Abb. 23, +Baf). Die zytosolische PrP-Form (zyto PrP) dagegen bleibt aufgrund der bestehenden proteasomalen Degradierung nicht detektierbar. Die relative Proteinmenge von T182A konnte ähnlich wie bei Wildtyp

PrP nach Behandlung mit Bafilomycin deutlich erhöht werden. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die missgefaltete Mutante T182A ähnlich wie Wildtyp PrP nicht über eine ERAD, sondern über eine lysosomale Degradierung abgebaut werden kann.

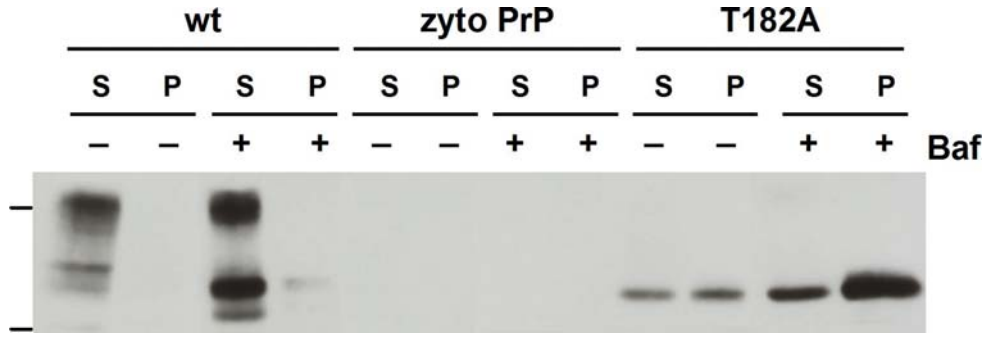

Abbildung 23: T182A wird in lysosomalen Kompartimenten degradiert. Transient transfizierte SH-SY5Y-Zellen wurden 16 Stunden mit 1µM Bafilomycin (Baf) inkubiert oder unbehandelt belassen. PrP wurde in der löslichen (S) und unlöslichen (P) Fraktion mittels Western Blot analysiert. Die Größenmarker 36 und 22 kDa sind jeweils links am Rand als Striche dargestellt.

4.1.5 Eine korrekte Faltung der globulären C-terminalen Domäne von PrP ist für die komplexe Glykosilierung und Anheftung des GPI-Ankers notwendig

Die vergleichende Analyse hat ergeben, dass zwei unterschiedliche Mutationen (T182A und N180Q), die jeweils die erste Akzeptorstelle für die N-Glykane zerstören, verschiedene Phänotypen aufweisen: während N180Q ähnliche posttranslationale Modifikationen wie Wildtyp PrP erhält, beeinflusst die pathogene Mutation T182A massiv die Faltung und Maturierung von PrP, wobei dies offenbar nicht auf den Verlust der Glykosilierungsstelle zurückzuführen ist. Im Folgenden soll die Ursache für die Missfaltung und unvollständige Maturierung von T182A geklärt werden.

4.1.5.1 Die Seitenkette von Threonin 183 stabilisiert den hydrophoben Core der globulären C-terminalen Domäne

Aus Analysen der NMR-Struktur von rekombinantem PrP (Riek *et al.* 1998) geht hervor, dass die Seitenkette von Threonin an der Stelle 183 (T183, entspricht T182 der Maus-Sequenz) Wasserstoffbrückenbindungen sowohl mit der Carbonylgruppe des Cysteins an der Stelle 179 (C179) als auch mit der Amidgruppe des Tyrosins an der Stelle 162 (Y162) ausbildet (Abb. 24 A, B). Der so entstehende, polare Kontakt zwischen der zweiten α-Helix (α2) und dem zweiten β-Strang (β2) trägt höchstwahrscheinlich zur Ausrichtung und Stabilisierung der β-Faltblattstruktur im Prion-Protein bei (Abb. 24 B). Es liegt also nahe anzunehmen, dass dieser Kontakt einen wichtigen Beitrag zur Stabilisierung des hydrophoben Cores der globulären Domäne von PrP leistet. Da durch die Aminosäuresubstitution T183A diese Interaktionen entscheidend geschwächt würden, könnte dies eine Destabilisierung des hydrophoben Cores zur Folge haben. Diese Hypothese wird auch durch *in vitro*-Analysen mit rekombinantem PrP unterstützt, da eine signifikant verminderte, thermodynamische Stabilität von T183A nachgewiesen werden konnte (Liemann und Glockshuber 1999).

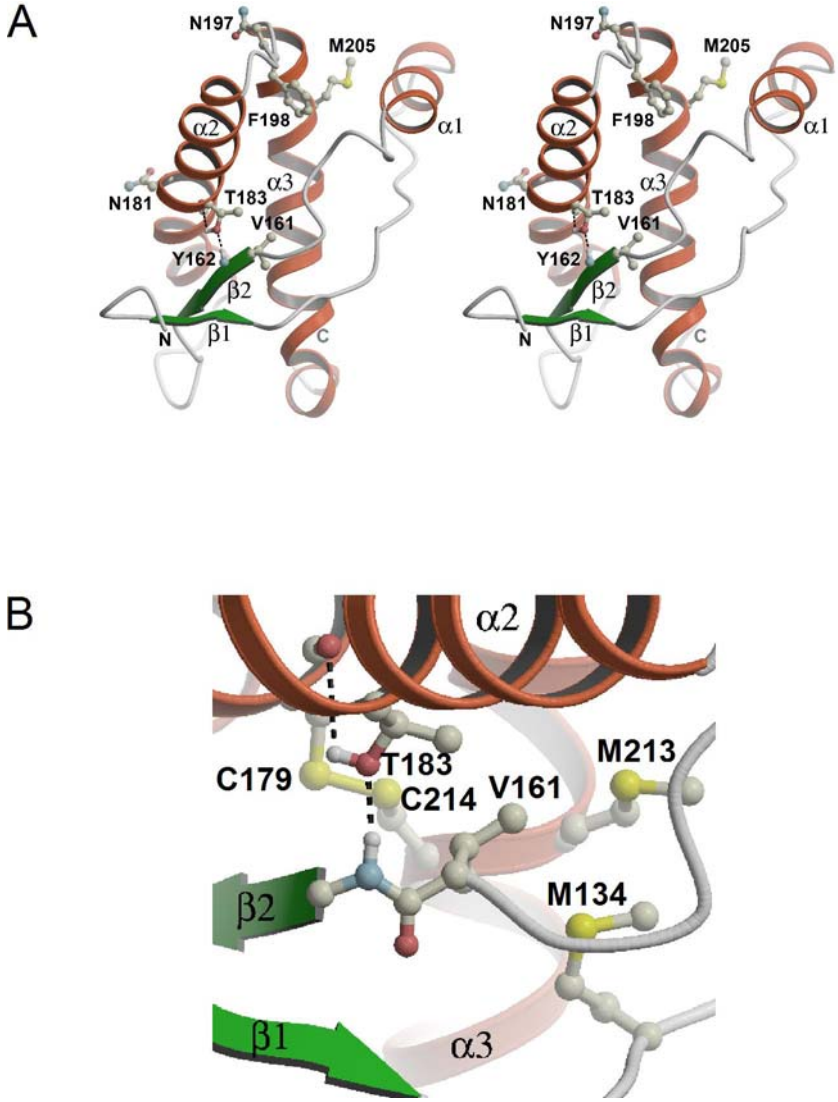

Abbildung 24: Die Seitenketten von Threonin 183, Phenylalanin 198, Valin 161 und Methionin 205 stabilisieren den hydrophoben Core der globulären, C-terminalen Domäne von PrP. Die Strukturen wurden mit dem PDB-file 1AG2 (Riek *et al.* 1998) unter Verwendung der Programme Molscript (Kraulis 1991) und Raster 3D (Merrit und Bacon 1997) generiert. *Ball-and-stick*-Repräsentation der verschiedenen Seitenketten. **(A)** Stereorepräsentation der NMR-Struktur der C-terminalen Domäne von PrP als Ribbon-Diagramm. Valin 161 (V161), Phenylalanin 198 (F198) und Methionin 205 (M205) sind Komponenten des hydrophoben Cores. Threonin 183 (T183) verbindet die zweite α-Helix (α2) und das zweite β-Faltblatt (β2) durch eine Wasserstoffbrückenbindung (gestrichelte Linie). N181 und N197: Asparagine innerhalb der beiden Akzeptorstellen für die N-Glykane; Kohlenstoff-, Stickstoff-, Sauerstoff- und Schwefel-Atome: grau, blau, rot und gelb; N: N-Terminus von PrP; C: C-Terminus von PrP. **(B)** Vergrößerte Darstellung der hydrophoben Tasche, welche die Seitenkette von V161 umgibt. Die Reste Methionin 134 (M134), Methionin 213 (M213), Cystein 214 (C214) und V161 bilden einen Teil des hydrophoben Cores. Farbcode wie bei (A).

4.1.5.2 Eine Destabilisierung des hydrophoben Cores verhindert die komplexe Glykosilierung und Anheftung des GPI-Ankers

Basierend auf den Resultaten der NMR- und *in vitro*-Analysen (Riek *et al.* 1998; Liemann und Glockshuber 1999), sollte als nächstes untersucht werden, ob die in neuronalen Zellen vorliegende Missfaltung von T182A (vgl. Punkt 4.1.2) in einer Destabilisierung des hydrophoben Cores von PrP begründet ist. Dazu wurden zwei neue Punktmutanten (V160S und V160W) generiert, die ähnlich wie T182A zu einer Destabilisierung des hydrophoben Cores führen könnten (Abb. 25).

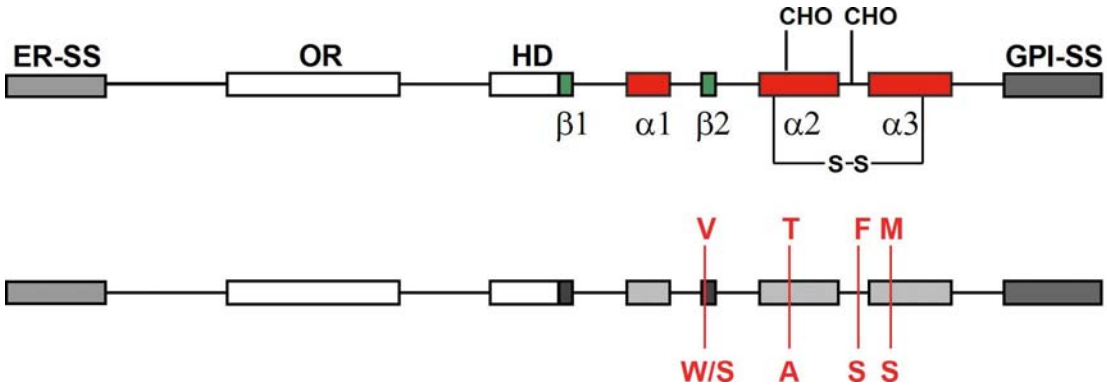

Abbildung 25: Schematische Darstellung von Wildtyp-PrP (oben) und der Punktmutationen V160W, V160S, T182A, F197S und M204S (unten). Die Aminosäurennummerierung entspricht dem Maus-PrP. ER-SS: ER-Signalsequenz; OR: Oktarepeats; HD: hydrophobe Domäne; α1-3: α-Helix 1-3; β1, 2: β-Faltblatt 1, 2; CHO: Glykosilierungsstellen; S-S: Disulfidbrücke; GPI-SS: GPI-Signalsequenz.

Die NMR-Struktur von PrP verdeutlicht, dass sich die Seitenkette von Valin 161 (entspricht V160 der Maus-Sequenz) tief verborgen im hydrophoben Core zwischen α2, α3 und β2 befindet (Riek *et al.* 1998). Somit wird die Seitenkette von Valin 161 (V161) von einer hydrophoben Tasche umgeben (siehe Abb. 24 B). Die beiden Punktmutationen innerhalb von β2 (V160S und V160W) sollten also die starken hydrophoben Interaktionen mit den beiden α-Helices schwächen, im Fall der Aminosäuresubstitution durch das sperrige Tryptophan (V160W) gar komplett aufheben.

V160S und V160W wurden in N2a-Zellen exprimiert und analog zu den zuvor für T182A beschriebenen Ansätzen analysiert. Zunächst wurde unter Verwendung von Endo H der Status der Glykosilierung untersucht (vgl. Punkt 4.1.1.1). Es zeigt sich,

dass V160W vollständig und V160S überwiegend Endo H-sensitiv sind (Abb. 26 A, +Endo H). Die Mutanten erhalten demnach ausschließlich (V160W) bzw. hauptsächlich (V160S) Core Glykane. Als nächstes wurde eine mögliche Sekretion untersucht (vgl. Punkt 4.1.1.3). Wie aus der Western Blot Analyse der Zellkulturfraktion (Medium) hervorgeht, werden beide Mutanten effizient in das Zellkulturmedium sekretiert (Abb. 26 B). V160S und V160W ziehen also zellbiologisch einen ähnlichen Phänotyp nach sich wie die pathogene Mutante T182A: beide Mutanten werden nicht (V160W) bzw. kaum (V160S) komplex glykosiliert und offenbar aufgrund eines fehlenden GPI-Ankers sekretiert.

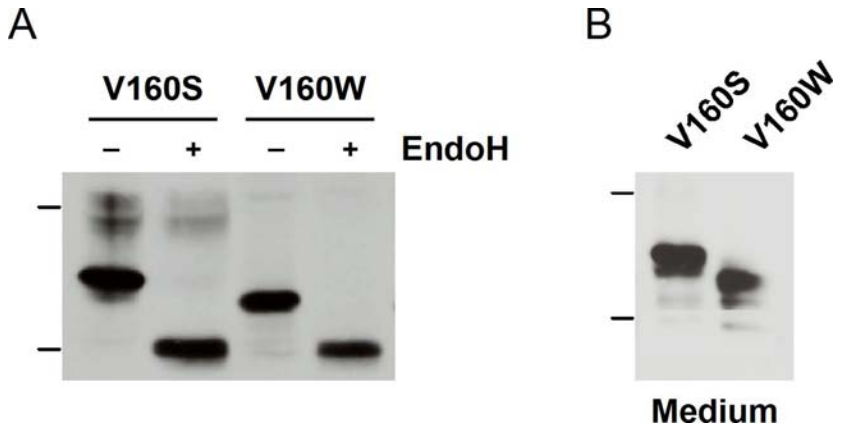

Abbildung 26. Destabilisierung des hydrophoben Cores der C-terminalen Domäne von PrP beeinflusst die komplexe Glykosilierung und Anheftung des GPI-Ankers. Die Konstrukte V160S und V160W wurden transient in N2a-Zellen transfiziert. **(A)** Destabilisierung des hydrophoben Cores beeinflusst die komplexe Glykosilierung. Das Zelllysat wurde in zwei Aliquots aufgetrennt, wovon das eine mit und das andere ohne Endo H inkubiert wurde. PrP wurde mittels Western Blot detektiert. **(B)** Destabilisierung des hydrophoben Cores beeinflusst die Anheftung des GPI-Ankers. Die transfizierten Zellen wurden 3 Stunden bei 37°C in Serum-freiem Medium inkubiert. PrP im Zellkulturmedium (Medium) wurde mittels Western Blot analysiert. Die Größenmarker 36 und 22 kDa sind jeweils links am Rand als Striche dargestellt.

Die Übertragung des vorgeformten GPI-Ankers erfolgt im ER an Serin 231 des Proteins, wobei die hydrophobe C-terminale GPI-Signalsequenz (GPI-SS) abgespalten wird (vgl. Punkt 1.3.1). Um zu untersuchen, ob der fehlende GPI-Anker der Mutanten in einer ungeschnittenen GPI-SS begründet ist, wurde das Konstrukt V160W ΔGPI hergestellt, bei welchem die GPI-SS (Aminosäuren 230-254) deletiert ist. Die transfizierten N2a-Zellen wurden metabolisch markiert und PrP wurde anschließend immunpräzipitiert. V160W ΔGPI ist, ebenso wie V160W, Endo H-sensitiv, liegt also auch als High Mannose Form vor (Abb. 27 A). Auffallend ist

jedoch die geringfügig höhere elektrophoretische Mobilität von V160W ΔGPI gegenüber V160W, welche deutlicher in der *chase*-Phase (Abb. 27 B) zu erkennen ist. Der geringfügige Größenunterschied zwischen beiden Mutanten lässt darauf schließen, dass die C-terminale GPI-SS von V160W nicht abgeschnitten wird. Andernfalls müssten beide Mutanten dieselbe Größe besitzen.

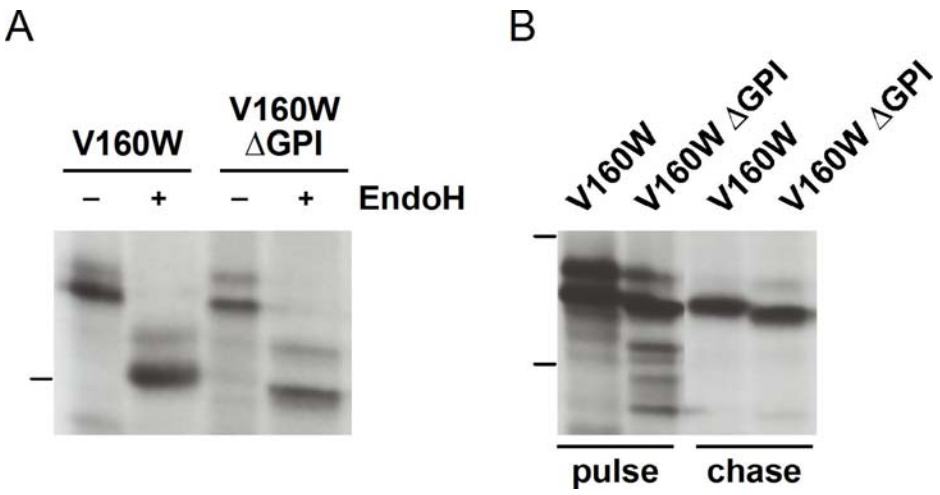

Abbildung 27: Die Mutante V160W hat eine ungeschnittene GPI-Signalsequenz. V160W- und V160W ΔGPI- exprimierende N2a Zellen wurden 30 Minuten mit [^{35}S] metabolisch markiert und mit dem 3F4 Antikörper immunpräzipitiert. **(A)** Die Produkte der Immunpräzipitation wurden in zwei Aliquots aufgeteilt, mit oder ohne Endo H inkubiert und auf einem SDS-Gel analysiert. **(B)** Die Zellen wurden entweder direkt analysiert (*pulse*) oder zuvor eine weitere Stunde in frischem Medium inkubiert (*chase*). Die Größenmarker 36 und 22 kDa sind jeweils links am Rand als Striche dargestellt.

Diese mechanistische Analyse gibt zusammen mit vorangegangenen NMR- und *in vitro*-Daten (Riek *et al.* 1998; Liemann und Glockshuber 1999) starke Hinweise darauf, dass die in neuronalen Zellen vorliegende Missfaltung sowie unvollständige Maturierung von T182A (vgl. Punkt 4.1.2) Folgen einer Destabilisierung des hydrophoben Cores von PrP sind. Weitere Mutationen, die zu einer Destabilisierung der Tertiärstruktur führen könnten (V160W und V160S), verhindern ähnlich wie T182A die Umwandlung von High Mannose Glykanen in komplexe Strukturen, sowie die Anheftung des GPI-Ankers. Letzteres resultiert in einer Sekretion der Mutanten. Eine korrekte Proteinfaltung ist also für die posttranslationalen Modifikationen von PrP entscheidend.

4.1.6 Eine weitere pathogene Mutation (F198S) beeinträchtigt die Maturierung und Faltung des Prion-Proteins

Nachdem die eingehende Untersuchung der Faltung und Biogenese der pathogenen Mutante T182A experimentelle Hinweise darauf gab, dass eine möglicherweise bestehende Destabilisierung des hydrophoben Cores zu einer hereditären Prion-Erkrankung führen kann, wurde nach näherer Betrachtung weiterer krankheitsassoziierter PrP-Mutanten die pathogene Mutante F198S, von welcher ähnliche NMR- und *in vitro*-Daten vorlagen wie im Fall von T183A, in die Analyse miteinbezogen. So könnte gemäß der NMR-Struktur die Aminosäuresubstitution von Phenylalanin durch Serin an der Stelle 198 (F198S, entspricht F197S der Maus-Sequenz) eine Destabilisierung des hydrophoben Cores nach sich ziehen (siehe Abb. 24 A, 25), was auch aufgrund der verminderten thermodynamischen Stabilität von rekombinantem F198S anzunehmen ist (Liemann und Glockshuber 1999; Vanik und Surewicz 2002).

Folglich wurde F197S einer ähnlichen Analyse wie T182A unterzogen. Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass F197S einen ähnlichen Phänotyp in N2a-Zellen besitzt wie T182A. So ist F197S auch Endo H-sensitiv (Abb. 28 A), erhält also High Mannose Glykane. Dennoch wird eine geringe Fraktion von F197S in komplexe Strukturen umgewandelt, wie an der oberen schwachen Proteinbande zu erkennen ist, welche auf der selben Höhe wie die komplexe Bande von Wildtyp PrP (wt) verläuft. Wie nach einem extrazellulären Verdau mit Trypsin (vgl. Punkt 4.1.1.2) zu erkennen ist, bleibt der relative Anteil von F197S, anders als bei Wildtyp PrP (wt), nahezu unverändert (Abb. 28 B), was darauf hindeutet, dass F197S nicht an der Plasmamembran lokalisiert ist. Die Western Blot Analyse der Zellkulturfraktion (Medium) zeigt, dass F197S aufgrund einer fehlenden GPI-Verankerung sekretiert wird (Abb. 28 C).

