

**Analyse des Prion Proteins der Maus
in *Saccharomyces cerevisiae*:
Fehlfaltung und Zelltod**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Biologie der Universität
der Freien und Hansestadt Hamburg

durchgeführt am Max-Planck-Institut für Biochemie
in Martinsried

vorgelegt von

Ulrich Heller

aus Greifswald

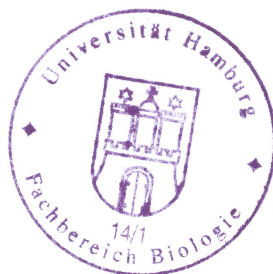
Hamburg 2002

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Frau Professor Dr. E. Pratje

Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. F. U. Hartl

Tag der Disputation: 03. Mai 2002

Hamburg, den 19. April 2002



Professor Dr. U. Wienand
Dekan

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Transmissible Spongiforme Encephalopathien	1
1.1.1.	Spongiforme Encephalopathien des Menschen	1
1.1.2.	Spongiforme Encephalopathien der Tiere	3
1.2.	Transmissionsexperimente	5
1.3.	Das Prion Protein	8
1.4.	Prion Protein-Biogenese	11
1.5.	Das Prion-Konzept	12
1.6.	Alternative PrP-Topologien	15
1.7.	Qualitätskontrolle im ER	15
1.8.	Funktion von PrP?	18
1.9.	Hefe-„Prionen“	20
1.10.	Zielsetzung	20
2.	Material und Methoden	22
2.1.	Geräte	22
2.2.	Chemikalien, Enzyme und Materialien	23
2.3.	Antikörper	27
2.4.	Medien	27
2.4.1.	Medien für <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
2.4.2.	Medium für <i>Escherichia coli</i>	28
2.5.	Stämme und Zellen	28
2.5.1.	Stämme von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
2.5.2.	Stamm von <i>Escherichia coli</i>	29
2.5.3.	Zellen von <i>Mus musculus</i>	29
2.6.	Molekularbiologische Standardmethoden	29
2.7.	Plasmide	29
2.7.1.	Plasmide für <i>S. cerevisiae</i>	29
2.7.2.	Herstellung des Plasmids pTET423	30
2.7.3.	Plasmide für <i>E. coli</i>	30
2.7.4.	Plasmid für N2a-Zellen	30
2.8.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	30
2.8.1.	Oligonukleotide (<i>Primer</i>)	30
2.8.2.	Rekombinante PCR	32
2.8.3.	PCR-Bedingungen	33
2.8.4.	Sequenzierungen	34
2.8.5.	Prion Protein-Konstrukte unter Kontrolle des GAL1-Promoters	34
2.8.6.	Prion Protein-Konstrukte unter Kontrolle des GAS1-Promoters	34
2.8.7.	Prion Protein-Konstrukt unter Kontrolle des TET-Operators: pTET-PrPΔGPI	38
2.8.8.	Prion Protein-Konstrukte unter Kontrolle des CMV-Promoters	39
2.8.9.	Andere Plasmide	39
2.9.	Hefetransformation	40
2.9.1.	Herstellung kompetenter Hefe-Zellen	40
2.9.2.	Transformieren der Zellen	41
2.10.	Vergleich von Wachstumsraten	41
2.10.1.	Wachstumskurven	41
2.10.2.	Tropfenassay	41
2.11.	Isolation von Gesamtprotein aus Mauszellen	41
2.12.	Isolation von Gesamtprotein aus Hefe	42
2.13.	Zellaufschluss mit Glasperlen	42
2.14.	Quantifizierung von Proteinen	42
2.15.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	43
2.16.	Proteintransfer auf Nitrozellulose (<i>Western blot</i>)	43

2.17.	Immundetektion von Proteinen.....	43
2.18.	Nachweis der Löslichkeit.....	44
2.19.	Nachweis der Glykosylierung.....	44
2.20.	Nachweis der Protease-Resistenz.....	44
2.21.	Nachweis der intrazellulären Lokalisation.....	44
2.22.	Präparation von ER-Membranen (Mikrosomen).....	45
2.23.	Nachweis der Proteintopologie mittels PK-Verdau.....	45
2.24.	Alkalische Extraktion der Mikrosomen.....	46
2.25.	<i>In vivo</i> -Markierung von Hefe-Proteinen (<i>pulse/chase</i>).....	46
2.26.	<i>pulse/chase</i> von Maus-Proteinen.....	47
2.26.1.	Transfektion.....	47
2.26.2.	Markierung.....	47
2.27.	Immunpräzipitation (IP).....	48
2.28.	Autoradiogramme.....	48
2.29.	Phosphoimaging.....	48
2.30.	RNA-Nachweis (<i>Northern blot</i>).....	49
3.	Ergebnisse.....	50
3.1.	Expression des Prion Proteins in <i>S. cerevisiae</i>	50
3.2.	Modifikation des PrP-Gens.....	51
3.3.	PrP Δ GPI hat Eigenschaften von PrP ^{Sc}	55
3.4.	PrP wird in das ER importiert.....	57
3.5.	PrP-Expression führt zu einem Wachstumsdefekt.....	59
3.6.	Der Wachstumsdefekt ist reversibel.....	60
3.7.	Der Aminoterminus von PrP Δ GPI ist für die Ausbildung des Wachstumsdefekts nicht notwendig.....	62
3.8.	Die Transmembrandomäne des PrP Δ GPI vermittelt Fehlfaltung und Wachstumsdefekt.....	64
3.9.	Ein C-terminaler Membrananker supprimiert den Wachstumsdefekt.....	70
3.10.	PrP Δ GPI und die Qualitätskontrolle in der Hefe.....	72
3.10.1.	Die Unfolded Protein Response wird nicht aktiviert.....	72
3.10.2.	Die Transmembrandomäne vermindert die ER-assoziierte Degradation.....	73
3.10.3.	ERAD-Defizienz erhöht die Membranassoziation des PrP-N-Terminus.....	77
3.10.4.	Der PrP-N-Terminus wird in Neuroblastomzellen durch ERAD abgebaut.....	78
3.10.5.	In ERAD-defizienten Zellen ist der Wachstumsdefekt verstärkt.....	80
3.11.	Intrazelluläre Lokalisation und Wachstumsdefekt.....	81
4.	Diskussion.....	83
4.1.	Die Biogenese des PrP in <i>S. cerevisiae</i>	83
4.2.	PrP-Missfaltung im ER verursacht einen Wachstumsdefekt.....	89
4.3.	Qualitätskontrollmechanismen im ER.....	92
4.4.	Die potenzielle Transmembrandomäne von PrP interferiert mit der ERAD.....	93
4.5.	Eine Membranverankerung fördert den anterograden Transport von PrP aus dem ER und supprimiert den Wachstumsdefekt.....	95
4.6.	Implikationen für die Biogenese von PrP ^C und die Konversion zu PrP ^{Sc}	98
4.7.	Ausblick.....	101
5.	Literatur.....	102
6.	Zusammenfassung.....	123

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BSE	Bovine Spongiforme Encephalopathie
CJK	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
CWD	<i>Chronic Wasting Disease</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Desoxycholat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EndoH	Endo- β -N-Acetylglucosaminidase, Endoglykosidase H
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERAD	ER-assoziierte Degradation
FFI	Fatale Familiäre Insomnie
fl-PrP	<i>full-length-PrP</i> mit Signalsequenzen des Hefeproteins Gas1p
FSE	Feline Spongiforme Encephalopathie
Glc	Glukose
GlcNAc	N-Acetyl-Glucosamin
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
Grp	glukosereguliertes Protein
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom

HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)Piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure)
HRP	Meerrettich-Peroxidase
Hsp	Hitzeschockprotein
kb	Kilobasenpaare
kDa	10 ³ Dalton, Molekulargewicht von Proteinen
Man	Mannose
MAT	Hefe-Kreuzungstyp
MEM	Minimum Essential Medium
MG132	Carboxybenzoyl-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucinal
NMR	Kernresonanzspektroskopie
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PenStrep	Penicillin - Streptomycin - Glycin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Ionenkonzentration
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PrP	Prion Protein
PrP ^C	zelluläres PrP
PrP ^{Sc}	Scrapie-Form des PrP
RNA	Ribonukleinsäure
Sarkosyl	N-Lauroylsarkosin
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TM	Transmembrandomäne
TME	Transmissible Mink (Nerz) Encephalopathie
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Triton X-100	t-Octylphenoxyethoxyethanol
TSE	Transmissible Spongiforme Encephalopathie
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>

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

1. Einleitung

1.1. Transmissible Spongiforme Encephalopathien

Transmissible Spongiforme Encephalopathien (TSEs) sind neurodegenerative Erkrankungen, deren pathologische Gemeinsamkeit mikroskopisch sichtbare Läsionen sowie Ablagerungen des Prion Proteins im Gehirn sind.

TSEs treten meist spontan auf, können aber auch durch Mutationen bedingt vererbt werden. Eine weitere Eigenschaft ist die Übertragbarkeit durch Infektion, was die TSEs von anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimerschen Krankheit oder auch der Parkinsonschen Krankheit unterscheidet. TSEs treten sowohl beim Menschen als auch bei Tieren auf (Prusiner *et al.*, 1998; Belay, 1999; Collinge, 2001; Collins *et al.*, 2001).

1.1.1. Spongiforme Encephalopathien des Menschen

Zu den Transmissiblen Spongiformen Encephalopathien des Menschen (Tab. 1) gehören die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJK), das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS), die Fatale Familiäre Insomnie (FFI) sowie Kuru (Creutzfeldt, 1920; Jakob, 1921; Gerstmann *et al.*, 1936; Lugaresi *et al.*, 1986; Gajdusek und Zigas, 1957).

Die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit ist sehr selten und kommt in der Bevölkerung mit einer Häufigkeit von eins zu einer Million vor. Zirka 90% der Fälle treten spontan auf (sporadische CJK oder sCJK). Rund 10% der CJK-Fälle sind durch Mutationen bedingt und werden autosomal dominant vererbt (familiäre CJK oder fCJK).

Ebenfalls durch Mutationen werden das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom und die Fatale Familiäre Insomnie ausgelöst (Hsiao *et al.*, 1989; Medori *et al.*, 1992).

Weniger als ein Prozent der CJK-Fälle werden durch ärztliche Behandlung verursacht (iatrogene CJK oder iCJK). So führte die Benutzung infizierten chirurgischen Bestecks oder der Einsatz infizierter Implantate wie Gehirnhaut oder Hornhaut zu

CJK-Erkrankungen (Duffy *et al.*, 1974; Bernoulli *et al.*, 1977). Mehr als hundert Todesopfer hat die Gabe kontaminierten Wachstumshormons, welches aus Hirnbestandteilen Verstorbener isoliert wurde, gefordert (Brown *et al.*, 1985).

Eine weitere durch Infektion verbreitete TSE ist Kuru. Kuru wurde unter den Ureinwohnern Neu Guineas, dem Volk der Fore, durch einen rituellen Kannibalismus übertragen. Es war unter den am Ritus beteiligten Frauen und Kindern die häufigste Todesursache. Nach dem Verbot des Ritus ist die Zahl der Betroffenen stark zurückgegangen (Alpers, 1964).

Krankheit	Ursache
Kuru	ritueller Kannibalismus
iCJK	Infektion durch ärztliche Behandlung
nvCJK	Infektion
sCJK	somatische Mutation oder spontane Erkrankung
fCJK	Keimbahnmutation im PrP-Gen
GSS	
FFI	

Tabelle 1. Spongiforme Enzephalopathien des Menschen. fCJK: familiäre CJK; iCJK: iatrogene CJK; nvCJK: neue Variante der CJK; sCJK: sporadische CJK; GSS: Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom; FFI: Fatale Familiäre Insomnie.

Die TSEs des Menschen zeichnen sich durch eine sehr lange Inkubationszeit aus. So ist die Krankheit bei den Patienten, die kontaminierte Wachstumshormone erhalten haben, erst 4 bis 15 Jahre nach der letzten Injektion ausgebrochen. Patienten, bei denen infizierte Gehirnhaut implantiert wurde, zeigten eine wesentlich kürzere Inkubationszeit von 16 bis 18 Monaten.

Das Alter der Patienten beim Ausbruch der Krankheit hängt bei iCJK natürlich vom Zeitpunkt des Eingriffs ab, bei sCJK-Patienten bricht die Krankheit meist zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr aus, bei fCJK-Patienten generell etwas früher.

Neben dem Zeitpunkt des Ausbruchs gibt es auch Differenzen im neuropathologischen Bild, der Symptomatik und der Krankheitsdauer zwischen den verschiedenen Formen der CJK, GSS, Kuru und FFI. So sind bei den unterschiedlichen Krankheiten verschiedene Regionen des Gehirns betroffen. Die frühen Symptome bestehen in verschiedener Ausprägung aus Seh-, Bewegungs- und Sprachstörungen. Weitere Hinweise auf eine beginnende Erkrankung sind verringerter Appetit, eine Veränderung der Persönlichkeit oder Gedächtnisstörungen. Im weiteren Verlauf der Krankheiten kommt es zum totalen Ausfall des Großhirns und zum Tod der Patienten. Die durchschnittliche Dauer zwischen Ausbruch der Krankheit und dem Tod beträgt bei sCJK fünf Monate, bei Kuru und FFI 12 Monate und bei GSS fünf Jahre (Johnson und Gibbs, 1998; Collinge, 2001).

1.1.2. Spongiforme Encephalopathien der Tiere

Zu den TSEs der Tiere (Tab. 2) gehören die Traberkrankheit (Scrapie) bei Schafen und Ziegen, die Bovine Spongiforme Encephalopathie (BSE) bei Rindern sowie spongiforme Encephalopathien bei anderen Tieren wie Nerzen (Transmissible Mink Encephalopathie, TME), Hirschen (Chronic Wasting Disease, CWD) oder Katzen (Feline Spongiforme Encephalopathie, FSE) (Leopoldt, 1759; Wells *et al.*, 1987; Hartsough und Burger, 1965; Williams und Young, 1980; Pearson *et al.*, 1991).

Scrapie ist die häufigste natürliche TSE. Schon 1755 wurde im englischen Parlament über die Folgen von Scrapie (*to scrape*, engl.: kratzen) für die aufkeimende Textilindustrie diskutiert (Journal of the House of Commons, 1755). An Scrapie erkrankte Schafe kratzen sich die Wolle vom Leib, was zu wirtschaftlichen Einbußen führte. Eine der ersten Beschreibungen dieser Krankheit stammt aus dem Jahr 1759:

„Es bekommen auch manche Schaaf den Trab, welches eine Krankheit ist, die daran zu erkennen, wenn sich das Stück, das solche bekommt, niederlegt, und beißt mit dem Maule an den Füßen und um die Beine, und reibet sich mit dem Kreuze an den Stangen, verlieret das Gedeihen, frißt auch nicht recht, und verlahmet endlich; sie schleppen sich lange, verzehren sich nach und nach, und zuletzt müssen sie sterben. Welches Vieh diese Staupe bekommt, wird nicht besser. Daher denn das allerbeste ist, daß ein Schäfer, welcher ein Stück von dem Trabe befallen, gewahr wird, es bald wegschafft, und vors herrschaftliche Gesinde schlachtet. Es muß ein Schäfer ein solches Stück Vieh also gleich von dem gesunden Vieh absondern, denn es steckt an, und kann vielen Schaden unter der Heerde verursachen.“ (Leopoldt, 1759).