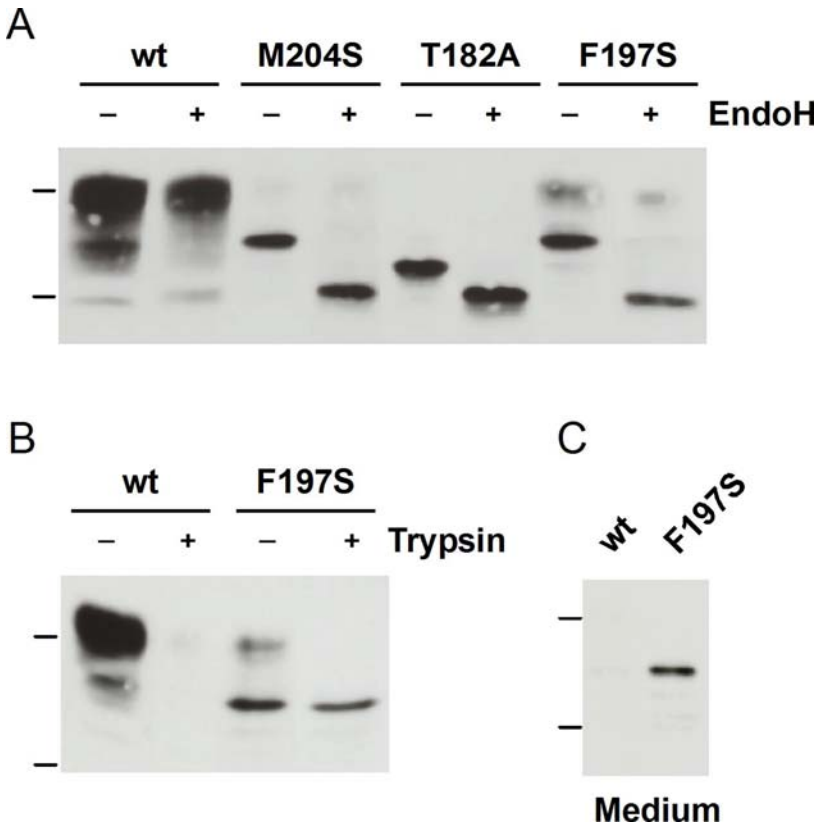

Abbildung 28: Die pathogene Mutante F197S erhält keine komplexe Glykosilierung, ist nicht membranverankert und wird sekretiert. (A) F197S erhält keine komplexe Glykosilierung. Transient transfizierte Zellen wurden lysiert und die Extrakte in zwei Aliquots aufgeteilt, mit oder ohne Endo H inkubiert und mittels Western Blot analysiert. **(B)** Der Hauptanteil von F197S ist nicht an der Plasmamembran lokalisiert. Lebende, transfizierte Zellen wurden bei 4°C mit Trypsin inkubiert, lysiert und PrP wurde mit Western Blot detektiert. **(C)** F197S wird sekretiert. Die transfizierten Zellen wurden 3 Stunden bei 37°C in Serum-freiem Medium inkubiert. PrP im Zellkulturmedium (Medium) wurde mittels Western Blot analysiert. Die Größenmarker 36 und 22 kDa sind jeweils links am Rand als Striche dargestellt.

Um zu untersuchen, ob die pathogene Mutation F197S zu einer Missfaltung von PrP führt, wurde ein proteolytischer Verdau mit Proteinase K (PK) durchgeführt (vgl. Punkt 4.1.2). Wie zuvor für T182A gezeigt (vgl. Abb. 19), ist auch F197S resistent gegenüber einer PK-Konzentration, die für eine komplette Degradierung von Wildtyp PrP (wt) ausreicht (Abb. 29). Diese Ergebnisse zeigen, dass die pathogene Mutation F197S ähnlich wie T182A eine Missfaltung und unvollständige Maturierung von PrP zur Folge hat.

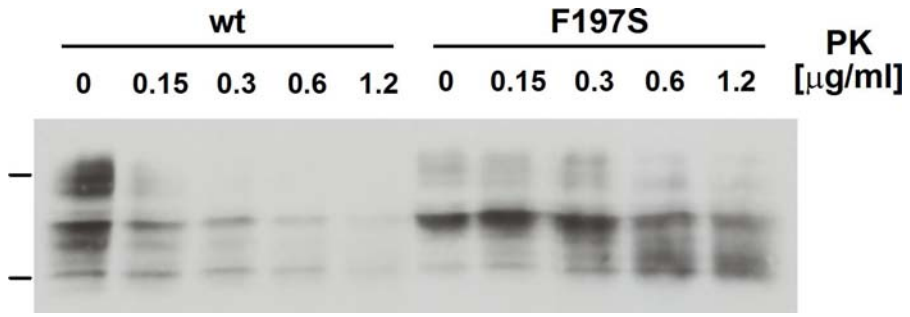

Abbildung 29: F197S ist partiell Protease-resistent. Proteinextrakte aus transient transfizierten Zellen wurden 30 Minuten mit den angegebenen Proteinase K (PK)-Konzentrationen bei 4°C versetzt. Verbleibendes PrP wurde mit Western Blot analysiert. Die Größenmarker 36 und 22 kDa sind jeweils links am Rand als Striche dargestellt.

4.1.7 Zusammenfassung

Prion-Erkrankungen können beim Menschen durch Mutationen im Prion-Protein Gen hervorgerufen werden. Die Missfaltung des zellulären Prion-Proteins (PrP^C) spielt eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese. Um Einblicke in den Mechanismus der Missfaltung zu gewinnen, wurden in der vorliegenden Arbeit zwei unterschiedliche humanpathogene Mutationen (T183A und F198S) untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass die Mutationen die Faltung und Biogenese von PrP beeinträchtigen. Beide Mutanten zeichnen sich folgendermaßen aus (vgl. Abb. 30):

- Import in das ER
- Core Glykosilierung
- Missfaltung im ER
- fehlende komplexe Glykosilierung
- fehlende Anheftung des GPI-Ankers
- keine ER-assoziierte Degradierung
- effiziente Sekretion
- Wiederaufnahme durch benachbarte Zellen
- lysosomale Degradierung

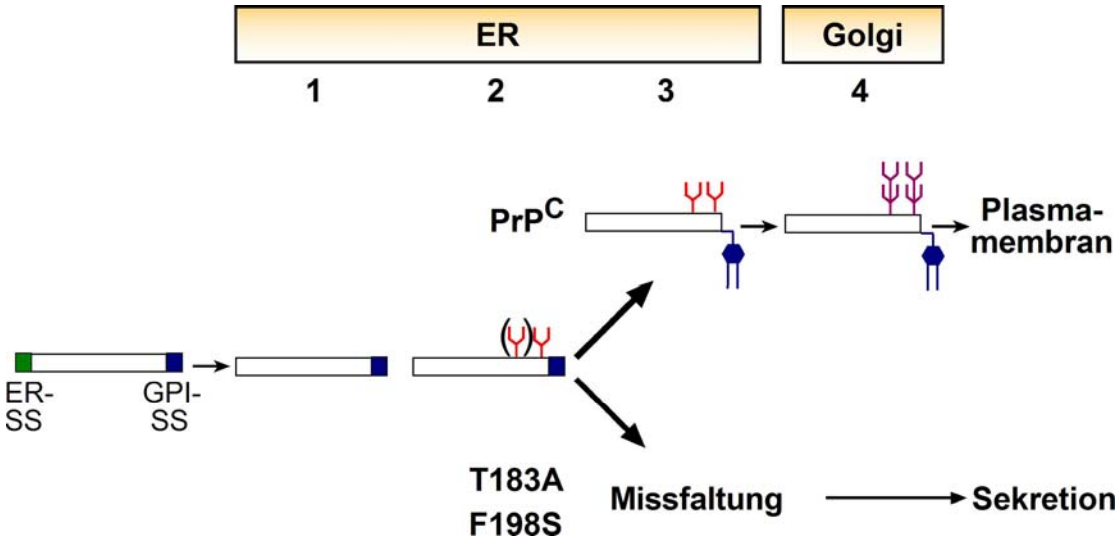

Abbildung 30: Zwei unterschiedliche pathogene Mutationen beeinflussen die Faltung und Maturierung von PrP. Schematische Darstellung der Biogenese von PrP^C (1-4) im Vergleich zu der von T183A und F198S. **(1)** Abspaltung der N-terminalen ER-Signalsequenz (ER-SS). **(2)** Addition von Core Glykanen. **(3)** Abspaltung der C-terminalen GPI-Signalsequenz (GPI-SS) und Transfer des GPI-Ankers. **(4)** Terminale Prozessierung der Glykane und Lokalisierung an der Plasmamembran. Im Gegensatz zu PrP^C nehmen T183A und F198S im ER eine missgefaltete Konformation an. Die Schritte (3) und (4) werden unterbunden. Beide Mutanten werden als High Mannose Formen sekretiert. Die Klammer um das erste Core Glykan (2) soll das Fehlen der ersten Glykosilierungsstelle im Fall von T183A andeuten.

In der zu Beginn durchgeführten, vergleichenden Analyse zwischen den monoglykosilierten Mutanten T182A, N180Q und N196Q (Aminosäure-nummerierung gemäß Maus-PrP) konnte geklärt werden, dass der Verlust einer Glykosilierungsstelle keinen Einfluss auf die Faltung und Maturierung von PrP besitzt. Die nachfolgende mechanistische Studie gibt zusammen mit vorangegangenen NMR- und *in vitro*-Daten (Riek *et al.* 1998; Liemann und Glockshuber 1999) starke Hinweise darauf, dass pathogene Mutationen (T183A und F198S) zu einer Destabilisierung des hydrophoben Cores von PrP führen können, was offenbar eine Missfaltung von PrP zur Folge hat. Außerdem konnte ein Zusammenhang zwischen der Proteinfaltung und den posttranslationalen Modifikationen von PrP festgestellt werden.

4.2 Wirkungsmechanismus einer Anti-Prion-Substanz: Missfaltung des Prion-Proteins an der Plasmamembran bewirkt Internalisierung und Degradierung

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wird der Wirkungsmechanismus der Anti-Prion-Substanz Suramin im Zellkulturmodell untersucht.
In einer vorangegangenen Analyse wurde gezeigt, dass Suramin (vgl. Abb. 11) eine Missfaltung von PrP^{C} induziert und mit der Propagierung von PrP^{Sc} in Scrapie-infizierten (ScN2a) N2a-Zellen interferiert sowie den Ausbruch der Prion-Erkrankung in Scrapie-infizierten Mäusen verzögert (Gilch *et al.* 2001).
Darauf aufbauend wurde in der vorliegenden Studie der Effekt von Suramin auf die Biogenese von PrP^{C} in neuronalen Zellen untersucht. Unter Verwendung verschiedener Deletionsmutanten wurde analysiert, welche Domänen von PrP^{C} an einer Suramin-induzierten Missfaltung beteiligt sind und in welchen Zellkompartimenten diese stattfindet. Ferner wurde geprüft, ob missgefaltetes PrP^{C} – anders als infektiöses PrP^{Sc} – in neuronalen Zellen degradiert werden kann. Ein besseres Verständnis des Wirkungsmechanismus von Anti-Prion-Substanzen kann wesentlich dazu beitragen, effizientere Anti-Prion-Strategien zu entwickeln.

4.2.1 Suramin bewirkt eine Missfaltung von PrP^{C} in verschiedenen Zelllinien

Zu Beginn der vorliegenden Studie sollte der Befund aus einer früheren Analyse – eine Missfaltung von PrP^{C} durch die Wirkung von Suramin (Gilch *et al.* 2001) – bestätigt werden. Um eine Suramin-induzierte Missfaltung von PrP^{C} in unterschiedlichen neuronalen Zelllinien nachzuweisen, wurde die Proteinlöslichkeit sowohl in murinen (N2a) als auch in humanen (SH-SY5Y) Neuroblastomzellen analysiert. Hierfür wurden die Zellen mit Wildtyp PrP (wt, entspricht dem Maus-PrP^{C}) transfiziert und mit verschiedenen Konzentrationen von Suramin inkubiert. Das Zelllysat wurde zentrifugiert und in eine Detergenz-lösliche und -unlösliche Fraktion aufgeteilt. Die Proben wurden mittels Western Blot analysiert. Missgefaltete Proteine zeichnen sich durch ein verändertes Löslichkeitsprofil aus.

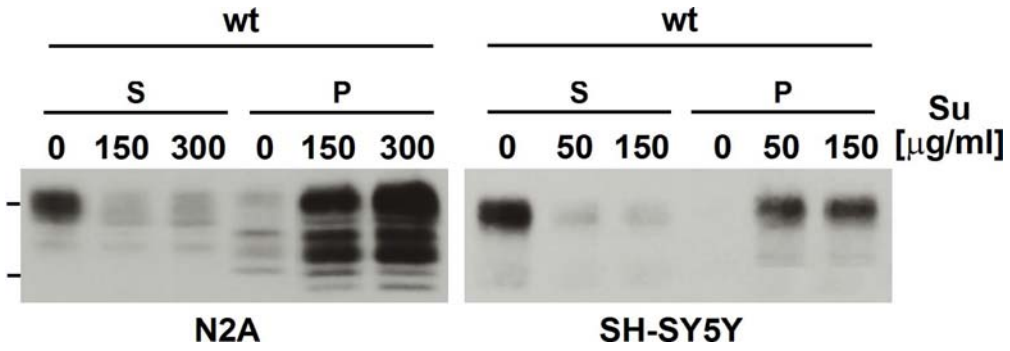

Abbildung 31: Suramin induziert eine Missfaltung von PrP^C. N2a- und SH-SY5Y-Zellen wurden transient mit Wildtyp PrP (wt) transfiziert und 16 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen von Suramin (Su) inkubiert. Nach der Lyse und Zentrifugation wurde in der Detergenz-löslichen (S) bzw. Detergenz-unlöslichen (P) Fraktion vorhandenes PrP^C mittels Western Blot mit dem 3F4-Antikörper detektiert. Die Größenmarker 36 und 22 kDa sind jeweils links am Rand als Striche dargestellt.

Wildtyp PrP (wt) ist in Detergenz löslich und daher, wie zu erwarten, ausschließlich in der löslichen (S) Fraktion zu finden (Abb. 31). Nach Behandlung der Zellen mit Suramin nimmt PrP^C jedoch sowohl in N2a- als auch in SH-SY5Y-Zellen eine Detergenz-unlösliche (P) Konformation an. Es konnte bestätigt werden, dass Suramin in beiden Zelllinien eine Missfaltung von PrP^C induziert.

4.2.2 Der Status der Glykosilierung und der Typ des Membranankers haben keinen Einfluss auf die Suramin-induzierte Missfaltung

Posttranslationale Modifizierungen von PrP^C (vgl. Abb. 5) umfassen zwei komplexe N-Glykosilierungen (Endo *et al.* 1989; Haraguchi *et al.* 1989; Rudd *et al.* 1999; Stimson *et al.* 1999) und die Anheftung eines GPI-Ankers (Stahl *et al.* 1987).
Um zu untersuchen, ob eine komplexe Glykosilierung für die Suramin-induzierte Missfaltung notwendig ist, wurde die terminale Glykosilierung der Core Glykane mit Desoxymannojirimycin (DMJ), einem Inhibitor der α-1,2-Mannosidase des ERs, gehemmt. DMJ führt direkt nach dem erfolgreichem Ablauf des Calnexin-Zyklus (vgl. Abb. 9, Schritt 3) zu einem Prozessierungsstopp der Glykane. Dadurch entstehen High Mannose Formen, die nicht weiter modifiziert werden können. Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass High Mannose Formen von PrP^C dennoch einen GPI-Anker erhalten und somit an der Plasmamembran lokalisiert sind (Winklhofer *et al.* 2003).

Mit Wildtyp PrP transfizierte N2a-Zellen wurden mit DMJ und Suramin bzw. jeweils mit einer der beiden Substanzen inkubiert oder zur Kontrolle unbehandelt belassen. Die Western Blot Analyse verdeutlicht, dass die nach Behandlung mit DMJ entstehende High Mannose Form, ebenso wie komplex glykosiliertes PrP^C, unter Einwirkung von Suramin eine Detergenz-unlösliche (P) Konformation annimmt (Abb. 32).

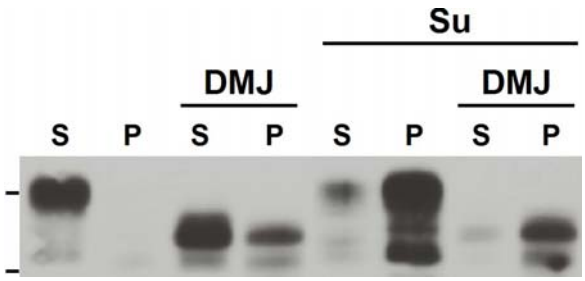

Abbildung 32: Der Status der Glykosilierung hat keinen Einfluss auf die Suramin-induzierte Missfaltung. Mit Wildtyp PrP transfizierte N2a-Zellen wurden 16 Stunden mit 10 µg/ml Desoxymannojirimycin (DMJ) und / oder 300 µg/ml Suramin (Su) inkubiert. Unbehandelte Zellen wurden parallel analysiert. In der Detergenz-löslichen (S) bzw. -unlöslichen (P) Fraktion vorhandenes PrP^C wurde mittels Western Blot detektiert. Die Größenmarker 36 und 22 kDa sind jeweils links am Rand als Striche dargestellt.

Um zu untersuchen, ob der Typ des Membranankers für die Suramin-induzierte Missfaltung ausschlaggebend ist, wurde eine Mutante hinzugezogen, die anstelle des GPI-Ankers am C-terminalen Ende von PrP^C einen heterologen CD4-Anker (PrP-CD4) besitzt. Dieses Konstrukt wird, ebenso wie Wildtyp PrP, komplex glykosiliert und ist an der Plasmamembran lokalisiert (Taraboulos *et al.* 1995; Winklhofer *et al.* 2003). N2a- und SH-SY5Y-Zellen wurden mit PrP-CD4 transfiziert und mit unterschiedlichen Konzentrationen von Suramin inkubiert. PrP-CD4 ist, ähnlich wie Wildtyp PrP (vgl. Abb. 31), in beiden Zelllinien nach Behandlung mit Suramin hauptsächlich in der Detergenz-unlöslichen (P) Fraktion detektierbar (Abb. 33).
Es lässt sich festhalten, dass weder der Status der Glykosilierung noch der Typ des Membranankers einen Einfluss auf die Suramin-induzierte Missfaltung von PrP^C besitzen.

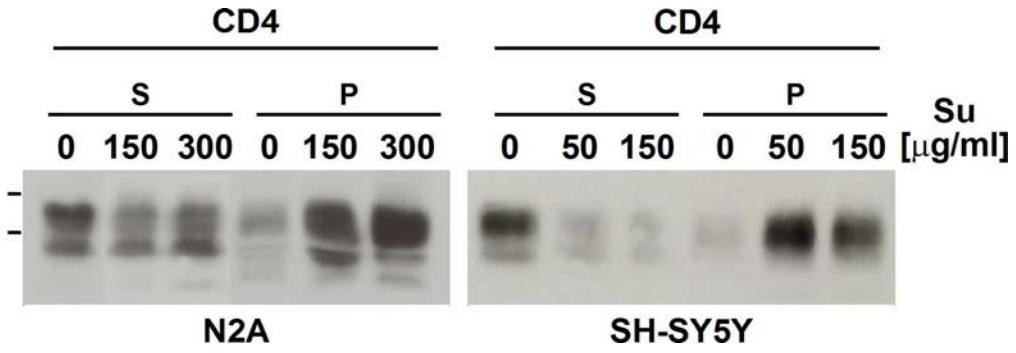

Abbildung 33. Der Typ des Membranankers hat keinen Einfluss auf die Suramin-induzierte Missfaltung. N2a- und SH-SY5Y-Zellen wurden transient mit PrP-CD4 (CD4) transfiziert und 16 Stunden mit ansteigender Konzentration von Suramin (Su) inkubiert. In der Detergenz-löslichen (S) bzw. -unlöslichen (P) Fraktion vorhandenes PrP^C wurde mittels Western Blot detektiert. Die Größenmarker 50 und 36 kDa sind jeweils links am Rand als Striche dargestellt.

4.2.3 Suramin-induzierte Missfaltung hängt vom proximalen Bereich der globulären C-terminalen Domäne des Prion-Proteins ab

Um Domänen von PrP^C zu identifizieren, die für die Suramin-induzierte Missfaltung notwendig sind, wurden zwei PrP-Mutanten mit unterschiedlich deletierten N-terminalen Bereichen hinzugezogen. Während die Deletion von PrP ΔN die Aminosäuren 27-89 erfasst, ist bei PrP Δ27-156 zusätzlich ein Teil des proximalen Bereichs der globulären C-terminalen Domäne deletiert, der die hydrophobe Domäne (HD), den ersten β-Strang (β1) und die erste α-Helix (α1) einschließt (Abb. 34). Aus vorangegangenen Analysen in N2a-Zellen ist hervorgegangen, dass PrP ΔN komplex glykosiliert wird, PrP Δ27-156 jedoch lediglich eine Core Glykosilierung erhält (Winklhofer *et al.* 2003; Heske *et al.* 2004).

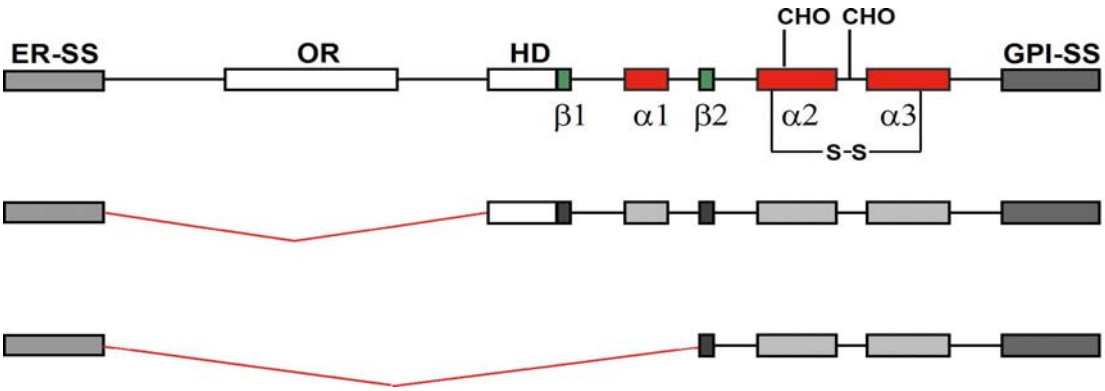

Abbildung 34: Schematische Darstellung von Wildtyp PrP (oben) und den Deletionsmutanten PrP ΔN (mittig) und PrP Δ27-156 (unten). Deletierte Bereiche sind mit roten Linien gekennzeichnet. ER-SS: ER-Signalsequenz; OR: Oktarepeats; HD: hydrophobe Domäne; α1-3: α-Helix 1-3; β1, 2: β-Faltblatt 1, 2; CHO: Glykosilierungsstellen; S-S: Disulfidbrücke; GPI-SS: GPI-Signalsequenz.

Die Suramin-induzierte Missfaltung von PrP^C ist unabhängig von intakten Zellen und wird somit auch *in vitro* unter Verwendung von Zellextrakten oder gereinigtem, rekombinatem PrP ausgelöst (Gilch *et al.* 2001).

Daher wurde die Wirkung von Suramin auf die Faltung der PrP-Deletionsmutanten mittels eines *in vitro*-Aggregationstests untersucht. Dazu wurden die transfizierten Zellen resuspendiert und ohne Zugabe von Detergenz durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen aufgebrochen. Die Zellsuspension wurde in Aliquots aufgeteilt, die mit bzw. ohne Zugabe von Suramin bei 4°C inkubiert und anschließend mit ionischem Detergenz lysiert wurden. Das Löslichkeitsprofil der verschiedenen PrP-Konstrukte wurde mittels Western Blot (Abb. 35 A) oder Immunpräzipitation (Abb. 35 B) analysiert. Die Ergebnisse bestätigen, dass Suramin auch *in vitro* eine Konformationsänderung von Wildtyp PrP (wt) bewirkt (Abb. 35 A, B). PrP ΔN ist nach einer Behandlung mit Suramin ebenfalls hauptsächlich in der Detergenz-unlöslichen (P) Fraktion zu finden (Abb. 35 A). Anders verhält es sich dagegen bei PrP Δ27-156. Diese Mutante verbleibt auch nach Inkubation mit Suramin ausschließlich in der Detergenz-löslichen (S) Fraktion (Abb. 35 B).

Aus dieser Analyse lässt sich schlussfolgern, dass Suramin-induzierte Missfaltung abhängig vom proximalen Bereich der globulären C-terminalen Domäne des Prion-Proteins ist.

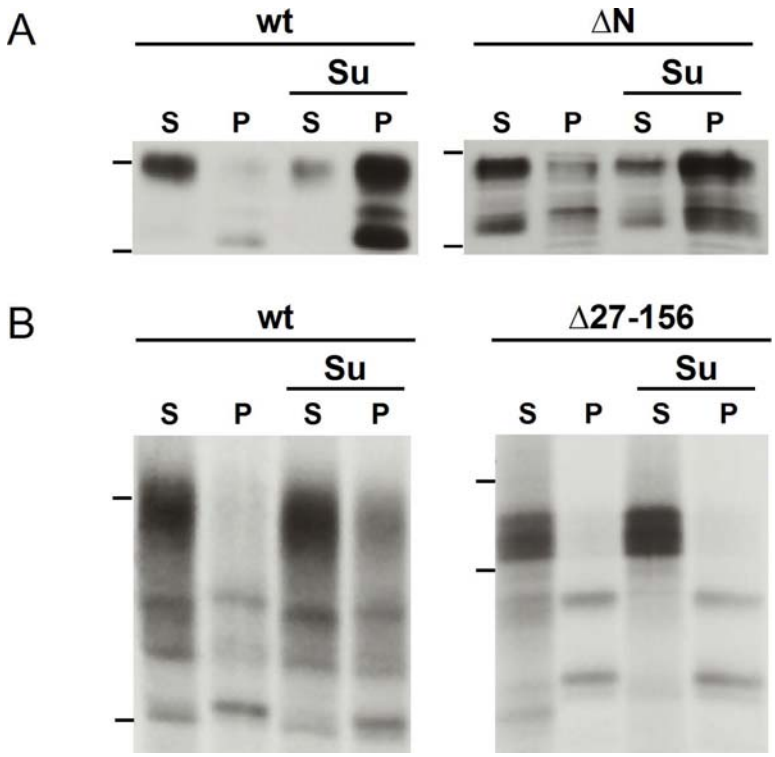

Abbildung 35: Suramin-induzierte Missfaltung von PrP^C ist abhängig vom proximalen Bereich der globulären C-terminalen Domäne. Transient transfizierte N2a-Zellen wurden in PBS resuspendiert und durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen aufgebrochen. Die Zellsuspension wurde in Aliquots aufgeteilt, die mit bzw. ohne Zugabe von 300 µg/ml Suramin (Su) 16 Stunden bei 4°C inkubiert wurden. Nach Zugabe von Detergenz wurden die Extrakte zentrifugiert. In der Detergenz-löslichen (S) bzw. -unlöslichen (P) Fraktion vorhandenes PrP^C wurde mittels Western Blot mit dem 3F4 Antikörper **(A)** oder Immunpräzipitation mit dem A7 Antikörper **(B)** detektiert. Die Größenmarker 36 und 22 kDa (wt und ΔN) bzw. 22 und 16 kDa (Δ27-156) sind jeweils links am Rand als Striche dargestellt.

4.2.4 Intrazelluläre Lokalisierung des missgefalteten Prion-Proteins hängt von seiner N-terminalen Domäne ab

Als nächstes sollte geklärt werden, in welchen Zellkompartimenten die Suramin-induzierte Missfaltung von Wildtyp PrP und PrP ΔN stattfindet. Um zu untersuchen, ob missgefaltetes PrP an der Zelloberfläche lokalisiert ist, wurden transfizierte Suramin-behandelte Zellen mit Trypsin inkubiert. Trypsin spaltet alle an der Zelloberfläche lokalisierte Proteine ab. Nach einer Western Blot Analyse mit dem 3F4-Antikörper kann an der Plasmamembran befindliches PrP im Zelllysat nicht mehr detektiert werden. Beide Konstrukte, Wildtyp PrP (wt) und PrP ΔN (Winklhofer *et al.* 2003), sind aufgrund ihrer Lokalisierung an der Zelloberfläche nach der Behandlung

mit Trypsin nicht mehr im Zelllysat detektierbar (Abb. 36 A, B, Trypsin). Unter alleiniger Einwirkung von Suramin sind beide Konstrukte, wie zuvor auch *in vitro* (vgl. Abb. 35) gezeigt, in der Detergenz-unlöslichen (P) Fraktion zu finden (Abb. 36 A, B, Su). Nach zusätzlicher Behandlung der Zellen mit Trypsin, bleibt jedoch ein erheblicher Teil von in der unlöslichen (P) Fraktion befindlichem Volllängen-PrP (wt) resistent gegenüber dem extrazellulären Verdau (Abb. 36 A, Su, Trypsin), während PrP ΔN vollständig verdaut wird (Abb. 36 B, Su, Trypsin).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass missgefaltetes PrP ΔN vollständig an der Plasmamembran lokalisiert ist, missgefaltetes Volllängen-PrP (wt) dagegen sich nur zum Teil an der Zelloberfläche befindet.

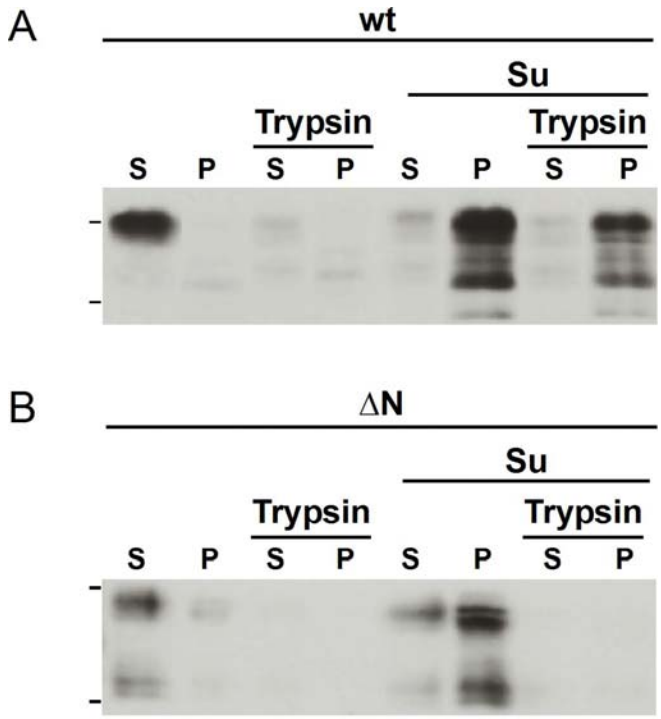

Abbildung 36: Lokalisierung von missgefaltetem PrP^C und PrP ΔN. (A) Missgefaltetes PrP^C ist nur zum Teil an der Plasmamembran lokalisiert. Mit Wildtyp PrP (wt) transfizierte N2a-Zellen wurden 16 Stunden mit 300 µg/ml Suramin (Su) inkubiert oder unbehandelt belassen. Die intakten Zellen wurden mit Trypsin behandelt während Kontrollzellen keinem Trypsin-Verdau unterzogen wurden. Nach Zelllyse wurde in der Detergenz-löslichen (S) bzw. -unlöslichen (P) Fraktion vorhandenes PrP^C mittels Western Blot detektiert. **(B)** Missgefaltetes PrP ΔN ist vollständig an der Plasmamembran lokalisiert. N2a-Zellen wurden transient mit PrP ΔN transfiziert und wie unter (A) beschrieben analysiert. Die Größenmarker 36 und 22 kDa sind jeweils links am Rand als Striche dargestellt.

Um die Möglichkeit auszuschließen, dass Wildtyp PrP lediglich aufgrund der Suramin-bedingten Konformationsänderung resistent gegenüber dem extrazellulären Trypsin-Verdau ist, wurden die transfizierten N2a-Zellen nach der Inkubation mit Suramin zusätzlich mit Trypsin verdaut, welches zur Permeabilisierung der Zellen zuvor mit einem nicht-ionischem Detergenz versetzt wurde. Die Western Blot Analyse der unlöslichen Fraktion verdeutlicht, dass missgefaltetes Volllängen-PrP (wt) ebenso wie PrP ΔN vollständig durch Trypsin degradiert werden kann, also nicht resistent gegenüber Trypsin ist (Abb. 37, +Trypsin / 0.1% Triton).

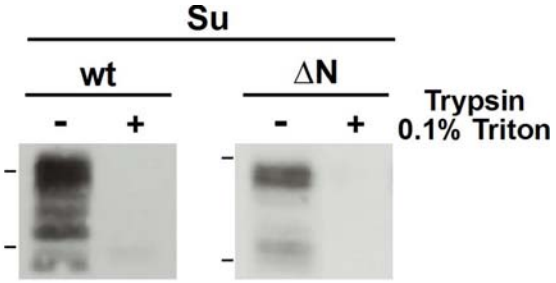

Abbildung 37: Eine Degradierung von missgefaltetem Wildtyp PrP ist durch Trypsin möglich. Transient transfizierte N2a-Zellen wurden 16 Stunden mit 300 µg/ml Suramin (Su) inkubiert. Zur Permeabilisierung der Zellen erfolgte eine Behandlung mit Trypsin, das zusätzlich mit 0.1 % Triton X-100 (+Trypsin / 0.1 % Triton) versetzt war. PrP in der Detergenz-unlöslichen Fraktion wurde mittels Western Blot analysiert. Die Größenmarker 36 und 22 kDa sind jeweils links am Rand als Striche dargestellt.

Zur näheren Untersuchung der zellulären Lokalisierung von missgefaltetem Wildtyp PrP und PrP ΔN wurde eine indirekte Immunfluoreszenz in permeabilisierten und nicht-permeabilisierten murinen (N2a-Zellen) sowie humanen (SH-SY5Y-Zellen) Neuroblastomzellen durchgeführt. In nicht-permeabilisierten Zellen kann lediglich PrP detektiert werden, das sich an der Zelloberfläche befindet, während in permeabilisierten Zellen eine Visualisierung von PrP sowohl außerhalb als auch innerhalb der Zellen möglich ist (vgl. Punkt 4.1.1.2). Die auf Glasplättchen kultivierten Zellen wurden mit Wildtyp PrP (wt), PrP ΔN und PrP-CD4 (siehe Punkt 4.2.2) transfiziert und mit Suramin inkubiert oder unbehandelt belassen. Bei allen Konstrukten zeigt sich in unbehandelten Zellen eine charakteristische Oberflächenlokalisierung von PrP (Abb. 38).

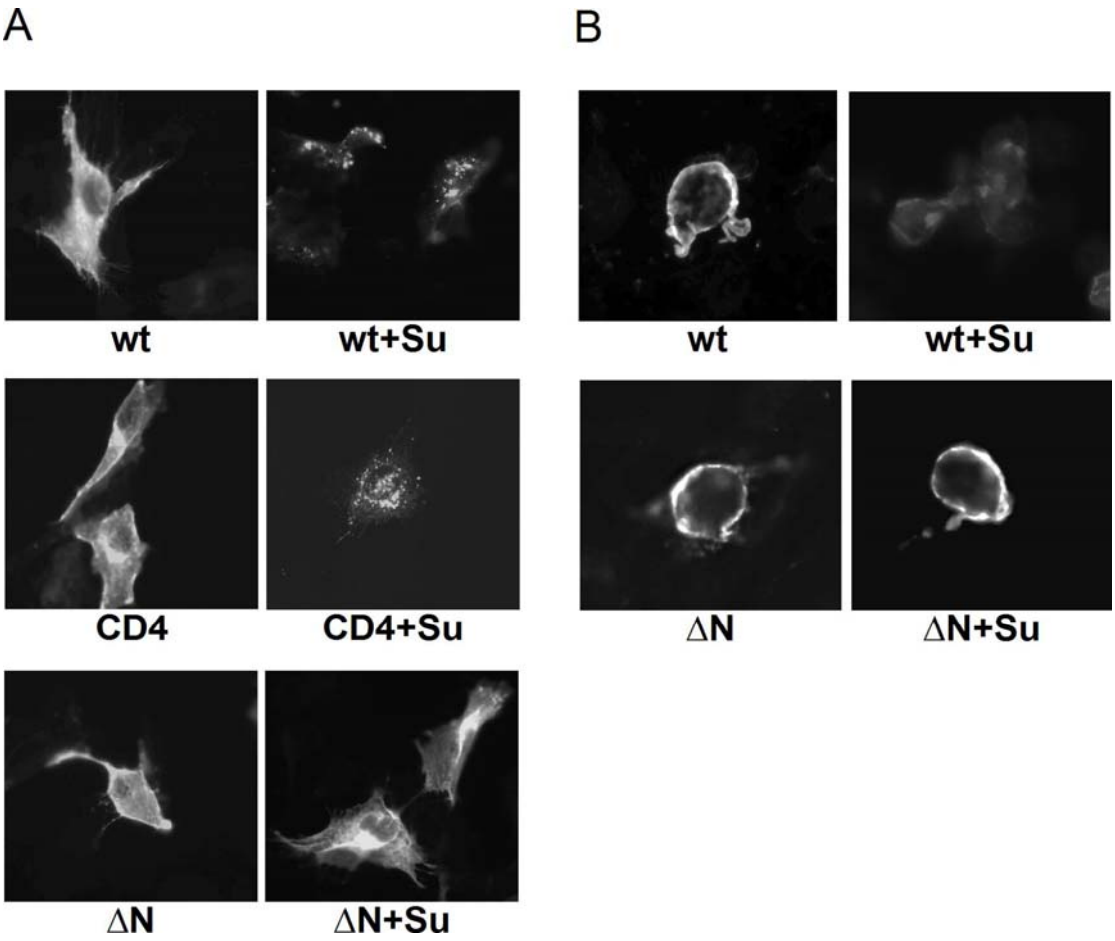

Abbildung 38: Intrazelluläre Lokalisierung von missgefaltetem PrP^C ist abhängig von der unstrukturierten N-terminalen Domäne. Zelluläre Lokalisierung von PrP in intakten Zellen. SH-SY5Y- **(A)** und N2a-Zellen **(B)** wurden auf Glasplättchen kultiviert, mit den Konstrukten wt, CD4 und ΔN transfiziert und 16 Stunden mit 300 µg/ml Suramin inkubiert. Die Lokalisierung von PrP wurde durch indirekte Immunfluoreszenz von permeabilisierten **(A)** und nicht-permeabilisierten **(B)** Zellen unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 3F4 visualisiert.

Mit Wildtyp PrP transfizierte permeabilisierte Zellen bilden unter Einwirkung von Suramin Aggregate (Abb. 38 A, wt+Su) (Gilch *et al.* 2001). Wie aus der Immunfluoreszenz hervorgeht, besitzt PrP-CD4 einen ähnlichen Phänotyp (Abb. 38 A, CD4+Su). Im Gegensatz dazu ist PrP ΔN – wie aus der biochemischen Analyse zu erwarten (vgl. Abb. 36) – auch nach einer Behandlung mit Suramin an der Plasmamembran lokalisiert (Abb. 38 A, ΔN+Su). Die Analyse von PrP ΔN in nicht-permeabilisierten Zellen zeigt dasselbe Resultat (Abb. 38 B, ΔN+Su). Dagegen kann Volllängen-PrP in nicht-permeabilisierten Zellen nach Inkubation mit Suramin nicht visualisiert werden (Abb. 38 B, wt+Su). Die unter Einwirkung von Suramin entstehenden Aggregate sind also intrazellulär lokalisiert.

Aus der biochemischen Studie und der Immunfluoreszenz-Analyse geht hervor, dass missgefaltetes PrP^C zu einem erheblichen Anteil nicht an der Zelloberfläche, sondern intrazellulär lokalisiert ist. Aufgrund der bestehenden Oberflächenlokalisierung von missgefaltetem PrP ΔN lässt sich schlussfolgern, dass die intrazelluläre Lokalisierung von missgefaltetem PrP^C abhängig von der unstrukturierten N-terminalen Domäne des Proteins ist.

4.2.5 Suramin-induzierte Missfaltung findet an der Plasmamembran statt

Zwei verschiedene Mechanismen können die bestehenden Unterschiede in der Lokalisierung von missgefaltetem PrP^C und PrP ΔN erklären. Zum einen wäre es möglich, dass Suramin mit intrazellulärem PrP^C interagiert und somit eine Missfaltung innerhalb der Zelle induziert. Als Folge darauf würde PrP^C innerhalb der Zelle zurückgehalten werden, während missgefaltetes PrP ΔN an die Plasmamembran gelangen würde. Zum anderen könnte Suramin eine Missfaltung von PrP^C erst an der Zelloberfläche auslösen, was eine daran anschießende rasche Internalisierung des missgefalteten Proteins zur Folge haben würde. Die Internalisierung wäre somit von der N-terminalen Domäne von PrP^C abhängig. Aufgrund vorangegangener Studien (Nunziante *et al.* 2003; Sunyach *et al.* 2003), die dafür sprechen, dass der N-Terminus von PrP^C für die Internalisierung von Bedeutung ist, wurde die zweite Möglichkeit in Betracht gezogen und im Folgenden experimentell überprüft.

Um zu untersuchen, ob eine Internalisierung von missgefaltetem PrP^C besteht, wurden transfizierte Zellen bei 4 °C mit Suramin inkubiert, wodurch zellulärer Transport und Internalisierung gehemmt werden können. Unter diesen Bedingungen ist Wildtyp PrP, ebenso wie nach der Inkubation bei 37°C (vgl. Abb. 31), nach Behandlung mit Suramin hauptsächlich in der Detergenz-unlöslichen (P) Fraktion detektierbar (Abb. 39 A, Su).

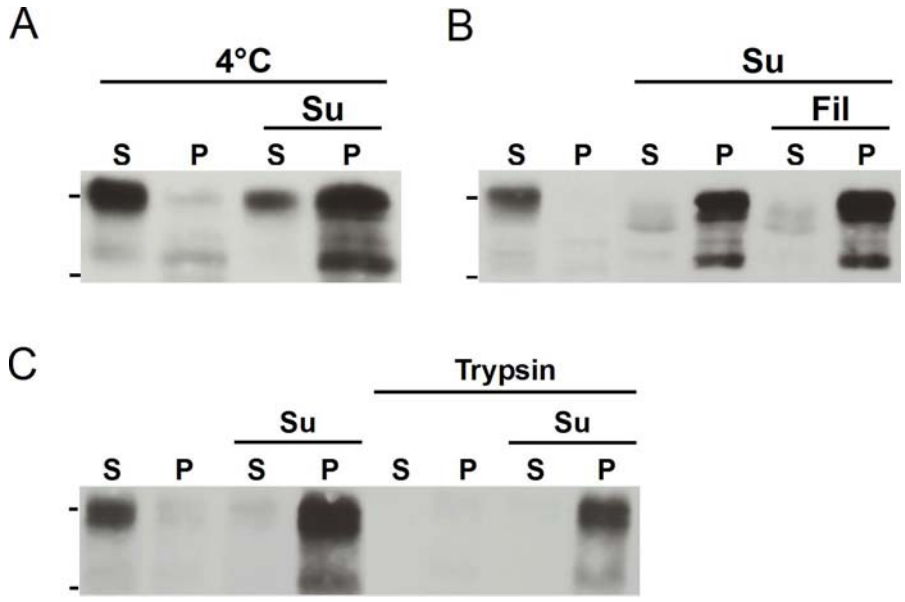

Abbildung 39: Suramin-induzierte Missfaltung von PrP^C findet an der Plasmamembran statt. (A, B) Hemmung der zellulären Internalisierung interferiert nicht mit Suramin-induzierter Missfaltung von PrP^C. Mit Wildtyp PrP transfizierte Zellen wurden 3 Stunden mit 300 µg/ml Suramin (Su) bei 4°C **(A)** oder 16 Stunden mit Suramin und / oder 0.25 µg/ml Filipin (Fil) bei 37°C **(B)** inkubiert. Kontrollzellen wurden unbehandelt belassen. Nach Zelllyse wurde PrP^C in der Detergenz-löslichen (S) und Detergenz-unlöslichen (P) Fraktion mittels Western Blot analysiert. **(C)** Biotinilierung von PrP^C an der Plasmamembran. Lebende mit Wildtyp PrP transfizierte Zellen wurden mit Plasmamembran-impermeantem Biotin markiert und anschließend 4 Stunden mit 300 µg/ml Suramin (Su) inkubiert oder unbehandelt belassen. Der eine Zellsatz wurde direkt lysiert, der andere zuvor mit Trypsin inkubiert. PrP^C in der Detergenz-löslichen (S) und -unlöslichen (P) Fraktion wurde mit dem 3F4-Antikörper immunpräzipitiert. Die Produkte wurden mit Streptavidin auf einem Western Blot analysiert. Die Größenmarker 36 und 22 kDa sind jeweils links am Rand als Striche dargestellt.