Der französische Veterinär Besnoit und Kollegen erkannten, dass die Vakuolisierung des Gehirns eine Eigenschaft aller an Scrapie erkrankten Schafe ist (Besnoit und Morel, 1898).

Krankheit	Ursache	betroffener Organismus
Scrapie	unbekannt	Schaf
BSE	Infektion	Rind
TME		Nerz
FSE		Katze
Huftier-Encephalopathie		Antilopen und andere exotische Zootiere
CWD	unbekannt	Elch, Hirsch

Tabelle 2. Übersicht über die Spongiformen Encephalopathien der Tiere. BSE: Bovine Spongiforme Encephalopathie; TME: Transmissible Mink (Nerz) Encephalopathie; FSE: Feline Spongiforme Encephalopathie; CWD: Chronic Wasting Disease.

Als Ursache für natürliches Scrapie wurde einerseits eine genetische Veranlagung angenommen (Parry, 1962), andererseits wurde Scrapie als Infektionskrankheit betrachtet (Dickinson *et al.*, 1965).

Wie iCJK wurde auch Scrapie schon unbeabsichtigt durch einen medizinischen Eingriff verbreitet. Durch einen infektiösen Impfstoff erkrankten über 1500 Schafe (Gordon, 1946).

Die Bovine Spongiforme Encephalopathie (BSE) wurde erstmals 1986 mit 16 Fällen beschrieben. In den folgenden Jahren hat sich BSE in Großbritannien zu einer Epidemie ausgeweitet, auf ihrem Höhepunkt 1992 mit über 37.000 Fällen (Abb. 1). Es gilt als gesichert, dass die Rinder durch das Verfüttern ungenügend sterilisierter Schlachtabfälle infiziert wurden. Infolge des Verbots der Tiermehlfütterung an Wiederkäuer 1988 sind die BSE-Fälle wieder rückläufig. Insgesamt hat BSE bis heute fast 200.000 Rinder das Leben gekostet (Brown *et al.*, 2001).

Auch die Transmissible Mink Encephalopathie (TME) und die Feline Spongiforme Encephalopathie (FSE) sind infektiösen Ursprungs (Hanson *et al.*, 1971; Pearson *et al.*, 1991).

Wie schon von Leopoldt beschrieben, macht sich Scrapie bei Schafen vor allem durch Bewegungs- und Verhaltensstörungen bemerkbar. Dies gilt auch für BSE bei Rindern, die insbesondere durch Übererregbarkeit und Gangstörungen auffallen.

Die Inkubationszeit beträgt bei Schafen ein bis zwei (Cuillé und Chelle, 1936), bei Rindern ca. vier bis fünf Jahre. Der Tod der Tiere tritt sechs bis 12 Monate nach dem Ausbruch der Krankheit ein.

1.2. Transmissionsexperimente

Eine Übertragbarkeit der TSEs zwischen verschiedenen Spezies wurde zunächst nicht angenommen. So sind zum Beispiel CJK-Fälle und lokales Auftreten von Scrapie-Infektionen nicht gekoppelt. Um die Infektiosität der TSEs nachzuweisen, wurden als erstes Transmissionsexperimente mit Schafen durchgeführt. Besnoits Versuche einer experimentellen Übertragung von Scrapie auf gesunde Schafe scheiterten daran, dass

die Tiere nicht lange genug beobachtet wurden, um die Inkubationszeit von 1-2 Jahren zu überbrücken (Besnoit, 1899). Der Nachweis der infektiösen Natur des Scrapie-Erregers gelang durch weitere Inokulationsversuche (Cuillé und Chelle, 1936).

Eine Analogie der verschiedenen TSEs von Mensch und Tier wurde nach der Erkennung der Gemeinsamkeiten der Scrapie-Krankheit der Schafe, der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit und Kuru postuliert (Hadlow, 1959; Klatzo *et al.*, 1959).

Die folgenden Transmissionsexperimente zwischen verschiedenen Spezies zeigten, dass TSEs auch zwischen den Arten übertragen werden können. Die Übertragung von Scrapie gelang vom Schaf auf Ziegen, aber auch auf Nager wie Mäuse, Ratten und Hamster (Pattison und Millson, 1961; Chandler, 1961; Zlotnik und Rennie, 1965). Sowohl Kuru als auch CJK konnten durch Inokulation infektiösen Materials in das Gehirn auf Schimpansen übertragen werden (Gajdusek *et al.*, 1966; Gibbs *et al.*, 1968).

Die Übertragung der Krankheit auf eine andere Spezies gelingt nicht immer, man spricht daher von einer Speziesbarriere (Pattison, 1965). So wurde noch kein Fall gezeigt, bei dem Scrapie vom Schaf auf den Menschen übertragen wurde. Andere Tiere dagegen, so zum Beispiel der amerikanische Nerz (*mink*), sind gegenüber Scrapie hoch sensitiv (Barlow und Rennie, 1970; Hanson *et al.*, 1971).

Die Speziesbarriere wird weiterhin dadurch deutlich, dass durch eine serielle Passage der Infektion sowohl die Infektionsrate steigt als auch die Inkubationszeit deutlich sinkt. Während die Inkubationszeit der Erstinfektion eines Hamsters mit Scrapie 11 Monate betrug, fiel sie bei Hamstern, die mit dem Hirn des ersten Tieres infiziert wurden, auf vier bis fünf Monate. Weitere Passagen senkten die Inkubationszeit auf zirka 60 Tage. Erkrankten bei der Erstinfektion nur wenige Tiere, so steigt die Infektionsrate nach einigen Passagen auf nahezu 100 Prozent (Chandler und Turfrey, 1972; Kimberlin und Walker, 1977).

Ein Beispiel für die Überwindung der Speziesbarriere stellt die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) dar. Man nimmt an, dass die Umstellung des

Herstellungsverfahren für Tiermehl in den 1970er Jahren die Scrapie-Erreger nicht mehr inaktiviert und so Rinder infiziert werden konnten. Die Wiederverwertung der an BSE gestorbenen Rinder als Tierfutter stellt eine oben beschriebene Passage der Erreger dar und konnte die Infektionsrate der Tiere weiter steigern (Johnson und Gibbs, 1998).

Auch das Auftreten einer neuen Variante der CJK (nvCJK) ist sehr wahrscheinlich auf den Konsum infizierter Rinderbestandteile zurückzuführen (Will *et al.*, 1996; Bruce *et al.*, 1997; Scott *et al.*, 1999). Die nvCJK unterscheidet sich von den klassischen CJKs sowohl in der Pathologie als auch im Krankheitsbild. So stimmt die regionale Verteilung der Läsionen im Gehirn mit denen von BSE überein. Die nvCJK-Patienten sind mit einem Durchschnittsalter von 29 Jahren wesentlich jünger als sCJK-Patienten.