Um die Endozytose spezifisch bei 37°C zu hemmen, wurde das Antibiotikum Filipin verwendet, welches an Sterole der Membran bindet und somit caveoläre Strukturen (*Caveolae*) zerstört (McGookey *et al.* 1983; Bolard 1986; Rothberg *et al.* 1990; Rothberg *et al.* 1990). Transfizierte Zellen wurden bei 37°C mit Suramin und / oder Filipin inkubiert oder unbehandelt belassen. Die Analyse erfolgte sowohl mittels Western Blot (Abb. 39 B) als auch indirekter Immunfluoreszenz in permeabilisierten Zellen (Abb. 40).

Wie auf dem Western Blot zu erkennen ist, verbleibt mit Suramin versetztes Wildtyp PrP (wt) auch nach Behandlung mit Filipin in der Detergenz-unlöslichen (P) Fraktion (Abb. 39 B, Su, Fil). Die Hemmung der Endozytose hat also keinen Einfluss auf die Suramin-induzierte Missfaltung von PrP^C.

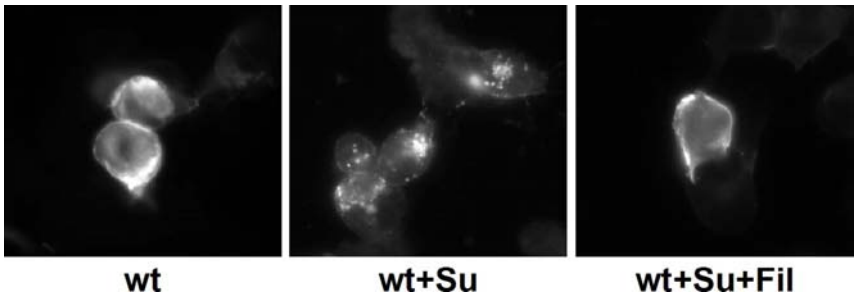

Abbildung 40: Zelluläre Lokalisierung von PrP^C in intakten Zellen. N2a-Zellen wurden auf Glasplättchen kultiviert, mit Wildtyp PrP (wt) transfiziert und 16 Stunden mit 300 µg/ml Suramin (wt+Su) oder mit Suramin und 0.25 µg/ml Filipin (wt+Su+Fil) inkubiert oder unbehandelt belassen. Die Lokalisierung von PrP wurde durch indirekte Immunfluoreszenz in permeabilisierten Zellen unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 3F4 visualisiert.

Die Untersuchung in intakten N2a-Zellen ergab jedoch, dass missgefaltetes PrP^C (Abb. 40, wt+Su) nach Inhibierung der Endozytose eine Oberflächenvisualisierung aufweist (Abb. 40, wt+Su+Fil), die vergleichbar zu der Lokalisierung von PrP^C in unbehandelten Kontrollzellen ist (Abb. 40, wt). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Suramin-induzierte Missfaltung an der Plasmamembran erfolgt und eine anschließende Internalisierung von missgefaltetem PrP^C stattfindet.

Dies konnte auch durch eine Oberflächenbiotinilierung bestätigt werden. Diese Art der Biotinilierung ermöglicht lediglich die Detektierung von PrP, das an der Zelloberfläche lokalisiert ist (vgl. Punkt 4.1.1.2). Mit Wildtyp PrP transfizierte N2a-Zellen wurden mit Plasmamembran-impermeantem Biotin inkubiert und anschließend mit Suramin versetzt oder unbehandelt belassen. Der eine Zellsatz wurde direkt lysiert, der andere zur Ablösung aller Zelloberflächenproteine zuvor mit Trypsin inkubiert. Nach der Lyse wurde PrP immunpräzipitiert und mittels Western Blot analysiert. Wildtyp PrP ist, wie erwartet, biotiniliert und in der Detergenz-löslichen (S) Fraktion zu finden (Abb. 39 C). Auch nach Behandlung mit Suramin ist PrP^C gut detektierbar, befindet sich jedoch in der Detergenz-unlöslichen (P) Fraktion (Abb. 39 C, Su). Da lediglich Oberflächenproteine biotiniliert werden können, bestätigt sich, dass missgefaltetes PrP^C an der Plasmamembran lokalisiert ist. Ein weiterer Beweis dafür ergibt sich aus den mit Trypsin behandelten Zellen, in welchen kein PrP^C mehr detektierbar ist (Abb. 39 C, Trypsin). Bei vorheriger Inkubation mit Suramin jedoch verbleibt eine erhebliche Proteinmenge resistent gegenüber dem extrazellulären Verdau (Abb. 39 C, Su, Trypsin).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Suramin Missfaltung von PrP^C an der Plasmamembran induziert. Als Folge darauf wird PrP^C internalisiert. Die Internalisierung ist abhängig vom unstrukturierten N-Terminus des Proteins.

4.2.6 Missfaltung bewirkt rasche lysosomale Degradierung von PrP^C

Als nächstes sollte geklärt werden, was mit PrP^C geschieht nachdem es als Folge auf eine Suramin-induzierte Missfaltung internalisiert wurde. Um zu untersuchen, ob missgefaltetes PrP^C nach der Internalisierung in Lysosomen degradiert werden kann, wurden untransfizierte N2a-Zellen nach Inkubation mit Suramin zusätzlich mit den lysosomalen Inhibitoren Leupeptin und Pepstatin oder Bafilomycin behandelt. Proteine, die lysosomal abgebaut werden können, akkumulieren nach einer Behandlung mit diesen Inhibitoren, was durch eine Zunahme der Intensität der Proteinbanden auf dem SDS-Gel angezeigt wird. N2a-Zellen können endogen PrP^C exprimieren, das sich mit Hilfe des Anti-PrP-Antiserums A7 auf dem Western Blot in der Detergenz-löslichen (S) Fraktion detektieren lässt (Abb. 41).

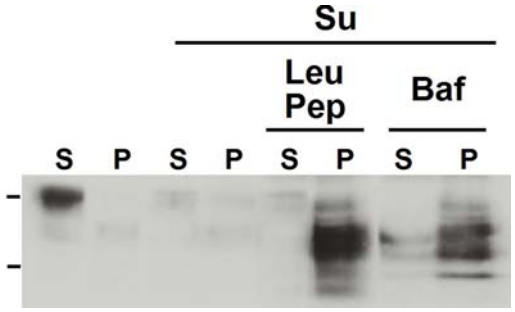

Abbildung 41: Missgefaltetes PrP^C wird in lysosomalen Kompartimenten degradiert. N2a-Zellen wurden 16 Stunden mit 300 µg/ml Suramin (Su) allein oder unter Zusatz von 200 µg/ml Leupetin (Leu) und Pepstatin (Pep) oder 1 µM Bafilomycin (Baf) inkubiert. Kontrollzellen wurden parallel analysiert. Nach Zelllyse wurde PrP^C in der Detergenz-löslichen (S) und -unlöslichen (P) Fraktion mittels Western Blot mit dem Anti-PrP-Antiserum A7 analysiert. Die Größenmarker 36 und 22 kDa sind jeweils links am Rand als Striche dargestellt.

Nach Behandlung mit Suramin ist PrP^C weder in der Detergenz-löslichen (S) noch -unlöslichen (P) Fraktion zu finden (Abb. 41, Su). Nach einer zusätzlichen lysosomalen Inhibierung hingegen kann PrP^C in der Detergenz-unlöslichen (P) Fraktion stabilisiert werden (Abb. 41, Su, Leu/Pep, Baf). Daraus lässt sich

schlussfolgern, dass missgefaltetes PrP^C nach seiner Internalisierung in Lysosomen abgebaut werden kann, wobei offenbar die Degradierung des missgefalteten PrP^C so schnell erfolgt, dass eine Detektierung in untransfizierten N2a-Zellen, in welchen eine wesentlich niedrigere Expressionsrate von PrP^C vorliegt als in transfizierten N2a-Zellen, ohne lysosomale Inhibierung nicht möglich ist.

4.2.7 Eine Missfaltung mit nachfolgender Internalisierung von PrP^C kann ebenfalls durch Kupfer erzielt werden

Nach der eingehenden Analyse des Wirkungsmechanismus von Suramin stellte sich die Frage, ob andere Substanzen einen ähnlichen Effekt auf die Biogenese von PrP^C haben können. In der vorliegenden Studie wurde eine Internalisierung von PrP^C als Folge auf die Suramin-induzierte Missfaltung festgestellt.

Frühere Studien deuten darauf hin, dass Kupfer auch eine Endozytose von PrP^C induziert (Pauly und Harris 1998; Sumudhu *et al.* 2001). Folglich wurde untersucht, ob Kupfer ähnliche Effekte besitzt wie Suramin. Dazu wurde zunächst das Löslichkeitsprofil von PrP^C nach einer Behandlung der transfizierten Zellen mit ansteigender Konzentration von Kupfer analysiert. Die Western Blot Analyse der Detergenz-unlöslichen Fraktion verdeutlicht, dass PrP^C in Abhängigkeit der Kupfer-Konzentration, ähnlich wie nach einer Inkubation mit Suramin (vgl. Abb. 31), zunehmend eine Detergenz-unlösliche Konformation annimmt (Abb. 42).

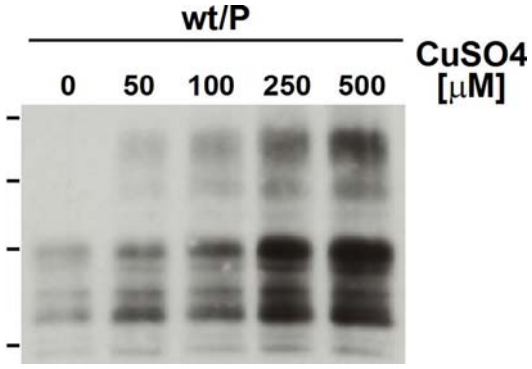

Abbildung 42: Kupfer bewirkt Missfaltung von PrP^C. Mit Wildtyp PrP (wt) transfizierte N2a-Zellen wurden 4 Stunden in Serum-freiem Medium mit ansteigender Konzentration von Kupfer ($CuSO_4$) inkubiert. Nach Zelllyse wurde PrP^C in der Detergenz-unlöslichen (P) Fraktion mittels Western Blot analysiert. Die Größenmarker 64, 50, 36 und 22 kDa sind jeweils links am Rand als Striche dargestellt.

Analog zur biochemischen Analyse wurde eine Studie in lebenden Zellen durchgeführt. Mit Wildtyp PrP (wt) transfizierte N2a-Zellen wurden mit Kupfer inkubiert, permeabilisiert und durch indirekte Immunfluoreszenz analysiert. In Kupfer-behandelten Zellen (Abb. 43, wt+$CuSO_4$) kann, wie in Suramin-inkubierten Zellen (vgl. Abb. 38 A, wt+Su), eine intrazelluläre Lokalisierung von PrP^C beobachtet werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Kupfer ebenso wie Suramin eine Missfaltung von PrP^C induziert, was offenbar eine darauf folgende Internalisierung auslöst.

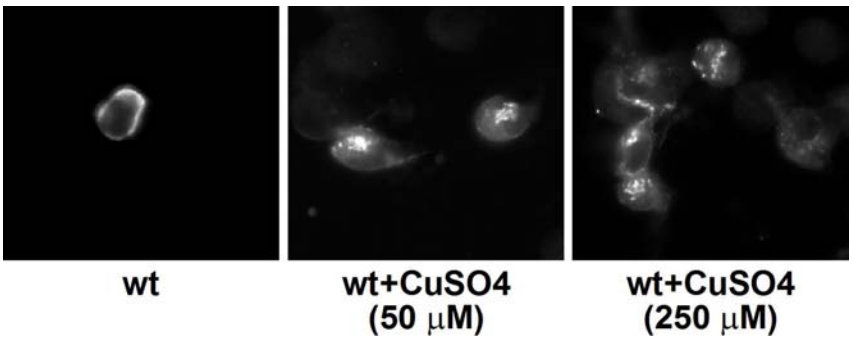

Abbildung 43: Zelluläre Lokalisierung von PrP^C in intakten Zellen. Kupfer bewirkt Internalisierung von PrP^C. N2a-Zellen wurden auf Glasplättchen kultiviert, mit Wildtyp PrP (wt) transfiziert und 4 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von Kupfer (wt+$CuSO_4$) inkubiert oder unbehandelt belassen. Die Lokalisierung von PrP wurde durch indirekte Immunfluoreszenz von permeabilisierten Zellen unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 3F4 visualisiert.

4.2.8 Kupfer-induzierte Missfaltung hängt von der unstrukturierten N-terminalen Domäne des Prion-Proteins ab

Als nächstes sollte geklärt werden, welche Domäne von PrP^C für die Kupfer-induzierte Missfaltung notwendig ist. Da der N-Terminus von PrP^C eine Oktarepeat-Domäne enthält, an welche Kupfer gebunden werden kann (Hornshaw *et al.* 1995; Brown *et al.* 1997; Stöckel *et al.* 1998; Viles *et al.* 1999; Jackson *et al.* 2001; Kramer *et al.* 2001), wurde der Effekt von Kupfer auf PrP ΔN untersucht. Dazu wurden N2a-Zellen mit PrP ΔN transfiziert und mit ähnlichen Kupfer-Konzentrationen versetzt wie zuvor Wildtyp PrP (vgl. Punkt 4.2.7). Im Gegensatz zu Wildtyp PrP (vgl. Abb. 42) jedoch verbleibt PrP ΔN auch nach Behandlung mit Kupfer in der Detergenz-löslichen (S) Fraktion (Abb. 44).

Dies verdeutlicht, dass für eine Kupfer-induzierte Missfaltung - anders als für eine Suramin-induzierte Missfaltung - die unstrukturierte N-terminale Domäne von PrP^C notwendig ist. Es scheint, dass die Kupfer-induzierte Missfaltung durch Bindung von Kupfer an die Oktarepeats im N-Terminus vermittelt wird.

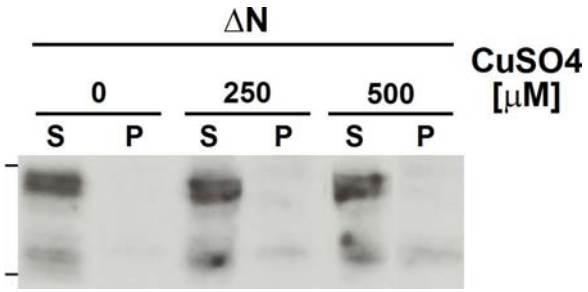

Abbildung 44: Kupfer-induzierte Missfaltung ist abhängig von der unstrukturierten N-terminalen Domäne von PrP^C. N2a Zellen wurden mit PrP ΔN transfiziert und 4 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von Kupfer ($CuSO_4$) inkubiert. Nach Zelllyse wurde PrP^C in der Detergenz-löslichen (S) und -unlöslichen (P) Fraktion mittels Western Blot analysiert. Die Größenmarker 36 und 22 kDa sind jeweils links am Rand als Striche dargestellt.

4.2.9 Suramin und Kupfer interferieren mit der Propagierung von PrP^{Sc}

In einer vorangegangenen Studie wurde gezeigt, dass Suramin-induzierte Missfaltung mit der Propagierung von Proteinase K (PK) - resistentem PrP^{Sc} in Scrapie-infizierten (ScN2a) N2a-Zellen interferiert, welche Wildtyp PrP stabil überexprimieren (Gilch *et al.* 2001). Im Folgenden wurde der Effekt von Suramin in untransfizierten ScN2a-Zellen untersucht. ScN2a-Zellen sind mit Hirnhomogenat aus Scrapie-infizierten Mäusen infiziert und können PK-resistentes und infektiöses PrP^{Sc} replizieren (Butler *et al.* 1988; Caughey *et al.* 1989). Die ScN2a-Zellen wurden vier Tage mit Suramin inkubiert und PrP^{Sc} wurde mit Hilfe des Anti-PrP-Antiserums A7 mittels Western Blot detektiert.

In unbehandelten Zellen ist das charakteristische Bandenmuster von PrP^{Sc} in der Detergenz-unlöslichen (P) Fraktion zu finden (Abb. 45). Im Gegensatz dazu ist PrP^{Sc} in Suramin-inkubierten Zellen weder in der Detergenz-löslichen (S) noch -unlöslichen (P) Fraktion detektierbar. Eine ähnliche Beobachtung wurde zuvor mit PrP^C in untransfizierten N2a-Zellen gemacht (vgl. Abb. 41). Es wird bestätigt, dass Suramin mit der Bildung von PrP^{Sc} in ScN2a-Zellen interferiert.

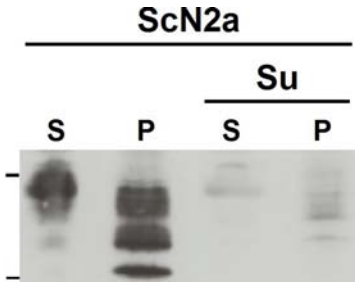

Abbildung 45: Missgefaltetes PrP^{C} wird nicht in PrP^{Sc} umgewandelt. ScN2a-Zellen wurden 4 Tage mit 150 µg/ml Suramin inkubiert oder unbehandelt belassen. Nach Zelllyse wurde PrP in der Detergenz-löslichen (S) und -unlöslichen (P) Fraktion mittels Western Blot mit dem A7-Antikörper analysiert. Die Größenmarker 36 und 22 kDa sind jeweils links am Rand als Striche dargestellt.

Darauf aufbauend sollte als nächstes auch die Wirkung von Kupfer auf die Propagierung von PrP^{Sc} in ScN2a-Zellen untersucht werden. Dazu wurden ScN2a-Zellen drei Tage mit einer nicht-toxischen Kupferkonzentration (0.5 µM) inkubiert. Um zu untersuchen ob sich PK-resistentes PrP^{Sc} gebildet hat, wurde der eine Zellsatz einem PK-Verdau unterzogen, der andere Zellsatz hingegen direkt mittels Western Blot analysiert.

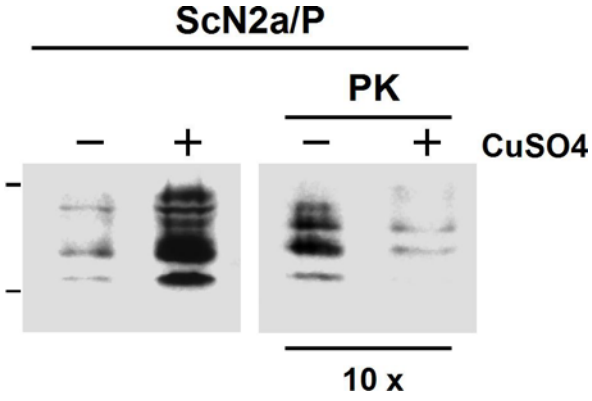

Abbildung 46: Kupfer interferiert mir der Propagierung von PrP^{Sc} in ScN2a-Zellen. ScN2a-Zellen wurden 3 Tage mit 0.5 µM Kupfer inkubiert. Nach Zelllyse wurde PrP in der Detergenz-unlöslichen (P) Fraktion mittels Western Blot mit dem A7-Antikörper entweder direkt analysiert oder zuvor einem Proteinase K (PK)-Verdau unterzogen. Es ist zu beachten, dass 10 x mehr Protein als Ausgangsmaterial in PK-behandelten als in -unbehandelten Zellen vorhanden ist. Die Größenmarker 36 und 22 kDa sind jeweils links am Rand als Striche dargestellt.

Wie auf dem Western Blot der Detergenz-unlöslichen Fraktion (P) zu erkennen ist, bewirkt Kupfer zwar einen massiven Anstieg von Detergenz-unlöslichem PrP (Abb.

46, linker Blot, +$CuSO_4$), diese Fraktion ist aber nicht resistent gegenüber proteolytischem Verdau (Abb. 46, rechter Blot, +$CuSO_4$, PK). Somit ist die Bildung von PK-resistentem PrP^{Sc} in Kupfer- ähnlich wie in Suramin-behandelten ScN2a-Zellen signifikant vermindert. Kupfer interferiert also auch mit der Propagierung von PrP^{Sc}.

4.2.10 Zusammenfassung

Suramin ist eine Anti-Prion-Substanz, durch welche der Ausbruch der Prion-Erkrankung in Scrapie-infizierten Mäusen verzögert werden kann (Gilch *et al.* 2001). In der vorliegenden Studie wurde der Effekt von Suramin auf die Biogenese von PrP^{C} und Propagierung von PrP^{Sc} in neuronalen Zellen untersucht. Dabei konnten folgende wichtige Einblicke in den Wirkungsmechanismus von Suramin gewonnen werden:

- Suramin induziert Missfaltung von PrP^{C} an der Zelloberfläche unabhängig vom Typ des Membranankers oder dem Status der Glykosilierung.
- Suramin-induzierte Missfaltung hängt vom proximalen Bereich des C-Terminus von PrP^{C} ab.
- Suramin-induzierte Missfaltung resultiert in rascher Internalisierung und anschließender Degradierung von missgefaltetem PrP^{C}.
- Internalisierung ist vom N-Terminus von PrP^{C} abhängig.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Kupfer ebenfalls eine Missfaltung von PrP^{C} mit anschließender Internalisierung induziert. Für die Kupfer-induzierte Missfaltung ist jedoch, anders als bei Suramin, der unstrukturierte N-Terminus von PrP^{C} notwendig. Beide Substanzen interferieren mit der Propagierung von PrP^{Sc} in Scrapie-infizierten N2a-Zellen.
Aus dieser Studie wird ersichtlich, dass der Anti-Prion-Effekt von Suramin offenbar auf einer Entfernung von PrP^{C} von der Zelloberfläche durch Internalisierung und Degradierung beruht, wobei beide Prozesse von unterschiedlichen Domänen von PrP^{C} vermittelt werden. Die Analyse verdeutlicht außerdem, dass in neuronalen Zellen eine Qualitätskontrolle zur effizienten Entfernung von missgefaltetem, potentiell nicht-

funktionellem PrP^C von der Zelloberfläche besteht und liefert einen entscheidenden Ansatz für die Entwicklung effizienterer Anti-Prion-Strategien.

5.Diskussion

Prion-Erkrankungen sind tödlich verlaufende, neurodegenerative Erkrankungen, die sich durch eine äußerst progressive Degeneration von Nervenzellen und Ablagerungen (Plaques) des missgefalteten Prion-Proteins (PrP^{Sc}) im Gehirn betroffener Organismen manifestieren. Gemäß der Prion-Protein-*only*-Hypothese ist PrP^{Sc} Hauptbestandteil der infektiösen Partikel (Prionen) (Prusiner *et al.* 1981; Prusiner 1982). Der Mechanismus der Neurodegeneration ist derzeit ungeklärt. Dennoch geht man heute davon aus, dass die Missfaltung des zellulären Prion-Proteins (PrP^{C}) eine zentrale Rolle bei der Neurodegeneration sowie der Bildung infektiöser Prionen spielt. Es ist daher von dringender Notwendigkeit, den Mechanismus der Missfaltung von PrP^{C} zu verstehen, um effektive therapeutische Strategien zu entwickeln, durch welche die Konversion und somit die Bildung infektiöser Prionen verhindert werden kann.
Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich eingehend mit diesen wichtigen Aspekten. Im ersten Teil wurde die Faltung und Maturierung krankheitsassoziierter Mutanten untersucht (siehe Punkt 5.1). Im zweiten Teil wurde die Wirkung einer Anti-Prion-Substanz auf die Biogenese von PrP^{C} und die Propagierung von PrP^{Sc} analysiert (siehe Punkt 5.2).

5.1 Pathogene Mutationen destabilisieren den hydrophoben Core und interferieren mit der Maturierung von PrP

Um mechanistische Einblicke in die Konformationsänderung von PrP^{C} zu gewinnen, wurden im ersten Teil der Arbeit zwei bekannte pathogene Mutanten im Zellkulturmodell untersucht, die beim Menschen Prion-Erkrankungen auslösen können (Dlouhy *et al.* 1992; Nitrini *et al.* 1997). Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Faltung als auch die Maturierung der pathogenen Mutanten (T182A und F197S) in neuronalen Zellen beeinträchtigt ist (siehe Abb. 30). T182A und F197S nehmen im ER spontan eine missgefaltete und Protease-resistente Konformation an (siehe Punkt 4.1.2 und 4.1.6). Im Gegensatz zu PrP^{C} erfolgt bei den Mutanten weder eine Umwandlung der Core Glykane in komplexe Strukturen noch eine Anheftung des

GPI-Ankers. Als Folge des Fehlens des GPI-Ankers werden T182A und F197S als High Mannose Formen sekretiert.

Worin liegt der Grund für die Missfaltung der pathogenen Mutanten? Am auffälligsten an der Mutation T182A ist, dass diese eine Zerstörung der ersten Akzeptorstelle für die Asparagin-gekoppelten Glykane zur Folge hat. Der Verlust der ersten Glykosilierungsstelle hat aber offenbar keinen Einfluss auf die Faltung und interessanterweise auch nicht auf die Maturierung von PrP. So weisen im Gegensatz zu T182A weitere monoglykosilierte Mutanten (N180Q, N196Q) ähnlich wie PrP^C eine komplexe Glykosilierung und GPI-Verankerung auf (siehe Punkt 4.1.1 und 4.1.2), wobei N180Q auch eine vergleichbare proteolytische Sensitivität wie PrP^C besitzt, was auf eine ähnliche Konformation hindeutet (vgl. Abb. 19). Beide pathogenen Mutanten (T182A und F197S) haben eine Gemeinsamkeit: die Seitenketten ihrer substituierten Aminosäuren könnten gemäß NMR-Strukturanalysen zur Stabilisierung des hydrophoben Cores der globulären C-terminalen Domäne von PrP beitragen (Riek *et al.* 1998). Neu generierte Mutationen (vgl. Abb. 24, 25), die einen destabilisierenden Effekt auf den hydrophoben Core haben könnten (V160S und V160W), ziehen zellbiologisch einen ähnlichen Phänotyp nach sich wie T182A und F197S (siehe Punkt 4.1.5.2). Die vorliegende Zellkulturstudie liefert zusammen mit den vorangegangenen NMR- sowie *in vitro*-Analysen (Riek *et al.* 1998; Liemann und Glockshuber 1999; Vanik und Surewicz 2002) sehr gewichtige Argumente für die Annahme, dass humanpathogene Mutationen zu einer Destabilisierung des hydrophoben Cores führen können, was offenbar eine Missfaltung von PrP zur Folge hat.

Diese Studie gibt aber nicht nur eine mechanistische Erklärung für die Missfaltung pathogener Mutanten sondern verdeutlicht außerdem, dass ein Zusammenhang zwischen der Faltung und den posttranslationalen Modifikationen von PrP besteht (siehe Punkt 5.1.1).

5.1.1 Faltung und posttranslationale Modifikationen von PrP

Während bei den missgefalteten Mutanten T182A, F197S, V160S und V160W bestimmte posttranslationale Modifikationen wie Anheftung des GPI-Ankers und Umwandlung der Core Glykane in komplexe Strukturen nicht stattfinden, sind andere wie die Abspaltung der N-terminalen ER-Signalsequenz und die Core Glykosilierung nicht beeinträchtigt.

Die N-terminale Peptidabspaltung, sowie die Addition der Core Glykane ereignen sich während des cotranslationalen Imports der Proteine in das ER, also wenn sich die Polypeptidkette noch am Translocon befindet (siehe Punkt 1.2.4). Eine neuere Studie hat ergeben, dass die C-terminale GPI-Signalsequenz (GPI-SS), welche als Erkennungssequenz für den GPI-Anker dient, nicht wie zuvor angenommen zusätzlich als Transmembrandomäne fungiert (Dalley und Bulleid 2003). Die Proteine werden also vollständig in das ER-Lumen importiert und erhalten ihre Core Glykosilierung bevor die GPI-SS abgespalten und der vorgeformte GPI-Anker angehängt wird. Das Anheften des GPI-Ankers und die Übertragung der Core Glykane sind also keine – wie zuvor vorgeschlagen (Walmsley *et al.* 2001) – kooperativen Prozesse. Die Core Glykosilierung von PrP ist vielmehr abhängig von der GPI-SS. Wenn diese C-terminale Signalsequenz vollständig deletiert ist, liegt PrP vorwiegend unglykosiliert vor. Ist die GPI-SS dagegen mutiert und somit nicht funktionell, findet wiederum eine Core Glykosilierung statt (Winklhofer *et al.* 2003). Es erscheint also plausibel, dass die hier untersuchten Mutanten, welche alle eine GPI-SS besitzen, trotz fehlender Membranverankerung eine Core Glykosilierung erhalten haben.

Wie hängen aber fehlender GPI-Anker, unvollständige Glykosilierung und Missfaltung der pathogenen Mutanten zusammen? Im Falle des Prion-Proteins ist anzunehmen, dass auch die Faltung bereits vor Anheftung des GPI-Ankers abgeschlossen ist. Hier sei anzumerken, dass die Faltung der globulären C-terminalen Domäne von PrP (Riek *et al.* 1996; Riek *et al.* 1997) zu den am schnellsten bisher *in vitro* messbaren Faltungsreaktionen gehört (Wildegger 1999). In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Konformation von PrP einen entscheidenden Einfluss auf die Übertragung des GPI-Ankers hat. Die offenbar durch eine Destabilisierung des hydrophoben Cores hervorgerufene Missfaltung von PrP

verhindert die Anheftung des GPI-Ankers. So besitzen alle Mutanten, die eine Destabilisierung des hydrophoben Cores bewirken könnten (T182A und F197S sowie V160S und V160W), keinen GPI-Anker und werden infolge dessen sekretiert (vgl. Abb. 17, 26, 28). Dagegen haben Mutationen, welche die Stabilität der Tertiärstruktur nicht beeinträchtigen sollen (N180Q und N196Q), keine Auswirkungen auf die Übertragung des GPI-Ankers und sind daher an der Plasmamembran lokalisiert (siehe Punkt 4.1.1.2).

Bei den missgefalteten PrP-Mutanten konnte keine Abspaltung der GPI-SS beobachtet werden (vgl. Abb. 27), was das Fehlen des GPI-Ankers erklärt. Die veränderte Tertiärstruktur der hier untersuchten Mutanten führt wahrscheinlich dazu, dass die GPI-SS im Innern des Proteins verborgen bleibt und daher unzugänglich für eine Abspaltung ist. Die Konformationsänderung der mutierten PrP-Formen scheint also ausschlaggebend für die fehlende GPI-Anheftung zu sein.

Ein weiteres phänotypisches Merkmal der missgefalteten Mutanten ist die fehlende Umwandlung der Core Glykane in komplexe Strukturen. So liegen alle Mutanten ohne GPI-Anker nicht als komplexe, sondern als High Mannose Formen vor (vgl. Abb. 13, 26 und 28). Es stellt sich die Frage, ob der unreife Glykosilierungsstatus ebenfalls auf die Missfaltung von PrP oder aber auf das Fehlen des GPI-Ankers zurückzuführen ist. Vorangegangene Analysen deuten auf letzteres hin, wobei die komplexe Glykosilierung nicht spezifisch für GPI-verankerte Proteine ist. Tauscht man den GPI-Anker von PrP durch einen heterologen Membrananker (CD4-Anker) aus, findet trotzdem eine weitere Prozessierung der Glykane in komplexe Strukturen statt (Taraboulos *et al.* 1995; Winklhofer *et al.* 2003). Somit ist die Membranverankerung von PrP anscheinend ein entscheidender Faktor für die terminale Prozessierung der PrP-Glykane. Der Membrananker scheint eine spezielle Umgebung zu bieten. Komponenten der Plasmamembran könnten entweder direkt an der Proteinfaltung beteiligt sein oder indirekt die Glykosilierung beeinflussen, indem diese intermolekulare PrP-Wechselwirkungen verhindern. Tatsächlich kann die Membranumgebung *in vitro* die Konformation von rekombinantem PrP beeinträchtigen (Morillas *et al.* 1999; Sanghera und Pinheiro 2002).

Proteinfaltung und posttranslationale Modifikationen hängen also eng miteinander zusammen. Eine Destabilisierung des hydrophoben Cores führt offenbar zu einer Missfaltung von PrP, wodurch das Fehlen des GPI-Ankers erklärt werden kann. Eine

fehlende Membranverankerung wiederum hat eine unvollständige Glykosilierung von PrP zur Folge.

5.1.2 Das pathogene Potential von T183A und F198S

Nach Klärung des Maturierungsstatus der missgefalteten Mutanten stellt sich die interessante Frage, worauf das pathogene Potential von T183A und F198S beruhen könnte. Warum lösen also diese Mutationen beim Menschen Prion-Erkrankungen aus?

Wie aus vorliegender Studie hervorgeht, können humanpathogene Mutationen eine Missfaltung von PrP begünstigen, so dass PrP offensichtlich leichter in eine pathogene Konformation umgefaltet werden kann. Im Gehirn von Patienten, welche heterozygot für die Mutation T183A waren, konnten neben Neurodegeneration auch kleine Plaque-ähnliche Ablagerungen des Prion-Proteins gefunden werden (Nitrini *et al.* 1997; Grasbon-Frodl *et al.* 2004). Western Blot Analysen des Hirnhomogenats eines Patienten zeigten kürzlich, dass neben einer überwiegend Protease-resistenten, monoglykosilierten PrP-Konformation, welche ebenfalls in der vorliegenden Zellkulturstudie beobachtet werden konnte (vgl. Abb. 19), auch eine Protease-resistente diglykosilierte Form zu finden ist, welche PrP^{Sc} repräsentiert (Grasbon-Frodl *et al.* 2004). Aufgrund der Heterozygotie vorhandenes, nicht-mutiertes PrP^{C} kann offensichtlich unter dem Einfluss von mutiertem T183A eine veränderte, pathogene PrP^{Sc}-Konformation annehmen. Für die Mutation F198S konnte *in vitro* eine erhöhte Tendenz, eine PrP^{Sc}-ähnliche Konformation anzunehmen, nachgewiesen werden (Liemann und Glockshuber 1999; Vanik und Surewicz 2002). Patienten mit der Mutation F198S besitzen typische große Plaques des Prion-Proteins im Gehirn (Dlouhy *et al.* 1992), welche drei verschiedene Protease-resistente, jedoch unglykosilierte Isoformen von PrP enthalten (Piccardo *et al.* 1996). Diese Befunde verdeutlichen, dass humanpathogene Mutanten nicht nur selbst eine missgefaltete Konformation annehmen, sondern offenbar auch mit PrP^{C} interagieren und somit weitere missgefaltete PrP-Formen, darunter PrP^{Sc}, generieren können.

Zur Bildung pathogener Formen von PrP könnte auch die fehlende Membranverankerung, sowie die unvollständige Glykosilierung (High Mannose Form) von T182A und F197S beitragen. Interessanterweise hat der Status der

Glykosilierung einen entscheidenden Einfluss auf die Effizienz der Umwandlung in PrP^{Sc}. So sind High Mannose Formen von PrP^{C} (Winklhofer *et al.* 2003), ebenso wie komplett unglykosilierte PrP-Formen (Taraboulos *et al.* 1990; Kocisko *et al.* 1994; Lehmann und Harris 1997; Korth *et al.* 2000; Priola und Lawson 2001), bevorzugte Substrate für die Umwandlung in PrP^{Sc}. Auch eine fehlende Membranverankerung könnte strukturelle Auswirkungen auf PrP haben und eine Bildung von Aggregaten begünstigen, wenn beispielsweise eine potentielle Interaktion und Stabilisierung von PrP durch verschiedene Komponenten der Plasmamembran nicht gewährleistet ist.

Ein weiterer Ansatz zur Erklärung des pathogenen Potentials von T182A und F197S könnte in der Sekretion dieser liegen, welche eine mögliche Interaktion der missgefalteten PrP-Formen mit benachbarten Zellen erleichtern könnte. Die Zelle ist mit verschiedenen Qualitätskontrollmechanismen ausgestattet, um die Bildung und den weiteren Transport missgefalteter Proteine zu verhindern (siehe Punkt 1.3.2). Im ER können missgefaltete Proteine die *Unfolded Protein Response* (UPR) auslösen und durch eine ER-assoziierte Degradierung (ERAD) eliminiert werden (McCracken und Brodsky 2003). Vorangegangene Studien haben jedoch gezeigt, dass die UPR durch Anhäufung verschiedener missgefalteter Formen von PrP weder in Hefe- noch in neuronalen Zellen induziert werden kann (Heller *et al.* 2003; Winklhofer *et al.* 2003). So wurde auch in der vorliegenden Zellkultur-Studie kein verstärkter, proteasomaler Abbau der missgefalteten Mutanten beobachtet (siehe Punkt 4.1.4). Diese in neuronalen Zellen ausbleibende Qualitätskontrolle könnte zum pathogenen Potential von T182A und F197S beitragen, da die missgefalteten Mutanten während der Biogenese, wie alle sekretorischen Proteine, weiter zur Plasmamembran transportiert und anschließend aufgrund der fehlenden GPI-Verankerung sekretiert werden. Interessanterweise können diese sekretierten PrP-Formen von heterologen Zellen wieder aufgenommen werden (siehe Punkt 4.1.3). Damit wäre eine Interaktion der pathogenen Mutanten mit PrP^{C}, sowie mit verschiedenen zellulären Komponenten benachbarter Zellen denkbar, die an der Plasmamembran oder in Endosomen lokalisiert sind. Es ist zu beachten, dass T182A ebenso wie PrP^{C} auch in lysosomalen Kompartimenten zu finden ist (vgl. Abb. 23).

Eine Sekretion pathogener PrP-Formen wurde zuvor nie beschrieben. Da infektiöses PrP^{Sc}, ebenso wie PrP^{C}, mit einem GPI-Anker an die Plasmamembran geheftet ist (Stahl *et al.* 1987), erscheint die Sekretion von T182A und F197S auf den ersten Blick überraschend. Die hier dargestellten Ergebnisse werden jedoch durch eine

entscheidende *in vivo* Studie unterstützt. Kürzlich ist eine Übertragung der Prion-Erkrankung auf transgene Mäuse mittels einer *in vitro* missgefalteten PrP-Form gelungen, welche ebenfalls keinen GPI-Anker besitzt (Legname *et al.* 2004). Die infizierten Tiere zeigten charakteristische, histopathologische Veränderungen im Gehirn, was zur Ausbildung typischer neurologischer Symptome und schließlich zum Tod führte. Die Anheftung des GPI-Ankers scheint also tatsächlich für die Auslösung von Prion-Erkrankungen nicht notwendig zu sein.

Aus den vorliegenden Daten wird die Komplexität des pathogenen Potentials von missgefalteten PrP-Mutanten ersichtlich. Es scheint, dass mehrere Faktoren zusammen zum Ausbruch von Prion-Erkrankungen führen. Der entscheidende erste Schritt ist jedoch die Missfaltung von PrP, welche offensichtlich durch Mutationen im hydrophoben Core begünstigt werden kann.

5.2 Missfaltung von PrP^C an der Plasmamembran führt zur raschen Internalisierung und verhindert die Bildung von PrP^{Sc}

Um den Wirkungsmechanismus der Anti-Prion-Substanz Suramin besser zu verstehen, wurde im zweiten Teil dieser Arbeit der Effekt von Suramin auf die Biogenese von PrP^C in neuronalen Zellen untersucht. In einer früheren Studie wurde gezeigt, dass Suramin eine Missfaltung von PrP^C induziert sowie mit der Propagierung von PrP^{Sc} in Scrapie-infizierten N2a-Zellen interferiert und den Ausbruch der Prion-Erkrankung in Scrapie-infizierten Mäusen verzögert (Gilch *et al.* 2001).

Aus der vorliegenden mechanistischen Analyse wird ersichtlich, dass die Suramin-induzierte Missfaltung an der Plasmamembran stattfindet und eine rasche Internalisierung und lysosomale Degradierung von PrP^C zur Folge hat. Dabei konnte gezeigt werden, dass Suramin-induzierte Missfaltung und Internalisierung zwei aufeinander folgende Prozesse sind, die von unterschiedlichen Domänen von PrP^C vermittelt werden (siehe Punkt 5.2.1). Die durch Internalisierung erzielte Entfernung von missgefaltetem PrP^C von der Zelloberfläche verhindert die Bildung von PrP^{Sc} und liefert somit einen Ansatz für die Entwicklung von Anti-Prion-Strategien (siehe Punkt 5.2.2).

5.2.1 Der unstrukturierte N-Terminus von PrP^C vermittelt eine Internalisierung von missgefalteten PrP-Formen

In den hier dargestellten Ergebnissen konnte der proximale Bereich des strukturierten C-Terminus von PrP^C (AS 90-156) als die Domäne identifiziert werden, welche zur Suramin-induzierten Missfaltung führt, der unstrukturierte N-Terminus des Proteins (AS 27-89) hingegen als die Domäne, welche die Internalisierung von PrP^C vermittelt. Missgefaltete PrP-Formen, die sich unter der Einwirkung von Suramin bilden, zeichnen sich durch eine Detergenz-unlösliche Konformation in verschiedenen neuronalen Zelllinien aus (siehe Punkt 4.2.1). Es konnte festgestellt werden, dass weder der Status der Glykosilierung noch der Typ des Membranankers von PrP^C einen Einfluss auf die Suramin-induzierte Missfaltung besitzen. So bleibt der Effekt von Suramin auf die Proteinfaltung auch bei Hemmung der terminalen Glykosilierung und Austausch des GPI-Ankers durch einen heterologen CD4-Anker erhalten (siehe Punkt 4.2.2).

Um zu untersuchen, welche Domänen von PrP^C für die Suramin-induzierte Missfaltung verantwortlich sind, wurden zwei verschiedene Deletionsmutanten miteinbezogen (siehe Punkt 4.2.3). Suramin hat interessanterweise keinen Effekt auf die Proteinfaltung, wenn der proximale Bereich des C-Terminus deletiert ist (PrP Δ27-156). Bei PrP ΔN hingegen, einer Mutanten mit deletiertem N-Terminus (AS 27-89), löst Suramin eine Missfaltung aus (vgl. Abb. 35). Vergleicht man beide Deletionsmutanten so wird ersichtlich, dass bei PrP ΔN im Gegensatz zu PrP Δ27-156 die hydrophobe Domäne (HD), der ersten β-Strang und die erste α-Helix (vgl. Abb. 34) erhalten sind. Dieser proximale Bereich der globulären C-terminalen Domäne scheint also in eine direkte Interaktion mit Suramin verwickelt zu sein und infolge dessen zu einer Missfaltung zu führen.

Die Analysen zur Inhibierung der PrP-Internalisierung zeigen, dass Suramin die Missfaltung von PrP^C an der Zelloberfläche induziert. So hat die Hemmung der Endozytose keinen Einfluss auf die Suramin-induzierte Missfaltung von PrP^C (siehe Punkt 4.2.5).