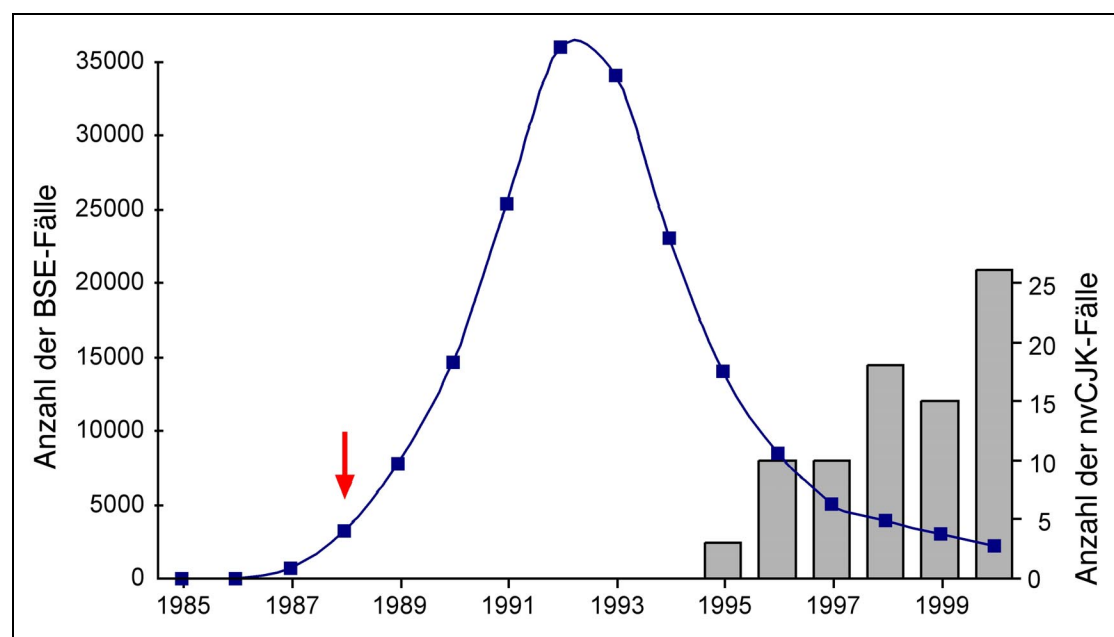


Abbildung 1. Fälle von Boviner Spongiformer Enzephalopathie (BSE, Quadrate) und neuer Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (nvCJK, Balken) in Großbritannien. Der rote Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt des offiziellen Tiermehlverfütterungsverbotes an Wiederkäuer.

Die Dauer der Krankheit ist im Vergleich zu sCJK verlängert (Zeidler *et al.*, 1997a; Zeidler *et al.*, 1997b). Auffallend ist weiterhin das Auftreten von nvCJK in zeitlichem

Abstand zu BSE (Abb. 1) sowie die regionale Beschränkung auf das besonders von BSE betroffene Großbritannien.

Nach der Feststellung der Analogien von Scrapie, Kuru und CJK folgte die Suche nach der Identität des infektiösen Agens. Eine wichtige Entdeckung lieferten Alper und Kollegen. Sie stellten fest, dass Hirnmaterial seine Infektiosität behält, auch wenn es hoher ionisierender Strahlung ausgesetzt wird, die Nukleinsäuren zerstört (Alper *et al.*, 1967). Diese Experimente machen ein Virus als Erreger sehr unwahrscheinlich, auch wenn einige Forscher die Suche danach fortsetzen (Akowitz *et al.*, 1994; Ozel und Diringer, 1994). Es wurde daraufhin postuliert, dass die TSE-Erreger ausschließlich aus einem Protein bestehen könnten (Griffith, 1967). Die Empfindlichkeit des Scrapie-Erregers gegen Protein zerstörende oder verändernde Reagenzien führte zur Einführung des Begriffes „Prion“ („**proteinaceous infectious particle**“) (Prusiner *et al.*, 1981; Prusiner, 1982).

1.3. Das Prion Protein

Durch Fraktionierung von Gehirnextrakten von mit Scrapie infizierten Hamstern wurde es 1982 ermöglicht, eine ausreichend reine, hoch infektiöse Fraktion zu erhalten, die fast ausschließlich aus Protein bestand. Durch eine Peptid-Sequenzierung konnte die Aminosäure-Sequenz des Prion Protein (PrP) genannten Proteins identifiziert werden. Mit einer abgeleiteten DNA-Sonde konnte das kodierende Gen PRNP identifiziert werden. Zur allgemeinen Überraschung handelte es sich dabei um ein Wirts- und kein Fremdprotein (Bolton *et al.*, 1982; Prusiner, 1982; Oesch *et al.*, 1985). Der Vergleich von PrP aus gesunden und kranken Tieren ergab, dass dasselbe Gen exprimiert wurde und die Primärstruktur des Proteins unverändert war (Basler *et al.*, 1986; Stahl *et al.*, 1993). Weiterhin waren die PrP-Mengen in gesunden und kranken Tieren unverändert (Chesebro *et al.*, 1985; Oesch *et al.*, 1985). Dies führte zu den Bezeichnungen PrP^{Sc} für PrP aus Scrapie-infizierten Tieren und PrP^C (zelluläres PrP) für PrP aus gesunden Tieren.

PrP^C ist ein überwiegend α -helikales Protein (Abb. 2), welches in nichtionischen Detergenzien gut löslich ist. Im Gegensatz dazu ist PrP^{Sc} überwiegend β -Faltblattreich und als Aggregat in nichtionischen Detergenzien unlöslich. Wird PrP^{Sc} mit Proteinase K (PK) inkubiert, entsteht ein proteaseresistentes Fragment, welches PrPres oder, nach seiner Größe, PrP27-30 genannt wird. PrP^{Sc}-Aggregate bilden amyloide Fibrillen, binden den Farbstoff Kongo-Rot und zeigen unter polarisiertem Licht eine grüne Doppelbrechung (Prusiner *et al.*, 1983; Hope *et al.*, 1988; Caughey *et al.*, 1991; Prusiner, 1991; Pan *et al.*, 1993).

Die Struktur des C-terminalen Bereichs von PrP^C verschiedener Spezies konnte durch Kernresonanzspektroskopie (NMR-Spektren) bestimmt werden: Die erste Helix wird durch zwei kleine antiparallele Faltblätter eingeschlossen; daran schließen sich zwei weitere Helices an (Abb. 2). Die Struktur wird durch die Ausbildung einer Disulfidbrücke stabilisiert. Der N-Terminus von PrP ist unstrukturiert (Riek *et al.*, 1996; Riek *et al.*, 1997; Zahn *et al.*, 2000; Lopez *et al.*, 2000; James *et al.*, 1997).

PrP enthält Wiederholungen des Aminosäuremotivs PQQGTWGQ-(PHGGGWGQ)₄ (*Octarepeats*) im N-Terminus, für die eine Kupfer-Bindungseigenschaft gezeigt wurde (Brown *et al.*, 1997a; Stöckel *et al.*, 1998; Viles *et al.*, 1999; Aronoff-Spencer *et al.*, 2000).

Die Unlöslichkeit des PrP^{Sc} hat bis heute eine genaue Aufklärung der Struktur mittels Röntgenstrukturanalyse oder Kernresonanzspektroskopie verhindert.