Kupfer konnte als weitere Substanz mit einem ähnlichen Effekt wie Suramin auf die Faltung von PrP^C identifiziert werden. Eine Analyse des Löslichkeitsprofils zeigt, dass PrP^C auch in Kupfer-behandelten Zellen eine Detergenz-unlösliche Konformation

annimmt (vgl. Abb. 42). Es stellt sich die Frage, ob für die Kupfer-induzierte Missfaltung dieselbe Domäne verantwortlich ist, wie für die Missfaltung, welche durch Suramin bewirkt wird. Dies scheint jedoch nicht der Fall zu sein. Der unstrukturierte N-Terminus von PrP^C enthält eine Oktarepeat-Domäne, welche eine Bindestelle für Kupfer darstellt (Hornshaw *et al.* 1995; Brown *et al.* 1997; Stöckel *et al.* 1998; Viles *et al.* 1999; Jackson *et al.* 2001; Kramer *et al.* 2001). Ist der N-Terminus von PrP deletiert (PrP ΔN), so besitzt Kupfer keinen Einfluss auf die Proteinfaltung (vgl. Abb. 44). Die Kupfer-induzierte Missfaltung scheint somit durch direkte Bindung von Kupfer an die Oktarepeats im N-Terminus von PrP vermittelt zu werden.

Beide Substanzen, Suramin und Kupfer, lösen also offenbar durch direkte Bindung an unterschiedliche Domänen von PrP^C Missfaltung aus. Ferner konnte gezeigt werden, dass diese Strukturänderung in beiden Fällen zur Internalisierung des missgefalteten Proteins führt, wobei ausschließlich der N-Terminus von PrP^C für die Internalisierung verantwortlich ist. So befindet sich PrP ΔN nach einer Behandlung der Zellen mit Suramin im Gegensatz zu Volllängen-PrP (wt) nicht in intrazellulären Kompartimenten sondern an der Zelloberfläche (siehe Punkt 4.2.4). Frühere Studien deuten darauf hin, dass Kupfer die Endozytose von PrP^C stimuliert und eine Missfaltung des Proteins auslösen kann (Pauly und Harris 1998; Quaglio *et al.* 2001; Sumudhu *et al.* 2001). In der vorliegenden Studie bewirkt bereits die minimale Kupfer-Konzentration, die für eine Induktion der Endozytose von PrP nötig ist, auch eine PrP-Missfaltung (vgl. Abb. 42, 43). Somit ist eine Missfaltung von PrP an der Zelloberfläche – ob durch die Wirkung von Suramin oder Kupfer verursacht – offensichtlich ein ausreichender Stimulus für die Endozytose des Proteins, welche über den N-Terminus von PrP vermittelt wird. Die vorliegenden Ergebnisse verdeutlichen, dass Kupfer und Suramin einen ähnlichen Mechanismus in neuronalen Zellen auslösen.

Auf eine Suramin-induzierte Missfaltung und anschließende Internalisierung folgt eine rasche Degradierung des missgefalteten Proteins in lysosomalen Kompartimenten (siehe Punkt 4.2.6). Dieser Mechanismus dient neuronalen Zellen offensichtlich zur Qualitätskontrolle, da so eine effiziente Entfernung von missgefaltetem, potentiell nicht-funktionellem PrP^C von der Zelloberfläche gewährleistet wird, wodurch auch die Anti-Prion-Aktivität von Suramin erklärt

werden kann (siehe Punkt 5.2.2). Im Gegensatz dazu dient wohl eine Kupfer-induzierte Missfaltung des Proteins primär als Stimulus für die Internalisierung von Kupfer-gebundenem PrP^C. Dieser Mechanismus könnte somit eine Bedeutung für die Kupfer-Homöostase oder die Signaltransduktion in neuronalen Zellen haben. Beides wurde als mögliche physiologische Funktion von PrP^C in Betracht gezogen (Rieger *et al.* 1997; Pauly und Harris 1998; Graner *et al.* 2000; Mouillet-Richard *et al.* 2000; Gauczynski *et al.* 2001; Sumudhu *et al.* 2001; Marella *et al.* 2002).

Da für die Internalisierung von PrP^C zwei verschiedene Wege vorgeschlagen wurden – die Endozytose über *coated pits* (Shyng *et al.* 1994; Sunyach *et al.* 2003) oder über caveoläre Strukturen (Vey *et al.* 1996; Kaneko *et al.* 1997; Marella *et al.* 2002; Peters *et al.* 2003) – stellt sich die Frage, ob PrP^C verschiedene Internalisierungswege verfolgen kann, um beispielsweise die eigene Degradierung einzuleiten oder eine Signalantwort auszulösen. Dies könnte durchaus der Fall sein, da kürzlich gezeigt wurde, dass Zelloberflächenproteine durch verschiedene Wege internalisiert und in unterschiedlichen endozytotischen Kompartimenten abgesondert werden können (Di Guglielmo *et al.* 2003).

5.2.2 Internalisierung von PrP^C als potentielle Anti-Prion-Strategie

In der vorliegenden Arbeit konnten neue Einblicke in den Wirkungsmechanismus der Anti-Prion-Substanz Suramin gewonnen werden. Die Anti-Prion-Aktivität beruht offensichtlich auf Entfernung von PrP^C von der Zelloberfläche durch Internalisierung und anschließende Degradierung.

Dieser Anti-Prion-Effekt lässt sich sehr gut mit Hilfe früherer Studien erklären. Die Zelloberfläche stellt ein Kompartiment für die Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} dar (Caughey und Raymond 1991; Taraboulos *et al.* 1995). Außerdem ist PrP^C für eine Propagierung von PrP^{Sc} notwendig. So sind transgene Mäuse, die kein PrP^C exprimieren ($Prnp^{0/0}$-Mäuse), selbst nach intrazerebraler Inokulation mit dem Erreger nicht infizierbar und können den Erreger nicht propagieren (Büeler *et al.* 1993). Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass selbst eine vorübergehende Entfernung von PrP^C von der Plasmamembran ausreichend für eine Anti-Prion-Aktivität ist. Sowohl Suramin als auch Kupfer interferieren mit der Propagierung von PrP^{Sc} in ScN2a-Zellen (siehe Punkt 4.2.9). Da Suramin auch in intrazelluläre Kompartimente wie

Endosomen, Lysosomen und den Golgi-Komplex aufgenommen werden kann (Stein *et al.* 1995; Huang *et al.* 1997), ist aber eine zusätzliche intrazelluläre Missfaltung von PrP^C durch eventuell internalisiertes Suramin nicht ganz auszuschließen.
Die Stimulierung der Endozytose von PrP^C bietet einen interessanten Ansatz für die Entwicklung von Anti-Prion-Strategien. Dennoch kann Suramin als Anti-Prion-Substanz nur begrenzt genutzt werden, da Suramin die Blut-Hirn-Schranke nicht effizient passieren kann. Außerdem sind die Folgen einer dauerhaften Modulierung der PrP^C-Biogenese durch Suramin aufgrund der ungeklärten Funktion von PrP^C nicht abschätzbar. Suramin könnte jedoch für prophylaktische Zwecke bei Risikogruppen, welche beispielsweise eine pathogene Mutation im Prion-Protein-Gen besitzen oder für eine Behandlung von Personen, welche unbeabsichtigt infektiösen Prionen exponiert wurden, nach einer genauen Untersuchung der Dosierung und der Applikationszeitpunkte eingesetzt werden.

5.3 Ausblick

Die Aufklärung des pathogenen Mechanismus und die Entwicklung effektiver Therapiemöglichkeiten stellen die größten Herausforderungen in der Prionforschung dar. Immortalisierte, neuronale Zellen der Maus (N2a-Zellen) sind ein ideales Modellsystem für die Untersuchung der PrP-Faltung und die Entwicklung neuer Anti-Prion-Strategien, aber auch für die Analyse bestimmter Aspekte der Prion-Erkrankungen, wie beispielsweise der Toxizität.
Es ist unbedingt notwendig die Natur der neurotoxischen Spezies und den Mechanismus der Neurodegeneration besser zu verstehen. Eine interessante Hypothese ist, dass PrP^{Sc} nicht das neurotoxische Agens darstellt. So konnte gezeigt werden, dass eine Missfaltung von PrP an der ER-Membran oder im Zytosol ohne die Bildung von Protease-resistentem und infektiösem PrP^{Sc} zu einer Neurodegeneration in transgenen Tieren führen kann (Hegde *et al.* 1998; Ma *et al.* 2002). Es erscheint also möglich, dass die Neurodegeneration bei Prion-Erkrankungen nicht mit einer einzigen Spezies oder pathogenen PrP-Konformation assoziiert ist. Es bleibt zu klären, welche Konformation diese toxischen Spezies jeweils besitzen und auf welche unterschiedliche Weise diese eine Neurodegeneration vermitteln können. In diesem

Zusammenhang wäre es interessant, die hier vorgestellten pathogenen Mutanten auf eine mögliche toxische Wirkung auf neuronale Zellen zu untersuchen.

Um den Mechanismus der Toxizität besser zu verstehen, ist es nötig die verschiedenen Signaltransduktionskaskaden in neuronalen Zellen genauer zu untersuchen. Für PrP^C konnten verschiedene Interaktionspartner identifiziert werden, welche in eine Signaltransduktion involviert sein könnten (Rieger *et al.* 1997; Graner *et al.* 2000; Gauczynski *et al.* 2001; Zanata *et al.* 2002). Auf welchem Weg eine Signalweiterleitung durch PrP^C erfolgen könnte, bleibt zu klären. Eine spezifische Antikörperbindung von PrP^C löst *in vivo* Apoptose in primären Neuronen aus, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass eine neuroprotektive Signalwirkung, die von PrP^C ausgeht, unterbrochen wird (Solforosi *et al.* 2004). Andererseits könnte auch eine andere Signalkaskade in Gang gesetzt werden, welche Toxizität induziert. Diese Auswirkungen könnten auch durch mögliche Zwischenprodukte hervorgerufen werden, welche beispielsweise während der Umfaltung von PrP^C spezifisch in Neuronen entstehen. Für letzteres sprechen wichtige Resultate einer *in vivo* Studie mit transgenen MloxP-Mäusen, bei welchen nach einer Inokulation mit Scrapie-Erregern ausschließlich die neuronale Expression von PrP^C eingestellt wurde (Mallucci *et al.* 2003). Zu diesem Zeitpunkt war bereits eine frühe Spongiose zu erkennen. Die Tiere zeigten jedoch nach längerer Beobachtung einen Rückgang der Spongiose und wiesen keine Neurodegeneration auf. Trotz einer massiven Ablagerung von PrP^{Sc} in nicht-neuronalem Gewebe, in welchem PrP^C weiterhin exprimiert wurde, konnte keine toxische Wirkung beobachtet werden. Die Tiere verblieben symptomfrei.

Trotz der zahlreichen Spekulationen um mögliche Mechanismen der Neurotoxizität, stellt die Beeinträchtigung der Konversion von PrP^C in PrP^{Sc} eine allgemeine Anti-Prion-Strategie dar. Eine Klärung des Mechanismus der Missfaltung von PrP^C könnte dazu führen, effektivere Anti-Prion-Strategien zu entwickeln und mehr Substanzen zu identifizieren, welche auf ähnliche Weise protektiv wirken. Da die Konformationsänderung von PrP^C bei hereditären Prion-Erkrankungen, anders als bei infektiösen Prion-Erkrankungen, ohne exogenes PrP^{Sc} stattfindet, könnte eine Untersuchung krankheitsassoziierter PrP-Mutanten wesentlich dazu beitragen, den Mechanismus der Missfaltung zu klären. Während N2a-Zellen ein ideales System darstellen, um Mechanismen der PrP^C-Konversion und der Anti-Prion-Effekte verschiedener Substanzen zu untersuchen, sind Scrapie-infizierte N2a-Zellen sehr gut für die schnelle Suche und Identifizierung von Anti-Prion-Substanzen geeignet

(Winklhofer *et al.* 2001). Leider ist aber aufgrund des äußerst progressiven Krankheitsverlaufs nach Auftreten der klinischen Symptome und einer fehlenden Frühdiagnose, eine effektive Therapie von Prion-Erkrankungen in naher Zukunft nicht abzusehen. Daher konzentrieren sich derzeitige Bemühungen vor allem weiterhin darauf, Möglichkeiten zur Frühdiagnose und Prophylaxe zu bieten.

6. Zusammenfassung

Prion-Erkrankungen sind tödlich verlaufende, neurodegenerative Erkrankungen, die sporadischen, hereditären oder infektiösen Ursprungs sein können. Die Missfaltung des zellulären Prion-Proteins (PrP^C) spielt eine zentrale Rolle bei der Pathogenese.
In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Themenbereiche bearbeitet: zum einen die Analyse der Faltung und Maturierung krankheitsassoziierter Mutanten und zum anderen die Wirkung einer Anti-Prion-Substanz auf die Biogenese von PrP^C und die Propagierung von infektiösem PrP^{Sc}. Hierfür wurden verschiedene humanpathogene Mutanten, sowie andere Punkt- und Deletionsmutanten in Maus-Neuroblastomzellen untersucht.
Im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass zwei Mutationen, die Prion-Erkrankungen beim Menschen hervorrufen (T183A und F198S), die Faltung und Biogenese von PrP beeinträchtigen. Im Gegensatz zu PrP^C, nehmen diese Mutanten im ER spontan eine missgefaltete Konformation an und erhalten weder eine komplexe Glykosilierung noch einen GPI-Anker. Die missgefalteten Mutanten werden nicht durch eine ER-assoziierte Degradierung eliminiert, sondern in ihrer High Mannose Form sekretiert. Darüber hinaus können die sekretierten Formen von benachbarten Zellen wieder aufgenommen werden. Diese Studie leistet einen wichtigen Beitrag zur Klärung der Missfaltung von T183A und F198S, welche offenbar mit einer Destabilisierung des hydrophoben Cores von PrP assoziiert ist und verdeutlicht außerdem, dass ein Zusammenhang zwischen der Faltung und den posttranslationalen Modifikationen von PrP besteht.
Der zweite Teil der Arbeit konzentriert sich auf den Wirkungsmechanismus der Anti-Prion-Substanz Suramin. Es konnte gezeigt werden, dass der Effekt von Suramin auf einer Entfernung von PrP^C von der Zelloberfläche beruht. So induziert Suramin eine Missfaltung von PrP^C an der Plasmamembran, was eine anschließende Internalisierung und rasche Degradierung zur Folge hat. Dabei sind Missfaltung und Internalisierung zwei aufeinander folgende Prozesse, die von unterschiedlichen Domänen von PrP^C vermittelt werden. Während die Suramin-induzierte Missfaltung vom proximalen Bereich des C-Terminus abhängt, ist der N-Terminus für die Endozytose verantwortlich. Diese Analyse verdeutlicht, dass in neuronalen Zellen eine Qualitätskontrolle zur Entfernung missgefalteter PrP-Formen von der

Zelloberfläche besteht und liefert außerdem einen entscheidenden Ansatz für die Entwicklung effizienterer Anti-Prion-Strategien.

7. Glossar

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Baf	Bafilomycin
BiP	bindendes Protein (*binding protein*)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin*)
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
CHO	komplexes Glykan
Ci	Curie
CJK	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
$CuSO_4$	Kupfer
CWD	*Chronic Wasting Disease*
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
dCTP	Deoxycytosintriphosphat
dGTP	Deoxyguanosintriphosphat
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DMJ	1-Desoxymannojirimycin
DMSO	Dimethylsufoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Desoxycholat
DTT	Dithiothreitol
ECL	*Enhanced Chemiluminescence*
E.Coli	*Escherichia Coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EndoH	Endo-β-N-Acetylglucosamidase, Endoglykosidase H
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assoziierte Degradierung
EUE	*Exotic Ungulate Encephalopathy*

FCS	Fötales Kälberserum (*fetal calf serum*)
FFI	Fatale Familiäre Insomnie
Fil	Filipin
FSE	Feline Spongiforme Enzephalopathie
Glc	Glucose
GlucNAc	N-Acetylglucosamin
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom
HD	Hydrophobe Domäne
HRP	Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*)
Hsp	Hitzeschockprotein
IF	Immunfluoreszenz
kb	Kilobasenpaare
kDa	10^3 Dalton, Molekulargewicht von Proteinen
Leu	Leupeptin
Man	Mannose
MEM	*Minimum Essential Medium*
MG132	Carboxybenzoyl-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucinal
N-Glykosilierung	Asparagin-gekoppelte Glykosilierung
NMR	Kernresonanzspektroskopie
OD_x	optische Dichte bei λ = x nm
OR	Oktarepeats
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte physiologische Kochsalzlösung (*phosphate buffered saline*)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*)
PEG	Polyethylenglykol
Pep	Pepstatin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+-Ionenkonzentration
PIPLC	Phosphatidylinositol-Phospholipase C
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

PNGase F	N-Glycosidase F
PRNP	Prion-Protein-Gen
PrP	Prion-Protein
PrP^{C}	zelluläres PrP
PrP^{Sc}	Scrapie-Form von PrP
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute*)
RT	Raumtemperatur
SAF	Scrapie-assoziierte Fibrillen
SAP	Alkalische Phosphatase (*shrimp alkaline phosphatase*)
Sarkosyl	N-Lauroylsarkosin
Sc	Scrapie
SDS	Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecylsulfate*)
SOD	Superoxiddismutase
SRP	Signalerkennungspartikel (*signal recognition particle*)
SS	Signalsequenz
STI 1	Stress-induzierbares Protein 1
Su	Suramin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TE	Tris-EDTA
tg	transgen
TM	Tiermehl
TME	Transmissible Nerz (*Mink*) Enzephalopathie
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	t-Octyl-Phenoxy-Polyethoxyethanol
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
UPR	*Unfolded Protein Response*
wt	Wildtyp
zyto PrP	zytosolische Form von PrP

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

8. Literaturverzeichnis

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

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

Alper, T., D. A. Haig*, et al.* (1966). "The exceptionally small size of the scrapie agent." Biochem Biophys Res Commun **22**(3): 278-84.

Alpers, M. (1979). "Epidemiology and ecology of kuru." In: Prusiner, S.B., Hadlow, W.J., editors. Slow transmissible diseases of the nervous system. New York: Academic Press **1**: 67-90.

Anderson, R. M., C. A. Donnelly*, et al.* (1996). "Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle." Nature **382**: 779-788.

Appel, T. R., C. Dumpitak*, et al.* (1999). "Prion rods contain an inert polysaccharide scaffold." Biol Chem **380**(11): 1295-306.

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

Basler, K., B. Oesch*, et al.* (1986). "Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene." Cell **46**(3): 417-28.

Bause, E. (1983). "Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes." Biochem J **209**: 331-336.

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

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

Besnoit, C. (1899). "La tremblante ou névrite périphérique enzootique du mouton." Rev Vét **23**: 307-43.

Besnoit, C. und C. Morel (1898). "Note sur les lésions nerveuses de la tremblante du mouton." Rev Vét **23**: 397-400.

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

Bolard, J. (1986). "How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties?" Biochim Biophys Acta **864**: 257-304.

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

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

Bosque, P. J., C. Ryou, *et al.* (2002). "Prions in skeletal muscle." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(6): 3812-7.

Bradley, R. und J. W. Wilesmith (1993). "Epidemiology and control of bovine spongiform encephalopathy (BSE)." Br Med Bull **49**(4): 932-59.

Brandner, S., S. Isenmann, *et al.* (1996). "Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity." Nature **379**: 339-343.

Bresjanac, M., L. M. Smid, *et al.* (2003). "Molecular-imaging probe 2-(1-[6-[(2-fluoroethyl)(methyl) amino]-2-naphthyl]ethylidene) malononitrile labels prion plaques in vitro." J Neurosci **23**(22): 8029-33.

Broussolle, E., A. Setiey, *et al.* (1989). "Reversible Creutzfeldt-Jakob like syndrome induced by lithium plus levodopa treatment." Neurol Neurosurg Psychiatry **52**(5): 686-7.

Brown, D. R., K. Qin, *et al.* (1997). "The cellular prion protein binds copper in vivo." Nature **390**: 684-687.

Brown, D. R., W. J. Schulz-Schaeffer, *et al.* (1997). "Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity." Exp Neurol **146**: 104-112.

Brown, P. (1992). "The phenotypic expression of different mutations in transmissible human spongiform encephalopathy." Rev Neurol **148**(5): 317-27.

Brown, P., C. J. Gibbs, Jr., *et al.* (1994). "Human spongiform encephalopathy: the National Institutes of Health series of 300 cases of experimentally transmitted disease." Ann Neurol **35**(5): 513-29.

Brown, P., R. G. Will, *et al.* (2001). "Bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease: background, evolution, and current concerns." Emerg Infect Dis **7**(1): 6-16.

Bruce, M. E., R. G. Will, *et al.* (1997). "Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent." Nature **389**(6650): 498-501.

Budka, H., J. A. Hainfellner, *et al.* (1997). "A new Austrian family with fatal familial insomnia: brain pathology without detectable PrPres." Brain Pathol **7**: 1267.

Büeler, H., A. Aguzzi, *et al.* (1993). "Mice devoid of PrP are resistant to scrapie." Cell **73**: 1339-1347.

Büeler, H., M. Fischer, *et al.* (1992). "Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein." Nature **356**: 577-582.

Burda, P. und M. Aebi (1999). "The dolichol pathway of N-linked glycosylation." Biochim Biophys Acta **1426**(2): 239-57.

Butler, D. A., M. R. D. Scott, *et al.* (1988). "Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins." J. Virol. **62**: 1558-1564.

Caughey, B., R. E. Race, *et al.* (1989). "Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells." J. Virol. **63**: 175-181.

Caughey, B. und G. J. Raymond (1991). "The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive." J. Biol. Chem. **266**: 18217-18223.

Caughey, B. und G. J. Raymond (1993). "Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured cells." J Virol **67**(2): 643-50.

Caughey, W. S., L. D. Raymond, *et al.* (1998). "Inhibition of protease-resistant prion protein formation by porphyrins and phthalocyanines." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12117-12122.

Chandler, R. L. (1961). "Encephalopathy in mice produced with scrapie brain material." Lancet **i**: 1378-1379.

Chau, V., J. W. Tobias, *et al.* (1989). "A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein." Science **243**(4898): 1576-83.

Chesebro, B., R. Race, *et al.* (1985). "Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain." Nature **315**(6017): 331-333.

Chiesa, R., P. Piccardo, *et al.* (1998). "Neurological illness in transgenic mice expressing a prion protein with an insertional mutation." Neuron **21**: 1339-1351.

Collinge, J. (2001). "Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis." Annu Rev Neurosci **24**: 519-550.

Collinge, J., K. C. Sidle, *et al.* (1996). "Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD [see comments]." Nature **383**(6602): 685-90.

Collinge, J., M. A. Whittington, *et al.* (1994). "Prion protein is necessary for normal synaptic function." Nature **370**: 295-297.

Collins, S., C. A. McLean, *et al.* (2001). "Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome,fatal familial insomnia, and kuru: a review of these less common human transmissible spongiform encephalopathies." J Clin Neurosci **8**(5): 387-97.

Connolly, T. und R. Gilmore (1989). "The signal recognition particle receptor mediates the GTP-dependent displacement of SRP from the signal sequence of the nascent polypeptide." Cell **57**(4): 599-610.

Creutzfeldt, H. G. (1920). "Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems." Z Gesamte Neurol Psychatrie **57**: 1-18.

Cuille, J. und P. L. Chelle (1936). "La maladie dite de la tremblante du mouton est-elle inoculable?" C.R. Seances Acad. Sci. **26**: 1552-54.

Cutlip, R. C., J. M. Miller*, et al.* (1994). "Intracerebral transmission of scrapie to cattle." J Infect Dis **169**(4): 814-20.

Dalley, J. A. und N. J. Bulleid (2003). "The endoplasmic reticulum (ER) translocon can differentiate between hydrophobic sequences allowing signals for glycosylphosphatidylinositol anchor addition to be fully translocated into the ER lumen." J Biol Chem **278**(51): 51749-51757.

Davanipour, Z., L. Goodman*, et al.* (1984). "Possible modes of transmission of Creutzfeldt-Jakob disease." N Engl J Med **311**(24): 1582-3.

Denny, G. O., J. W. Wilesmith*, et al.* (1992). "Bovine spongiform encephalopathy in Northern Ireland: epidemiological observations 1988-1990." Vet. Rec. **130**(6): 113-6.

Di Guglielmo, G. M., C. Le Roy*, et al.* (2003). "Distinct endocytic pathways regulate TGF- receptor signalling and turnover." Nature Cell Biol **5**: 410-421.

Dlouhy, S. R., K. Hsiao*, et al.* (1992). "Linkage of the Indiana kindred of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease to the prion protein gene." Nat Genet **1**(1): 64-7.

Doherr, M. G., D. Heim*, et al.* (1999). "Modelling the expected numbers of preclinical and clinical cases of bovine spongiform encephalopathy in Switzerland." Vet. Rec. **145**(6): 155-60.

Doh-ura, K., K. Ishikawa*, et al.* (2004). "Treatment of Transmissible Spongiform Encephalopathy by Intraventricular Drug Infusion in Animal Models." J Virol **78**: 4999-5006.

Donne, D. G., J. H. Viles*, et al.* (1997). "Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible." Proc Natl Acad Sci USA **94**(25): 13452-57.

Dorner, A. J., L. C. Wasley*, et al.* (1990). "The stress response in Chinese hamster ovary cells. Regulation of ERp72 and protein disulfide isomerase expression and secretion." J Biol Chem **265**(35): 22029-34.

Dressel, J. und R. E. Oesper (1961). "The discovery of Germanin by Oskar Dressel and Richard Kothe." J Chem Educ **38**: 620-621.

Duffy, P., J. Wolf*, et al.* (1974). "Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease." N Engl J Med **290**: 692-693.

Eigen, M. (1996). "Prionics or the kinetic basis of prion diseases." Biophys. Chem. **10**(1): A1-18.

Ellis, R. J. und F. U. Hartl (1999). "Principles of protein folding in the cellular environment." Curr Opin Struct Biol **9**(1): 102-10.

Enari, M., E. Flechsig*, et al.* (2001). "Scrapie prion protein accumulation by scrapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody." Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **98**(16): 9295-9299.

Endo, T., D. Groth*, et al.* (1989). "Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein." Biochemistry **28**(21): 8380-8388.

Englund, P. T. (1993). "The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors." Annu Rev Biochem **62**: 121-38.

Ferguson, M. A. J. und A. F. Williams (1988). "Cell-surface anchoring of protein via glycosyl-phosphatidylinositol structures." Annu. Rev. Biochem. **57**: 285-320.

Finley, D., A. Ciechanover*, et al.* (1984). "Thermolability of ubiquitin-activating enzyme from the mammalian cell cycle mutant ts85." Cell **37**(1): 43-55.

Fournier, J. G., F. Escaig-Haye*, et al.* (1995). "Ultrastructural localization of cellular prion protein (PrPc) in synaptic boutons of normal hamster hippocampus." C R Acad Sci III **318**.

Friedlander, R., E. Jarosch*, et al.* (2000). "A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response." Nat Cell Biol **2**(7): 379-84.

Gabizon, R., H. Rosenmann*, et al.* (1993). "Mutation and polymorphism of the prion protein gene in Libyan Jews with Creutzfeldt-Jakob disease (CJD)." Am J Hum Genet **53**(4): 828-35.

Gabriel, J. M., B. Oesch*, et al.* (1992). "Molecular cloning of a candidate chicken prion protein." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(19): 9097-101.

Gahmberg, C. G. und M. Tolvanen (1996). "Why mammalian cell surface proteins are glycoproteins." Trends Biochem Sci **21**(8): 308-11.

Gajdusek, D. C., C. J. J. Gibbs*, et al.* (1966). "Experimental transmission of a kuru-like syndrome to chimpanzees." Nature **209**: 794-796.

Gajdusek, D. C. und V. Zigas (1957). "Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea: epidemic occurence of "kuru" in the native population." N Engl J Med **257**: 974-978.

Gasset, M., M. A. Baldwin*, et al.* (1993). "Perturbation of the secondary structure of the scrapie prion protein under conditions that alter infectivity." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(1): 1-5.

Gauczynski, S., J. M. Peyrin*, et al.* (2001). "The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein." Embo J **20**(21): 5863-75.

Gekko, K. und S. N. Timasheff (1981). "Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures." Biochemistry **20**: 4667-4676.

Gekko, K. und S. N. Timasheff (1981). "Thermodynamic and kinetic examination of protein stabilization by glycerol." Biochemistry **20**: 4677-4686.

Gerstmann, J., E. Sträussler*, et al.* (1936). "Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns." Z Neurol **154**: 736-762.

Gething, M. J. und J. Sambrook (1992). "Protein folding in the cell." Nature **355**(6355): 33-45.

Gibbons, R. A. und G. D. Hunter (1967). "Nature of the scrapie agent." Nature **215**: 1041-1043.

Gibbs, C. J. J., D. C. Gajdusek*, et al.* (1968). "Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee." Science **161**: 388-389.

Gilch, S., K. F. Winklhofer*, et al.* (2001). "Intracellular re-routing of prion protein prevents propagation of PrPSc and delays onset of prion diseases." EMBO J **20**: 3957-3966.

Gilch, S., F. Wopfner*, et al.* (2003). "Polyclonal anti-PrP auto-antibodies induced with dimeric PrP interfere efficiently with PrPSc propagation in prion-infected cells." J Biol Chem **278**(20): 18524-31.

Gilmore, R., G. Blobel*, et al.* (1982). "Protein translocation across the endoplasmic reticulum. I. Detection in the microsomal membrane of a receptor for the signal recognition particle." J Cell Biol **95**(95): 463-469.

Görlich, D., E. Hartmann*, et al.* (1992). "A protein of the endoplasmatic reticulum involved early in polypeptide translocation." Nature **357**: 47-52.

Graner, E., A. F. Mercadante*, et al.* (2000). "Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis." Brain Res Mol Brain Res **76**: 85-92.

Grasbon-Frodl, E., H. Lorenz*, et al.* (2004). "Loss of glycosylation associated with the T183A mutation in human prion disease." Acta Neuropathol **108**(6): 476-84.

Griffith, J. S. (1967). "Self-replication and scrapie." Nature **215**: 1043-1044.

Hadlow, W. J. (1959). "Scrapie and kuru." Lancet **2**: 289-290.

Hammond, C., I. Braakman*, et al.* (1994). "Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(3): 913-7.

Haraguchi, T., S. Fisher*, et al.* (1989). "Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins." Arch Biochem Biophys **274**(1): 1-13.

Harmey, J. H., D. Doyle*, et al.* (1995). "The cellular isoform of the prion protein, PrPc, is associated with caveolae in mouse neuroblastoma (N2a) cells." Biochem Biophys Res Commun **210**(3): 753-9.

Hartl, F. U. (1996). "Molecular chaperones in cellular protein folding." Nature **381**(6583): 571-9.

Hartl, F. U. und M. Hayer-Hartl (2002). "Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein." Science **295**(5561): 1852-8.

Hartsough, G. R. und D. Burger (1965). "Encephalopathy of mink. I. Epizootiologic and clinical observations." J Infect Dis **115**(4): 387-392.

Hebert, D. H., B. Foellmer*, et al.* (1995). "Calnexin and calreticulin promote folding, delay oligomerization and suppress degradation of influenza hemagglutinin in microsomes." Embo J **12**: 2961-68.

Hegde, R. S., J. A. Mastrianni*, et al.* (1998). "A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease." Science **279**(5352): 827-834.

Hegde, R. S., P. Tremblay*, et al.* (1999). "Transmissible and genetic prion diseases share a common pathway of neurodegeneration [see comments]." Nature **402**(6763): 822-826.

Helenius, A., E. S. Trombetta*, et al.* (1997). "Calnexin, calreticulin and the folding of glycoproteins." Trends Cell Biol **7**: 193-200.

Heller, U., K. F. Winklhofer*, et al.* (2003). "Post-translational import of the prion protein into the endoplasmic reticulum interferes with cell viability: a critical role for the putative transmembrane domain." J Biol Chem **278**: 36139-36147.

Herms, J., T. Tings*, et al.* (1999). "Evidence of presynaptic location and function of the prion protein." J Neurosci **19**: 8866-8875.

Heske, J., U. Heller*, et al.* (2004). "The C-terminal domain of the prion protein is necessary and sufficient for import into the endoplasmic reticulum." J Biol Chem **279**: 5435-5443.

Higuchi, R. (1990). Recombinant PCR. PCR protocols. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White. San Diego, CA, USA, Academic Press**:** 177-183.

Hill, A. F., M. Antoniou, *et al.* (1999). "Protease-resistant prion protein produced in vitro lacks detectable infectivity." J. Gen. Virol. **80**: 11-14.

Hornemann, S. und R. Glockshuber (1996). "Autonomous and Reversible Folding of a Soluble Amino-Terminally Truncated Segment of the Mouse Prion protein." J. Mol. Biol. **262**: 614-619.

Hornemann, S., C. Korth, *et al.* (1997). "Recombinant full-length murine prion protein, mPrP(23-231): purification and spectroscopic characterization." FEBS Lett **413**(2): 277-81.

Hornlimann, B., D. Guidon, *et al.* (1994). "Risk assessment for importing bovine spongiform encephalopathy (BSE)." Dtsch Tierarztl Wochenschr **101**(7): 295-8.

Hornshaw, M. P., J. R. McDermott, *et al.* (1995). "Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein." Biochem Biophys Res Commun **207**(2): 621-629.

Hornshaw, M. P., J. R. McDermott, *et al.* (1995). "Copper binding to the N-terminal tandem repeat region of mammalian and avian prion protein: structural studies using synthetic peptides." Biochem Biophys Res Commun **214**(3): 993-9.

Hourrigan, J., A. Klingsporn, *et al.* (1979). "Epidemiology of scrapie in the United States." In: Prusiner, S.B., Hadlow, W.J., editors. Slow transmissible diseases of the nervous system. New York: Academic Press **1**: 331-65.

Hsiao, K., H. F. Baker, *et al.* (1989). "Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Sträussler syndrome." Nature **338**: 342-345.

Hsiao, K. und S. B. Prusiner (1990). "Inherited human prion diseases." Neurology **40**(12): 1820-7.

Huang, S. S., H. A. Koh, *et al.* (1997). "Suramin enters and accumulates in low pH intracellular compartments of v-sis-transformed NIH 3T3 cells." FEBS Lett **416**(3): 297-301.

Hurtley, S. M. und A. Helenius (1989). "Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum." Annu Rev Cell Biol **5**: 277-307.

Ingrosso, L., A. Ladogana, *et al.* (1995). "Congo red prolongs the incubation period in scrapie-infected hamsters." J Virol **69**(1): 506-8.

Jackson, G. S., L. L. P. Hosszu, *et al.* (1999). "Reversible conversion of monomeric human prion protein between native and fibrilogenic conformations." Science **283**(5409): 1935-1937.

Jackson, G. S., I. Murray, *et al.* (2001). "Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein." Proc Natl Acad Sci U S A **98**: 8531-8535.

Jakob, A. (1921). "Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen Befunde (spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden)." Z Gesamte Neurol Psychatrie **64**: 147-228.

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

James, T. L., H. Liu*, et al.* (1997). "Solution structure of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(19): 10086-91.

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

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

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

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

Johnson, R. T. und C. J. J. Gibbs (1998). "Creutzfeldt-Jakob Disease and Related Transmissible Spongifom Encephalopathies." N Engl J Med **339**: 1994-2004.

Kaneko, K., D. Peretz*, et al.* (1995). "Prion protein (PrP) synthetic peptides induce cellular PrP to acquire properties of the scrapie isoform." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **32**: 11160-11164.

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

Kaneko, K., H. Wille*, et al.* (1997). "Molecular properties of complexes formed between the prion protein and synthetic peptides." J. Mol. Biol. **270**: 574-586.

Kiachopoulos, S., J. Heske*, et al.* (2004). "Misfolding of the prion protein at the plasma membrane induces endocytosis, intracellular retention and degradation." Traffic **5**: 426-436.

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

Kitamoto, T., R. Iizuka, *et al.* (1993). "An amber mutation of prion protein in Gerstmann-Sträussler syndrome with mutant PrP plaques." Biochem. Biophys. Res. Commun. **192**: 525-531.

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

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

Klein, T. R., D. Kirsch, *et al.* (1998). "Prion rods contain small amounts of the two host sphingolipidis as revealed by thin-layer chromatography and mass spectrometry." Biol. Chem. **379**: 655-666.

Klitzman, R. L., M. P. Alpers, *et al.* (1984). "The natural incubation period of kuru and the episodes of transmission in three clusters of patients." Neuroepidemiology **3**: 3-20.

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

Kodukula, K., L. D. Gerber, *et al.* (1993). "Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored membrane proteins in intact cells: specific amino acid requirements adjacent to the site of cleavage and GPI attachment." J. Cell Biol. **120**: 657-664.

Kondo, K. und Y. Kuroiwa (1982). "A case control study of Creutzfeldt-Jakob disease: association with physical injuries." Ann Neurol **11**(4): 377-81.

Kornfeld, R. und S. Kornfeld (1985). "Assembly of asparagine-linked oligosaccharides." Annu Rev Biochem **54**: 631-664.

Korth, C., K. Kaneko, *et al.* (2000). "Expression of unglycosylated mutated prion protein facilitates PrPSc formation in neuroblastoma cells infected with different prion strains." J. Gen. Virol **81**(Part 10): 2555-2563.

Korth, C., B. C. May, *et al.* (2001). "Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(17): 9836-41.

Kozutsumi, Y., M. Segal, *et al.* (1988). "The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins." Nature **332**(6163): 462-4.

Kramer, M. L., H. D. Kratzin, *et al.* (2001). "Prion protein binds copper within the physiological concentration range." J Biol Chem **276**(20): 16711-16719.

Kraulis, P. (1991). "MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures." J. Appl. Cryst. **24**: 946-950.

Kretzschmar, H. A., S. B. Prusiner, *et al.* (1986). "Scrapie prion proteins are synthesized in neurons." Am J Pathol **122**(1): 1-5.

Ladogana, A., P. Casaccia, *et al.* (1992). "Sulphate polyanions prolong the incubation period of scrapie-infected hamsters." J Gen Virol **73**(3): 661-5.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4." Nature **227**: 680-685.

Lasmézas, C. I., J.-P. Deslys, *et al.* (1996). "BSE transmission to macaques." Nature **381**: 743-744.

Lee, A. S. (1987). "Coordinate regulation of a set of genes by glucose and calcium ionophores in mammalian cells." Trends Biochem Sci **12**: 20-23.

Legname, G., I. V. Baskakov, *et al.* (2004). "Synthetic mammalian prions." Science **305**(5684): 673-676.

Lehmann, S. und D. A. Harris (1997). "Blockade of glycosylation promotes acquisition of scrapie-like properties by the prion protein in cultured cells [published erratum appears in J Biol Chem 1998 Mar 6;273(10):5988]." J Biol Chem **272**(34): 21479-87.

Leopoldt, J. G. (1759). Von denen mancherley Krankheiten des Schaafviehes, und was vor Euren damit vorgenommen werden. Nützliche und auf die Erfahrung gegründete Einleitung zu der Landwirthschaft. Fünf Theile. Berlin und Glogau, Christian Friedrich Günthern**:** 344-360.

Liemann, S. und R. Glockshuber (1999). "Influence of amino acid substitutions related to inherited human prion diseases on the thermodynamic stability of the cellular prion protein." Biochemistry **38**(11): 3258-3267.

Little, E. und A. S. Lee (1995). "Generation of a mammalian cell line deficient in glucose-regulated protein stress induction through targeted ribozyme driven by a stress-inducible promoter." J Biol Chem **270**(16): 9526-34.

Lopez, C. D., C. S. Yost, *et al.* (1990). "Unusual topogenic sequence directs prion protein biogenesis." Science **248**(4952): 226-229.

Lopez Garcia, F., R. Zahn, *et al.* (2000). "NMR structure of the bovine prion protein." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(15): 8334-9.

Lowe, M. E. (1992). "Site-specific mutations in the COOH-terminus of placental alkaline phosphatase: a single amino acid change converts a phosphatidylinositol-glycan-anchored protein to a secreted protein." J Cell Biol **116**(3): 799-807.

Lugaresi, E., R. Medori, *et al.* (1986). "Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei." N Engl J Med **315**(16): 997-1003.

Lysek, D. A., C. Schorn, *et al.* (2005). "Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(3): 640-5.

Ma, J., R. Wollmann, *et al.* (2002). "Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol." Science **298**(5599): 1781-5.

Maley, F., R. B. Trimble, *et al.* (1989). "Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases." Anal Biochem **180**(2): 195-204.

Mallucci, G., A. Dickinson, *et al.* (2003). "Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis." Science **302**: 871-874.

Mallucci, G., S. Ratte, *et al.* (2002). "Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration." Embo J **21**(3): 202-10.

Manson, J., J. D. West, *et al.* (1992). "The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis?" Development **115**: 117-122.

Manson, J. C., A. R. Clarke, *et al.* (1994). "Prp gene dosage determines the timing but not the final intensity or distribution of lesions in scrapie pathology." Neurodegeneration **3**(4): 331-40.

Manson, J. C., J. Hope, *et al.* (1995). "PrP gene dosage and long term potentiation." Neurodegeneration **4**(1): 113-4.

Marella, M., S. Lehmann, *et al.* (2002). "Filipin prevents pathological prion protein accumulation by reducing endocytosis and inducing cellular PrP release." J Biol Chem **277**(28): 25457-25464.

Martins, V. R., E. Graner, *et al.* (1997). "Complementary hydropathy identifies a cellular prion protein receptor." Nat Med **3**(12): 1376-82.

Matlack, K. E., W. Mothes, *et al.* (1998). "Protein translocation: tunnel vision." Cell **92**(3): 381-90.

McArthur, A. J., G. M.U., *et al.* (1991). "Melatonin directly resets the rat suprachiasmatic circadian clock in vitro." Brain Res **565**(1): 158-61.

McCracken, A. A. und J. L. Brodsky (1996). "Assembly of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin, and ATP." J Cell Biol **132**(3): 291-8.

McCracken, A. A. und J. L. Brodsky (2003). "Evolving questions and paradigm shifts in endoplasmic-reticulum-associated degradation (ERAD)." Bioessays **25**(9): 868-77.

McGookey, D. J., K. Fagerberg, *et al.* (1983). "Filipin-cholesterol complexes form in uncoated vesicle membrane derived from coated vesicles during receptor-mediated endocytosis of low density lipoprotein." J Cell Biol **96**(5): 1273-1278.

McGowan, J. P. (1922). "Scrapie in sheep." Scottish J Agric **5**: 365-375.

McKinley, M. P., D. C. Bolton, *et al.* (1983). "A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion." Cell **35**(1): 57-62.

McKinley, M. P., R. K. Meyer, *et al.* (1991). "Scrapie prion rod formation in vitro requires both detergent extraction and limited proteolysis." J Virol **65**(3): 1340-51.

Medori, R., P. Montagna, *et al.* (1992). "Fatal familial insomnia: a second kindred with mutation of prion protein gene at codon 178." Neurology **42**(3): 669-70.

Medori, R., H.-J. Tritschler, *et al.* (1992). "Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene." N. Engl. J. Med. **326**: 444-449.

Merrit, E. A. und D. J. Bacon (1997). "Raster3D photorealistic graphics." Methods. Enzymol. **277**: 505-524.

Merz, P. A., R. A. Somerville, *et al.* (1981). "Abnormal fibrils from scrapie-infected brain." Acta Neuropathol **54**(1): 63-74.

Mesaeli, N., K. Nakamura, *et al.* (1999). "Calreticulin is essential for cardiac development." J Cell Biol **144**(5): 857-68.

Meyer, D. I. und B. Dobberstein (1980). "Identification and characterization of a membrane component essential for the translocation of nascent proteins across the membrane of the endoplasmic reticulum." J Cell Biol **87**: 503-508.

Miura, T., A. Hori-i, *et al.* (1996). "Metal-dependent alpha-helix formation promoted by the glycine-rich octapeptide region of prion protein." FEBS Lett **396**: 248-52.

Molinari, M. und A. Helenius (1999). "Glycoproteins form mixed disulphides with oxidoreductases during folding in living cells." Nature **402**(6757): 90-3.