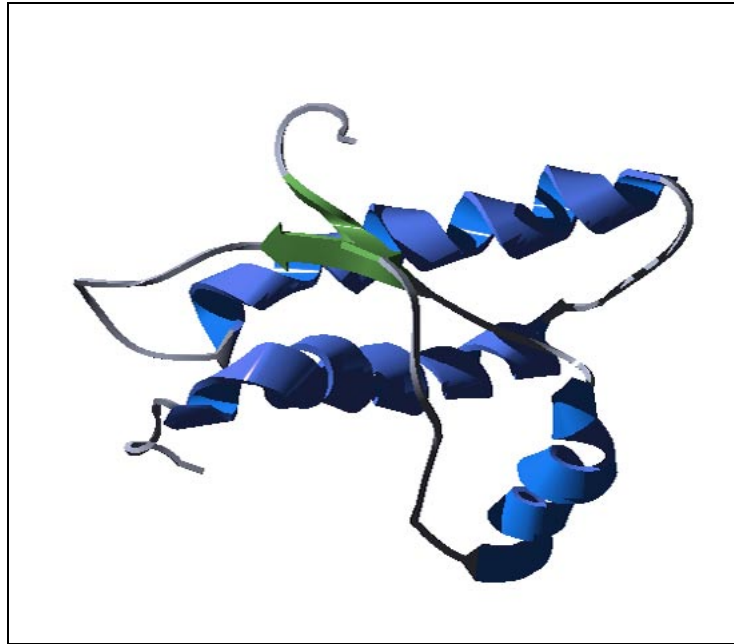


Abbildung 2. Bändermodell des strukturierten C-terminalen Bereiches (PrP121-231) des Maus-PrP nach den NMR-Strukturdaten von Riek et al. 1996. Der strukturierte Bereich beginnt bei Aminosäure 121 (oben). Das Bild wurde nach den Strukturdaten mit den Programmen Swiss-PDB Viewer und POV-Ray erstellt. Helices: blau; Faltblätter: grün.

Das PrP-kodierende Gen PRNP enthält 3 Exons, wobei der komplette Leserahmen in Exon 3 enthalten ist. Es existieren mehrere Splice-Varianten, wobei ca. 90% Exon 1-3 Verknüpfungen sind und 10% zusätzlich Exon 2 enthalten. Da durch die Unterschiede der Splice-Varianten die kodierende Region nicht verändert wird, wurde ihnen keine große Bedeutung zugewiesen (Lee *et al.*, 1998). Das Gen ist jeweils innerhalb der bis jetzt untersuchten Säugetiere sowie der Vögel hoch konserviert, zwischen Säugetieren und Vögeln sind die Homologien jedoch relativ gering (Wopfner *et al.*, 1999). Außer in Säugetieren und Vögeln wurde PrP in einer Schildkrötenart (Simonic *et al.*, 2000) und vor kurzem auch im Krallenfrosch *Xenopus leavis* (Strumbo *et al.*, 2001) nachgewiesen.

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

1.4. Prion Protein-Biogenese

PrP ist ein glykosyliertes Zelloberflächenprotein und wird als 254 Aminosäuren (AS, Maus-PrP) langes Präprotein synthetisiert. Nach dem Import in das Endoplasmatische Reticulum (ER) wird die 22 AS lange Präsequenz abgespalten. Die hydrophoben C-terminalen 23 AS fungieren als Erkennungssequenz für einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-Anker, der das reife Protein an die äußere Zellmembran heftet. Der Anker besteht aus einem Distearat, welches über einen Inositol-Ring und Trimannose mit Ethanolamin verknüpft wird. Der GPI-Anker wird als Ganzes synthetisiert und über das Ethanolamin durch eine Transamidase-Reaktion an die sogenannte ω -site des PrP (Serin 231) angehängt. Bei dieser Reaktion wird die GPI-Erkennungssequenz abgespalten. Bei einer Subpopulation von ca. 15 % wird die Trimannose des GPI-Ankers im Golgi-Apparat mit Sialsäure modifiziert (Stahl *et al.*, 1987; Stahl *et al.*, 1992).

Das PrP wird an zwei Stellen (Asparagine 180 und 196 bei der Maus) komplex glykosyliert (Stimson *et al.*, 1999). Noch während des Imports in das ER werden Glykoproteine wie PrP durch die Oligosaccharyltransferase, welche ein Teil der Protein-Translokations-Maschinerie in der ER-Membran ist (Kornfeld und Kornfeld, 1985) mit einem Zucker-Grundgerüst ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) ausgestattet. Der in α 1-2-Stellung gebundene terminale Glukose-Rest wird noch während des Proteinimports von dem integralen Membranprotein Glukosidase I abgespalten. Das im ER-Lumen residierende Enzym Glukosidase II spaltet die restlichen, in α 1-3-Stellung gebundenen Glukosen vom Zucker-Grundgerüst ab (Kalz-Fuller *et al.*, 1995; Trombetta *et al.*, 1996).

Folgender Zyklus dient der Erkennung der korrekten Faltung von Proteinen: Die UDP-Glc:Glykoprotein-Glukosyltransferase erkennt miss- oder ungefaltete Proteine und überträgt einen Glukose-Rest auf das Zuckergerüst (Suh *et al.*, 1989; Trombetta und Parodi, 1992; Sousa *et al.*, 1992). Dieses monoglukosylierte Protein wird von den Chaperonen Calnexin (membrangebunden) und Calreticulin (löslich) erkannt,

transient gebunden und von der Glukosidase II deglukosyliert. Das Protein wird solange de- und reglukosyliert, bis eine korrekte Faltung erreicht wird (Hebert *et al.*, 1996).

Weitere Interaktionen wurden zwischen PrP und der Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) und Grp94, dem ER-Homolog des Hsp90, nachgewiesen (Capellari *et al.*, 1999). Korrekt gefaltetes PrP wird in den Golgi-Apparat transportiert, wo die Zucker-Grundgerüste weiter modifiziert werden.

Auf der Zelloberfläche reichert sich PrP zusammen mit anderen GPI-verankerten Proteinen in Domänen mit spezieller Fettsäurezusammensetzung, so genannten *lipid rafts*, an (Harmey *et al.*, 1995; Vey *et al.*, 1996).

1.5. Das Prion-Konzept

Eine Bestätigung des Prion-Konzeptes, die Existenz eines neuartigen Vererbungs-Modus, der ohne Nukleinsäuren auskommt, ergaben Experimente mit transgenen Mäusen. So sind transgene Mäuse mit deletiertem PRNP ($\text{Prnp}^{0/0}$ -Mäuse) nicht infizierbar und propagieren den Erreger nicht. Eine Wiedereinführung des PRNP-Gens in eine $\text{Prnp}^{0/0}$ -Maus-Linie stellt die Infizierbarkeit wieder her (Büeler *et al.*, 1993). Die Expression von PrP^{C} ist also für eine Infektion notwendig.

Eine Vermehrung des infektiösen Materials im Gehirn verlangt eine Umwandlung des zellulären PrP^{C} in PrP^{Sc} (Pan *et al.*, 1993). Für diese Konversion von PrP^{C} in PrP^{Sc} wurde ein direkter Kontakt der beiden Isoformen postuliert, entweder auf der Zelloberfläche oder in einem endosomalen Kompartiment (Caughey und Raymond, 1991; Borchelt *et al.*, 1992; Taraboulos *et al.*, 1995). Der genaue Mechanismus dieser Konversionsreaktion ist noch unbekannt.

Zwei Modelle wurden für die Konversion vorgeschlagen. Das *template assistance*-Modell sagt eine autokatalytische Konversion vor, bei dem je ein PrP^{Sc} ein PrP^{C} als Heterodimer bindet und umformt. Eine Aggregation des PrP^{Sc} ist dafür nicht notwendig (Prusiner, 1991). Das *seeding*-Modell schlägt einen Kristallisationskeim

vor, der für die Propagation von PrP^{Sc} eine Mindestgröße erreichen muss (Jarrett und Lansbury, 1993).

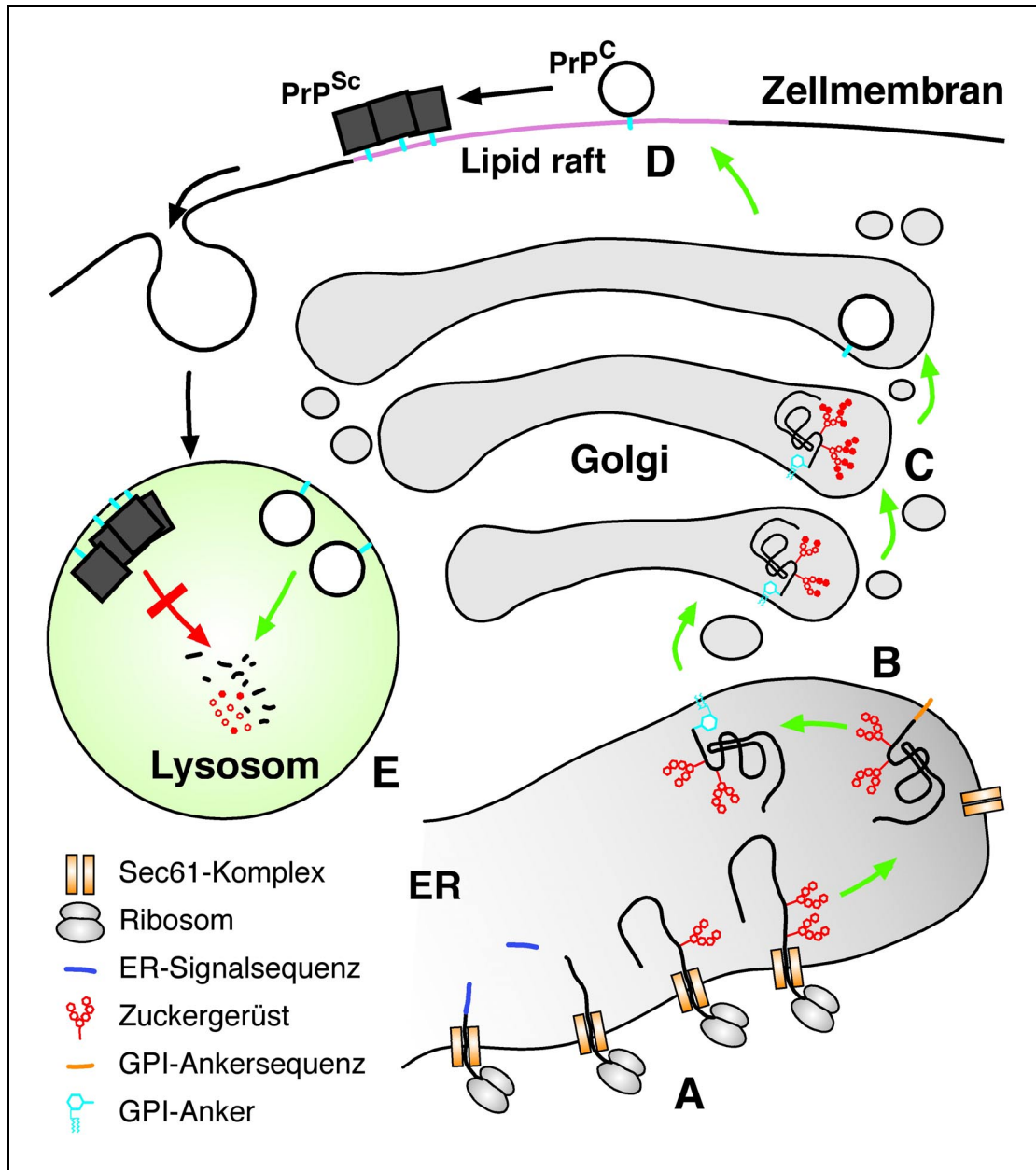


Abbildung 3. Biogenese des PrP. **A** PrP wird in das raue Endoplasmatische Reticulum (ER) importiert. Während des Imports wird die ER-Signalsequenz abgespalten und Zuckerketten werden mit dem Protein verknüpft. **B** Die GPI-Ankersequenz wird durch einen vorgeformten GPI-Anker ersetzt. **C** Im Golgi-Apparat werden die Zuckerketten komplex modifiziert. **D** PrP reichert sich auf der Zellmembran in Arealen mit spezieller Fettsäurezusammensetzung an (*Lipid rafts*). **E** Während PrP^C im Lysosom abgebaut werden kann, widersteht PrP^{Sc} der Degradation und reichert sich an.

Auch in Bakterien exprimiertes, rekombinantes PrP (rPrP) kann *in vitro* in eine unlösliche und proteaseresistente Form umgewandelt werden. Diese Aggregate sind aber nicht infektiös (Raeber *et al.*, 1992; Post *et al.*, 1998; Jackson *et al.*, 1999). Ob die fehlende Infektiösität an der in Bakterien nicht stattfindenden posttranslationalen Modifizierung liegt oder infektiöse Prionen einen bisher unbekanntem und in Bakterien nicht vorhandenen Bestandteil haben, bleibt offen.

Ein wertvolles System zur Untersuchung der Prionen stellen Zellkulturen von immortalisierten neuronalen Zellen dar, zum Beispiel die N2a-Zelllinie aus der Maus. Diese Zellen sind infizierbar und replizieren Infektiösität (Butler *et al.*, 1988; Caughey *et al.*, 1989).

Durch verschiedene Substanzen konnte die Konversion von PrP^C in PrP^{Sc} inhibiert werden, so zum Beispiel mit Kongo-Rot (Caughey und Race, 1992), Porphyrinen (Priola *et al.*, 2000) und mit Glycerol oder Dimethylsulfoxid (DMSO), so genannten chemischen Chaperonen, die die native Proteinkonformation stabilisieren (Tatzelt *et al.*, 1996). Auch verzweigte Polyamine verhindern die Konversion (Supattapone *et al.*, 1999). Durch die Wirkung von kationischen Lipopolyaminen konnte die Bildung von PrP^{Sc}-Aggregaten verhindert und schon vorhandene Aggregate aufgelöst werden (Winklhofer und Tatzelt, 2000).

Eine Konversion wird ebenfalls durch den Wirkstoff Suramin unterbunden. Hierbei bilden sich PrP-Aggregate, bevor PrP die Zelloberfläche erreicht. Diese Aggregate sind aber weder proteaseresistent noch infektiös (Gilch *et al.*, 2001).

Die sehr niedrige Häufigkeit, mit der sporadische Prionerkrankungen wie CJK auftreten, wird mit der geringen Wahrscheinlichkeit erklärt, dass sich PrP^C spontan in PrP^{Sc} umwandelt. Diese Wahrscheinlichkeit könnte dadurch erhöht werden, dass PrP^C durch eine vererbte oder somatische Mutation weniger stabil ist oder PrP^{Sc} durch eine Infektion von außen zugeführt wird. Zahlreiche Mutationen des Prion Proteins sind bekannt, die mit TSEs assoziiert sind. Fast alle dieser Mutationen liegen im strukturierten C-terminalen Bereich (Hsiao *et al.*, 1989; Dlouhy *et al.*, 1992; Petersen *et al.*, 1992; Poulter *et al.*, 1992; Gabizon *et al.*, 1993).