Moran, P., H. Raab, *et al.* (1991). "Glycophospholipid membrane anchor attachment. Molecular analysis of the cleavage/attachment site." J. Biol. Chem. **266**: 1250-1257.

Moremen, K. W., R. B. Trimble, *et al.* (1994). "Glycosidases of the asparagine-linked oligosaccharide processing pathway." Glycobiology **4**(2): 113-25.

Mori, K., A. Sant, *et al.* (1992). "A 22 bp cis-acting element is necessary and sufficient for the induction of the yeast KAR2 (BiP) gene by unfolded proteins." Embo J **11**(7): 2583-93.

Morillas, M., W. Swietnicki, *et al.* (1999). "Membrane environment alters the conformational structure of the recombinant human prion protein." J. Biol. Chem **274**(52): 36859-36865.

Mouillet-Richard, S., M. Ermonval, *et al.* (2000). "Signal Transduction Through Prion protein." Science **289**: 1925-1928.

Muramoto, T., S. J. DeArmond, *et al.* (1997). "Heritable disorder resembling neuronal storage disease in mice expressing prion protein with deletion of an α-helix." Nat. Med. **3**: 750-755.

Netzer, W. J. und F. U. Hartl (1998). "Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and -independent mechanisms." Trends Biochem Sci **23**(2): 68-73.

Ng, D. T., E. D. Spear, *et al.* (2000). "The unfolded protein response regulates multiple aspects of secretory and membrane protein biogenesis and endoplasmic reticulum quality control." J Cell Biol **150**(1): 77-88.

Nitrini, R., S. Rosemberg, *et al.* (1997). "Familial spongiform encephalopathy associated with a novel prion protein gene mutation." Ann Neurol **42**(2): 138-146.

Nunziante, M., S. Gilch, *et al.* (2003). "Essential role of the prion protein N terminus in subcellular trafficking and half-life of cellular prion protein." J Biol Chem **278**(6): 3726-3734.

Nuoffer, C., A. Horvath, *et al.* (1993). "Analysis of the sequence requirements for glycosylphosphatidylinositol anchoring of Saccharomyces cerevisiae Gas1 protein." J Biol Chem **268**(14): 10558-63.

Nuoffer, C., P. Jeno, *et al.* (1991). "Determinants for glycophospholipid anchoring of the Saccharomyces cerevisiae GAS1 protein to the plasma membrane." Mol Cell Biol **11**(1): 27-37.

Oesch, B., D. Westaway, *et al.* (1985). "A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein." Cell **40**: 735-746.

Oidtmann, B., D. Simon, *et al.* (2003). "Identification of cDNAs from Japanese pufferfish (Fugu rubripes) and Atlantic salmon (Salmo salar) coding for homologues to tetrapod prion proteins." FEBS Lett **538**: 96-100.

Oliver, J. D., F. J. van der Wal, *et al.* (1997). "Interaction of the thiol-dependent reductase ERp57 with nascent glycoproteins." Science **275**(5296): 86-8.

Ou, W. J., P. H. Cameron, *et al.* (1993). "Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation." Nature **364**(6440): 771-6.

Oxenkrug, G. F. und P. J. Requintina (1998). "The effect of MAO-A inhibition and cold-immobilization stress on N-acetylserotonin and melatonin in SHR and WKY rats." J Neural Transm Suppl **52**: 333-6.

Pan, K.-M., M. Baldwin, *et al.* (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). "Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation." Biochem **348**: 1-13.

Pattison, I. H. (1965). Experiments with scrapie with special reference to the nature of the agent and the pathology of the disease. Slow, latent and temperate virus infections, NINDB Monograph 2. D. C. Gajdusek, C. J. J. Gibbs and M. P. Alpers. Washington, DC, USA, U.S. Government Printing**:** 249-257.

Paulson, J. C. (1989). "Glycoproteins: what are the sugar chains for?" Trends Biochem Sci **14**(7): 272-6.

Pauly, P. C. und D. A. Harris (1998). "Copper stimulates endocytosis of the prion protein." J Biol Chem **273**(50): 33107-33110.

Pearson, G. R., T. J. Gruffydd-Jones*, et al.* (1991). "Feline spongiform encephalopathy." Vet Rec **128**(22): 532.

Peretz, D., R. A. Williamson*, et al.* (2001). "Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity." Nature **412**(6848): 739-743.

Peters, P. J., A. J. Mironov*, et al.* (2003). "Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway." J Cell Biol **162**(4): 703-717.

Petersen, R. B., M. Tabaton*, et al.* (1992). "Analysis of the prion protein gene in thalamic dementia." Neurology **42**(10): 1859-63.

Piccardo, P., C. Seiler*, et al.* (1996). "Proteinase-K-resistant prion protein isoforms in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease (Indiana kindred)." J Neuropathol Exp Neurol **55**(11): 1157-63.

Plemper, R. K., S. Bohmler*, et al.* (1997). "Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation." Nature **388**(6645): 891-5.

Pohlschroder, M., W. A. Prinz*, et al.* (1997). "Protein translocation in the three domains of life: variations on a theme." Cell **91**(5): 563-6.

Post, K., D. R. Brown*, et al.* (2000). "Neurotoxicity but not infectivity of prion proteins can be induced reversibly in vitro." Arch. Virol(Suppl 16): 265-273.

Poulter, M., H. F. Baker*, et al.* (1992). "Inherited prion disease with 144 base pair gene insertion. 1. Genealogical and molecular studies." Brain **115**(Pt 3): 675-85.

Priola, S. A. und V. A. Lawson (2001). "Glycosylation influences cross-species formation of protease-resistant prion protein." Embo J **20**(23): 6692-6699.

Priola, S. A., A. Raines*, et al.* (2000). "Porphyrin and phthalocyanine antiscrapie compounds." Science **287**(5457): 1503-6.

Prusiner, S. B. (1982). "Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie." Science **216**: 136-144.

Prusiner, S. B. (1991). "Molecular biology of prion diseases." Science **252**: 1515-1522.

Prusiner, S. B. (1995). "The prion diseases." Sci Am **272**(1): 48-57.

Prusiner, S. B., S. P. Cochran, *et al.* (1982). "Measurement of the scrapie agent using an incubation time interval assay." Ann Neurol **11**(4): 353-8.

Prusiner, S. B., D. Groth, *et al.* (1993). "Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies." Proc Natl Acad Sci U S A **19**(22): 10608-12.

Prusiner, S. B., D. F. Groth, *et al.* (1984). "Purification and structural studies of a major scrapie prion protein." Cell **38**: 127-134.

Prusiner, S. B., M. P. McKinley, *et al.* (1981). "Scrapie agent contains a hydrophobic protein." Proc Natl Acad Sci U S A **78**: 6675-6679.

Prusiner, S. B., M. Scott, *et al.* (1990). "Transgenetic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication." Cell **63**: 673-686.

Prusiner, S. B., M. R. Scott, *et al.* (1998). "Prion protein biology." Cell **93**(3): 337-48.

Quaglio, E., R. Chiesa, *et al.* (2001). "Copper converts the cellular prion protein into a protease-resistant species that is distinct from the scrapie isoform." J Biol Chem **276**(14): 11432-11438.

Rieger, R., F. Edenhofer, *et al.* (1997). "The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells." Nat Med **3**(12): 1383-8.

Riek, R., S. Hornemann, *et al.* (1996). "NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321)." Nature **382**(6587): 180-2.

Riek, R., S. Hornemann, *et al.* (1997). "NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231)." FEBS Lett **413**(2): 282-8.

Riek, R., G. Wider, *et al.* (1998). "Prion protein Nmr Structure and Familial Human Spongiform Encephalopathies." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **95**: 11667-11672.

Robbins, P. W., R. B. Trimble, *et al.* (1984). "Primary structure of the Streptomyces enzyme endo-beta-N-acetylglucosaminidase H." J Biol Chem **259**(12): 7577-83.

Rogers, M., A. Taraboulos, *et al.* (1990). "Intracellular accumulation of the cellular prion protein after mutagenesis of its Asn-linked glycosylation sites." Glycobiology **1**(1): 101-9.

Rogers, M., F. Yehiely, *et al.* (1993). "Conversion of truncated and elongated prion proteins into the scrapie isoform in cultured cells." Proc Natl Acad Sci U S A **90**: 3182-3186.

Rothberg, K. G., Y. S. Ying, *et al.* (1990). "Colesterol controls the clustering of the glycophospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate." J Biol Chem **111**: 2931-2938.

Rothberg, K. G., Y. S. Ying, *et al.* (1990). "The glycophospholipid-linked folate receptor internalizes folate without entering the clathrin-coated pit endocytic pathway." J Cell Biol **110**(3): 637-649.

Rudd, P. M., T. Endo, *et al.* (1999). "Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(23): 13044-9.

Safar, J. G., M. D. Geschwind, *et al.* (2005). "Diagnosis of human prion disease." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(9): 3501-6.

Saiki, R. K., D. H. Gelfand, *et al.* (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-91.

Sakaguchi, S., S. Katamine, *et al.* (1995). "Accumulation of proteinase K-resistant prion protein (PrP) is restricted by the expression level of normal PrP in mice inoculated with a mouse-adapted strain of the Creutzfeldt-Jakob disease agent." J Virol **69**(12): 7586-92.

Sales, N., K. Rodolfo, *et al.* (1998). "Cellular prion protein localization in rodent and primate brain." Eur J Neurosci **10**(7): 2464-71.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, *et al.* (1989). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." New York, Cold Spring Harbor Press.

Sanders, S. L., K. M. Whitfield, *et al.* (1992). "Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the ER." Cell **69**(2): 353-65.

Sanger, F., S. Nicklen, *et al.* (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.

Sanghera, N. und T. J. T. Pinheiro (2002). "Binding of prion protein to lipid membranes and implications for prion conversion." J. Mol. Biol **315**: 1241-1256.

Schatzl, H. M., M. Da Costa, *et al.* (1995). "Prion protein gene variation among primates." J Mol Biol **245**(4): 362-74.

Schein, C. H. (1990). "Solubility as a function of protein structure and solvent components." Biotechnology **8**: 308-316.

Schlesinger, D. H., G. Goldstein, *et al.* (1975). "The complete amino acid sequence of ubiquitin, an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells." Biochemistry **14**(10): 2214-8.

Scott, M., D. Foster, *et al.* (1989). "Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques." Cell **59**(5): 847-57.

Scott, M. R., D. Groth, *et al.* (1997). "Propagation of prion strains through specific conformers of the prion protein." J. Virol. **71**: 9032-9044.

Serban, D., A. Taraboulos, *et al.* (1990). "Rapid detection of Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie prion proteins." Neurology **40**: 110-117.

Shyng, S. L., J. E. Heuser, *et al.* (1994). "A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits." J Cell Biol **125**(6): 1239-1250.

Shyng, S. L., K. L. Moulder, *et al.* (1995). "The N-terminal domain of a glycolipid-anchored prion protein is essential for its endocytosis via clathrin-coated pits." J Biol Chem **270**(24): 14793-14800.

Silberstein, S. und R. Gilmore (1996). "Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase." FASEB J **10**(8): 849-58.

Simonic, T., S. Duga, *et al.* (2000). "cDNA cloning of turtle prion protein." FEBS Lett **469**(1): 33-8.

Solforosi, L., J. R. Criado, *et al.* (2004). "Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis in vivo." Science **303**: 1514-1516.

Sommer, T. und S. Jentsch (1993). "A protein translocation defect linked to ubiquitin conjugation at the endoplasmic reticulum." Nature **365**(6442): 176-9.

Sousa, M. C., M. A. Ferrero-Garcia, *et al.* (1992). "Recognition of the oligosaccharide and protein moieties of glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase." Biochemistry **31**(1): 97-105.

Spudich, S., J. A. Mastrianni, *et al.* (1995). "Complete penetrance of Creutzfeldt-Jakob disease in Libyan Jews carrying the E200K mutation in the prion protein gene." Mol. Med. **1**: 607-613.

Stahl, N., M. A. Baldwin, *et al.* (1993). "Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing." Biochemistry **32**(8): 1991-2002.

Stahl, N., D. R. Borchelt, *et al.* (1987). "Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid." Cell **51**: 229-240.

Stein, C. A., T. M. Khan, *et al.* (1995). "Cell surface binding and cellular internalization properties of suramin, a novel antineoplastic agent." Clin Cancer Res **1**(5): 509-17.

Stimson, E., J. Hope, *et al.* (1999). "Site-specific characterization of the N-linked glycans of murine prion protein by high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and exoglycosidase digestions." Biochemistry **38**(15): 4885-95.

Stöckel, J., J. Safar, *et al.* (1998). "Prion protein selectively binds copper(II) ions." Biochemistry **37**: 7185-7193.

Strumbo, B., S. Ronchi, *et al.* (2001). "Molecular cloning of the cDNA coding for Xenopus laevis prion protein." FEBS Lett **508**(2): 170-4.

Suh, K., J. E. Bergmann, *et al.* (1989). "Selective retention of monoglucosylated high mannose oligosaccharides by a class of mutant vesicular stomatitis virus G proteins." J Cell Biol **108**: 811-819.

Sumudhu, W., S. Perera, *et al.* (2001). "Ablation of the metal ion-induced endocytosis of the prion protein by disease-associated mutation of the octarepeat region." Cur Biol **11**(7): 519-523.

Sunyach, C., A. Jen, *et al.* (2003). "The mechanism of internalization of glycosylphosphatidylinositol-anchored prion protein." EMBO J **22**: 3591-3601.

Supattapone, S., H.-O. B. Nguyen, *et al.* (1999). "Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**: 14529-14534.

Tagliavini, F., R. A. McArthur, *et al.* (1997). "Effectiveness of anthracycline against experimental prion disease in Syrian hamsters." Science **176**(5315): 1119-22.

Taraboulos, A., M. Rogers, *et al.* (1990). "Acquisition of protease resistance by prion proteins in scrapie-infected cells does not require asparagine-linked glycosylation." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(21): 8262-6.

Taraboulos, A., M. Scott, *et al.* (1995). "Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform." J Cell Biol **129**: 121-132.

Tatzelt, J., S. B. Prusiner, *et al.* (1996). "Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein." EMBO J **15**: 6363-6373.

Telling, G. C., M. Scott, *et al.* (1995). "Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein." Cell **83**: 79-90.

Thomzig, A., C. Kratzel, *et al.* (2003). "Widespread PrPSc accumulation in muscles of hamsters orally infected with scrapie." Embo J **4**(5): 530-3.

Thomzig, A., W. Schulz-Schaeffer, *et al.* (2004). "Preclinical deposition of pathological prion protein PrPSc in muscles of hamsters orally exposed to scrapie." J Clin Invest **113**(10): 1465-72.

Tobler, I., T. Deboer, *et al.* (1997). "Sleep and sleep regulation in normal and prion protein-deficient mice." J Neurosci **15**(5): 1869-79.

Tobler, I., S. E. Gaus, *et al.* (1996). "Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein." Nature **380**: 639-642.

Towbin, H., T. Staehelin, *et al.* (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.

Travers, K. J., C. K. Patil, *et al.* (2000). "Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation." Cell **101**(3): 249-58.

Trombetta, E. S., J. F. Simons, *et al.* (1996). "Endoplasmatic reticulum glucosidase II is composed of a catalytic subunit, conserved from yeast to mammals, and a tightly bound noncatalytic HDEL-containing subunit." J Biol Chem **271**(44): 27509-516.

Tsubuki, S., H. Kawasaki, *et al.* (1993). "Purification and characterization of a Z-Leu-Leu-Leu-MCA degrading protease expected to regulate neurite formation: a novel catalytic activity in proteasome." Biochem Biophys Res Commun **196**(3): 1195-201.

Vanik, D. L. und W. K. Surewicz (2002). "Disease-associated F198S mutation increases the propensity of the recombinant prion protein for conformational conversion to scrapie-like form." J Biol Chem **277**(50): 49065-70. Epub 2002 Oct 7.

Varki, A. (1993). "Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct." Glycobiology **3**(2): 97-130.

Vey, M., S. Pilkuhn, *et al.* (1996). "Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 14945-14949.

Viles, J. H., F. E. Cohen, *et al.* (1999). "Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites." Proc Natl Acad Sci U S A **96**: 2042-2047.

Walmsley, A. R., F. N. Zeng, *et al.* (2001). "Membrane topology influences N-glycosylation of the prion protein." Embo J **20**(4): 703-712.

Walter, P. und G. Blobel (1980). "Purification of a membrane-associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic reticulum." Proc Natl Acad Sci U S A **77**: 7112-6.

Walter, P. und G. Blobel (1982). "Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum." Nature **299**: 691-8.

Walter, S. und J. Buchner (2002). "Molecular chaperones--cellular machines for protein folding." Angew Chem Int Ed Engl **41**(7): 1098-113.

Weissmann, C., H. Bueler, *et al.* (1994). "Susceptibility to scrapie in mice is dependent on PrPC." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **343**(1306): 431-3.

Wells, G. A. H., A. C. Scott, *et al.* (1987). "A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle." Vet. Rec. **121**: 419-420.

Westaway, D., C. Cooper, *et al.* (1994). "Structure and polymorphism of the mouse prion protein gene." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(14): 6418-22.

White, A. R., P. Enever, *et al.* (2003). "Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease." Nature **422**(6927): 80-3.

Wiertz, E. J., D. Tortorella, *et al.* (1996). "Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction." Nature **384**(6608): 432-8.

Wildegger, G., Liemann, S. and Glockshuber, R. (1999). "Extremely rapid folding of the C-terminal domain of the prion protein without kinetic intermediates." Nature Struct. Biol. **6**(6): 550-553.

Wilesmith, J. W., J. B. Ryan, *et al.* (1992). "Bovine spongiform encephalopathy: case-control studies of calf feeding practices and meat and bonemeal inclusion in proprietary concentrates." Res Vet Sci **52**(3): 325-31.

Wilesmith, J. W., J. B. M. Ryan, *et al.* (1991). "Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin." Vet. Rec. **128**(9): 199-203.

Wilesmith, J. W., G. A. H. Wells, *et al.* (1988). "Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies." Vet. Rec. **123**(25): 638-44.

Will, R. G., J. W. Ironside, *et al.* (1996). "A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK." Lancet **347**(9006): 921-925.

Williams, E. S. und S. Young (1980). "Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy." J Wildl Dis **16**(1): 89-98.

Winklhofer, K. F., F. U. Hartl, *et al.* (2001). "A sensitive filter retention assay for the detection of PrPSc and the screening of anti-prion compounds." FEBS Lett. **503**: 41-45.

Winklhofer, K. F., U. Heller, *et al.* (2003). "Inhibition of complex glycosylation increases formation of PrPSc." Traffic **4**: 313-322.

Winklhofer, K. F., J. Heske, *et al.* (2003). "Determinants of the in vivo-folding of the prion protein: a bipartite function of helix 1 in folding and aggregation." J Biol Chem **278**(17): 14961-14970.

Winklhofer, K. F. und J. Tatzelt (2000). "Cationic lipopolyamines induce degradation of PrPSc in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells." Biol Chem **381**: 463-469.

Wuthrich, K. und R. Riek (2001). "Three-dimensional structures of prion proteins." Adv Protein Chem **57**: 55-82.

Yost, C. S., C. D. Lopez*, et al.* (1990). "Non-hydrophobic extracytoplasmic determinant of stop transfer in the prion protein." Nature **343**(6259): 669-672.

Zanata, S. M., M. H. Lopes*, et al.* (2002). "Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection." Embo J **21**(13): 3307-3316.

Zanusso, G., R. B. Petersen*, et al.* (1999). "Proteasomal degradation and N-terminal protease resistance of the codon 145 mutant prion protein." J Biol Chem **274**(33): 23396-404.

Zapun, A., C. A. Jakob*, et al.* (1999). "Protein folding in a specialized compartment: the endoplasmic reticulum." Structure Fold Des **7**(8): R173-82.

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

9. Lebenslauf

Name:	Sophia Kiachopoulos
Geburtstag:	02.08.1974
Geburtsort:	Erlangen
Staatsangehörigkeit:	Griechisch
Familienstand:	Ledig

1980-1984:	Grundschule Michael Pöschke, Erlangen
1984-1993:	Gymnasium Fridericianum, Erlangen
1993-1995:	Grundstudium der Biologie Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen
1995-1999	Hauptstudium der Biologie Ludwig-Maximilians-Universität, München
1999-2000	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Abteilung Molekulare Endokrinologie, Arbeitsgruppe: Beate Lanske Thema: Phänotypische Analyse von PTH / PTHrP - Rezeptor defizienten Mäusen mit Jansen Transgen.
2000	Diplom, Ludwig-Maximilians-Universität, München Hauptfach: Anthropologie und Humangenetik Nebenfächer: Zoologie, neurobiologische Richtung Pharmakologie und Toxikologie Biochemie
2001	Praktikum am Kings College London (KCL), London, UK, Department of Craniofacial Development, Arbeitsgruppe: Agamemnon E. Grigoriadis
03/2002-05/2005	Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Abteilung Zelluläre Biochemie, Arbeitsgruppe: Jörg Tatzelt Thema: Biogenese des Prion-Proteins: Regulation und Fehlregulation bei Prion-Erkrankungen.

10. Publikationen

1. Im Rahmen der Dissertation:

Sophia Kiachopoulos, Andreas Bracher, Konstanze F. Winklhofer und Jörg Tatzelt (2005). Pathogenic mutations located in the hydrophobic core of the prion protein interfere with folding and attachment of the glycosylphosphatidylinositol anchor. Journal of Biological Chemistry **280** (10): 9320-9

Sophia Kiachopoulos, Johanna Heske, Jörg Tatzelt und Konstanze F. Winklhofer (2004). Misfolding of the prion protein at the plasma membrane induces endocytosis and intracellular retention. Traffic **5** (6): 426-36.

2. Im Rahmen der Diplomarbeit:

Desi W. Soegiarto, **Sophia Kiachopoulos**, E. Schipani, H. Juppner, Reinhold G. Erben und Beate Lanske (2001). Partial rescue of PTH/PTHrP receptor knockout mice by targeted expression of the Jansen transgene. Endocrinology **142**(12): 5303-10.