1.6. Alternative PrP-Topologien

Neben der mittels GPI-Anker in der Zellmembran verankerten Form wurde für PrP auch eine alternative transmembrane Topologie nachgewiesen. Mit der in Computeranalysen vorhergesagten potenziellen Transmembrandomäne (TM, Aminosäuren 114-133) kann PrP zwei transmembrane Formen einnehmen: ^{Ntm}PrP mit dem N-Terminus im ER-Lumen und ^{Ctm}PrP mit dem C-Terminus im ER-Lumen. Zuerst wurden diese Topologien in zellfreien Translationssystemen mit Weizenkeimextrakten und Kaninchen-Retikulocytenlysate nachgewiesen (Lopez *et al.*, 1990; Yost *et al.*, 1990; Hegde *et al.*, 1998a). Die Anteile der verschiedenen Topologien werden durch Mutationen im PrP moduliert, die entweder in der Nähe der Transmembrandomäne (Hegde *et al.*, 1998a) oder auch in der ER-Signalsequenz liegen (Kim *et al.*, 2001). Eine erhöhte Menge von ^{Ctm}PrP wurde auch nach einer Infektion von Mäusen mit Scrapie gefunden (Hegde *et al.*, 1999). Eine der in den *in vitro*-Importstudien nachgewiesenen ^{Ctm}PrP -fördernden Mutationen (PrP-A117V) ist mit dem Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom assoziiert (Hegde *et al.*, 1999).

In weiteren *in vitro*-Experimenten wurde gezeigt, dass für PrP zusätzliche Faktoren für den Import in das ER notwendig sind. Während alle bis dahin untersuchten Proteine in rekonstituierte Vesikel importiert werden konnten, deren Membranen die zentrale Importpore (Sec61-Komplex) sowie das Importprotein-assoziierte Protein (*translocating chain associated protein*, TRAM) enthalten (Görlich *et al.*, 1992; Görlich und Rapoport, 1993; Voigt *et al.*, 1996), wird PrP in diesem System ausschließlich als transmembrane Form importiert (Hegde *et al.*, 1998b).

1.7. Qualitätskontrolle im ER

Die geringe Häufigkeit der spontanen TSE-Erkrankungen könnte auch an einer effektiven Qualitätskontrolle liegen, die missgefaltete Proteine wie PrP^{Sc} oder Proteine mit falscher Topologie wie ^{Ctm}PrP eliminieren könnte.

Neben der oben beschriebenen Faltungskontrolle der Glykoproteine sind im ER zwei weitere Mechanismen der Qualitätskontrolle vorhanden: Die *Unfolded Protein Response* (UPR) sowie die ER-assoziierte Degradation (ERAD).

Auf die Anhäufung missgefalteter Proteine im ER reagiert die Zelle mit einer Signaltransduktionskaskade, der *Unfolded Protein Response* (UPR) (Lee, 1987; Kozutsumi *et al.*, 1988; Gething und Sambrook, 1992), die von der Hefe bis zu den Säugetieren konserviert ist (McMillan *et al.*, 1994; Shamu *et al.*, 1994). Die transmembrane Kinase/RNase Ire1p (Cox *et al.*, 1993; Mori *et al.*, 1993) vermittelt das Signal vom ER-Lumen in das Cytosol. Nach einer Phosphorylierung der cytosolischen Domäne schneidet Ire1p ein Intron aus der Vorläufer-mRNA des Transkriptionsfaktors Hac1p (Cox und Walter, 1996; Nikawa *et al.*, 1996; Shamu und Walter, 1996; Kawahara *et al.*, 1998). Die geschnittene mRNA wird durch eine tRNA-Ligase wieder verbunden (Sidrauski und Walter, 1997). Das *Splicing* der mRNA führt dazu, dass eine effektive Translation stattfinden kann (Chapman und Walter, 1997; Kawahara *et al.*, 1997). Hac1p bindet an das *Unfolded Protein Response*-Element (UPRE) und aktiviert die Transkription verschiedener Gene, deren Produkte die Faltung ER-residenter Proteine unterstützen (Mori *et al.*, 1992). Induziert werden unter anderem die Chaperone Grp78/Kar2p und Grp94 sowie die PDI (Protein-Disulfid-Isomerase) (Dorner *et al.*, 1990; Little und Lee, 1995). Durch die UPR-aktivierte Expression des Transkriptionsfaktors Son1p werden auch Untereinheiten des Proteasoms verstärkt exprimiert, welches faltungsinkompetente Proteine degradiert (Ng *et al.*, 2000).

Die ER-assoziierte Degradation (ERAD) ist ein Mechanismus, der ungefaltete Proteine oder Untereinheiten nicht korrekt assemblierter Proteinkomplexe aus dem ER entfernt und der Degradation durch das cytosolische 26S-Proteasom zuführt (Finley *et al.*, 1984; Jentsch *et al.*, 1987; Hurtley und Helenius, 1989; Klausner und Sitia, 1990; Sommer und Jentsch, 1993; Jensen *et al.*, 1995).

In einem ersten Schritt müssen missgefaltete Proteine im ER erkannt werden, woran vermutlich die ER-residenten Chaperone und die Glykosylierungsmaschinerie beteiligt sind (McCracken und Brodsky, 1996; Plemper *et al.*, 1997; Jakob *et al.*, 1998). Der zweite Schritt besteht aus dem retrograden Transport der Proteine vom ER in das Cytosol durch die zentrale Translokationspore (Sec61-Komplex), die auch am Proteinimport beteiligt ist (Wiertz *et al.*, 1996; Plemper *et al.*, 1997; Zhou und Schekman, 1999). Verschiedene andere Faktoren sind für den Export und die nachfolgende Ubiquitinierung notwendig. Das transmembrane Protein Hrd1p/Der3p besitzt eine RING-H2-Finger-Domäne, die für eine Klasse von Ubiquitin-Ligasen typisch ist (Bordallo *et al.*, 1998; Deshaies, 1999) und vermutlich der Substratbindung dient. Der dritte ERAD-Schritt besteht in der Polyubiquitinierung und der Degradation des Substrates durch das 26S-Proteasom. Ubiquitin ist ein kleines weit verbreitetes Protein (Name!), das mit freien Aminogruppen der zum Abbau bestimmten Proteine verknüpft wird. Durch einen internen Lysin-Rest wird eine kleine Kette von Ubiquitin gebildet. Die Polyubiquitinierung dient als Signal für den Abbau (Schlesinger *et al.*, 1975; Chau *et al.*, 1989). Verschiedene Ubiquitin konjugierende Enzyme sind identifiziert worden, darunter Ubc1p, Ubc6p und Ubc7p in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Seufert *et al.*, 1990; Sommer und Jentsch, 1993; Vassal *et al.*, 1992).

Bis jetzt sind vor allem Proteine wie die mutierte vakuoläre Carboxypeptidase Y (CPY*) als ERAD-Substrate bekannt (Knop *et al.*, 1996), aber auch natürliche ER-Proteine mit regulierter Kurzlebigkeit wie der HMG-CoA-Reduktase (Hmg2p) (Hampton und Rine, 1994; Hampton und Bhakta, 1997).

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

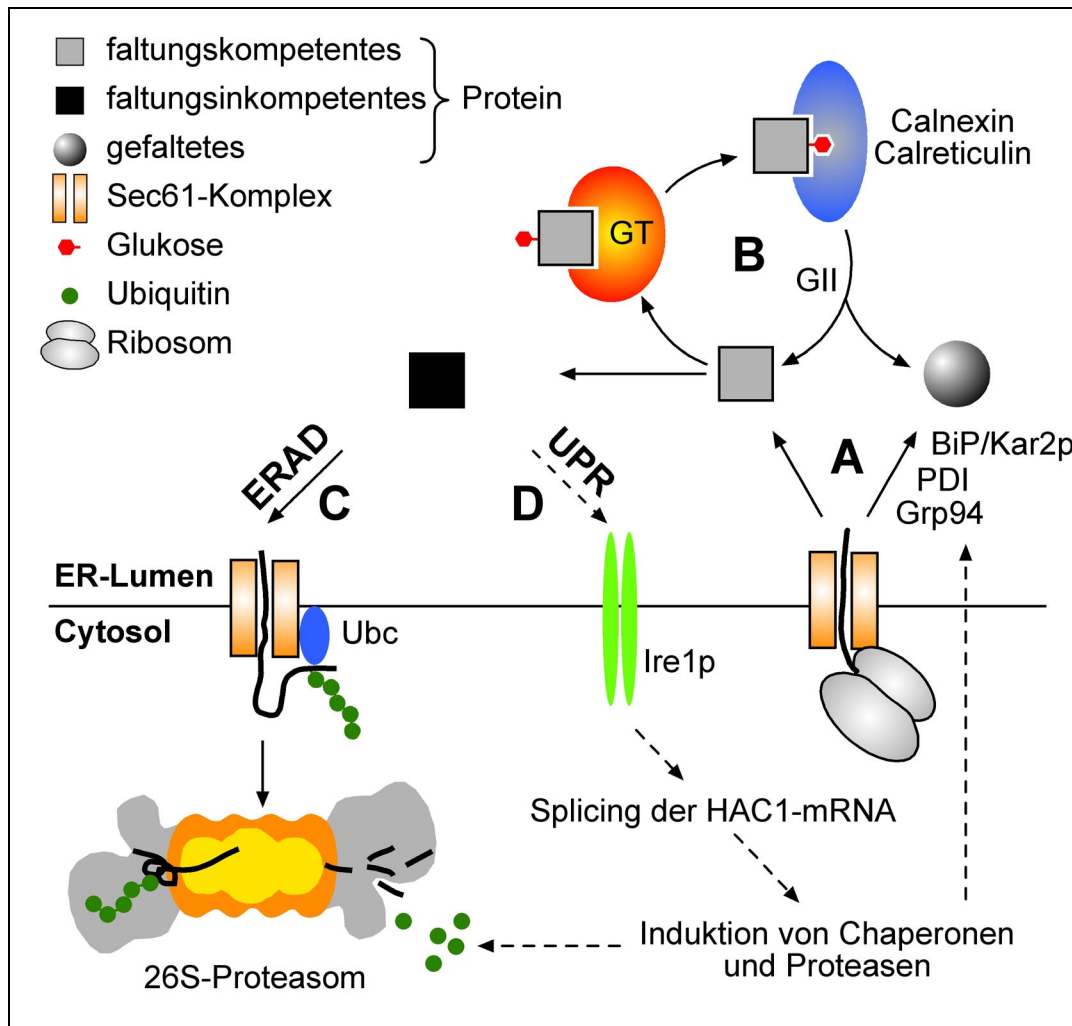


Abbildung 4. Qualitätskontrolle im ER. **A** Proteine falten im ER spontan oder mit Unterstützung von Hilfsproteinen wie der Protein-Disulfidisomerase (PDI) und Chaperonen wie Hsp70 (BiP/Kar2p) oder Hsp90 (Grp94). **B** Missgefaltete, aber faltungskompetente Glykoproteine durchlaufen einen Glukosylierungszyklus (siehe Text). **C** Faltungskompetente Proteine werden in das Cytosol transportiert, ubiquitiniert und durch das 26S-Proteasom degradiert (ER-assoziierte Degradation, ERAD). **D** Eine Anhäufung missgefalteter Proteine im ER löst eine Signaltransduktionskaskade (*Unfolded Protein Response*, UPR) aus, die die Induktion von faltungsfördernden Proteinen sowie Proteasen bewirkt. GT: UDP-Glc:Glykoprotein-Glukosyltransferase; GII: Glukosidase II; Ubc: Ubiquitin konjugierendes Enzym.

1.8. Funktion von PrP?

Eine Funktion konnte bis jetzt für PrP nicht nachgewiesen werden. In $Prnp^{0/0}$ -Mäusen der Linie „Nagasaki“ wurden Bewegungsstörungen (Ataxie), Verlust von Purkinje-Zellen und Demyelinisierungserscheinungen nachgewiesen (Sakaguchi *et al.*, 1996; Moore *et al.*, 1999). Bei $Prnp^{0/0}$ -Mäusen der Linien „Edinburgh“ und „Zürich I“ dagegen waren diese Symptome nicht feststellbar. Es traten lediglich leichte

elektrophysiologische Veränderungen und Störungen im circadianen Rhythmus der Tiere auf (Büeler *et al.*, 1992; Collinge *et al.*, 1994; Tobler *et al.*, 1996). Die *knock out*-Maus-Linien unterscheiden sich in der Position und Länge der entfernten Sequenzen.

Der beobachtete Phänotyp in der Linie „Nagasaki“ ist wohl auf eine durch die Deletionen verursachte Überexpression des PrP-Homologs Doppel (Dpl) zurückzuführen, was durch die Wiederholung der *knock out*-Experimente in der Linie „Zürich II“ nachgewiesen werden konnte (Moore *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000; Rossi *et al.*, 2001).

Das Doppel kodierende Gen PRND liegt 16 Kilobasen stromabwärts des PRNP. Doppel teilt mit PrP eine ca. 25%ige Homologie im C-Terminus, während der N-Terminus fehlt. Es ist ebenfalls glykosyliert und GPI-verankert, hat aber zwei Disulfid-Brücken. Doppel wird hauptsächlich in den Hoden und im Herzen, aber nur schwach im Gehirn gesunder Tiere exprimiert (Moore *et al.*, 1999; Silverman *et al.*, 2000).

Eine Funktion für PrP^C im Kupferhaushalt der Neuronen wurde von seiner Kupferbindungseigenschaft abgeleitet. Im Vergleich zu Wildtyp-Zellen wurde in Prnp^{0/0}-Zellen eine niedrigere Kupferkonzentration gemessen (Brown *et al.*, 1997a). Es wurde postuliert, dass PrP^C als Kupferchelator fungiert, der Enzyme wie die schädliche Radikale entfernende Superoxid-Dismutase (SOD1) mit dem Ion belädt. So hatten Prnp^{0/0}-Zellen eine verringerte SOD-Aktivität und eine veränderte Reaktion auf oxidativen Stress (Brown *et al.*, 1997b). Andere Studien konnten diese Ergebnisse allerdings nicht bestätigen (Waggoner *et al.*, 2000).

Für PrP^C wurde auch eine Rolle in der Signaltransduktion in differenzierten Neuronen vorgeschlagen. So konnte nach einer durch spezifische Antikörper induzierten Dimerisierung des PrP eine Veränderung der Phosphorylierung der Tyrosin-Kinase Fyn nachgewiesen werden. Dies resultierte in einer erhöhten Fyn-Kinase-Aktivität. In

dieser Studie wurde allerdings nicht gezeigt, wie das in der Zellmembran verankerte PrP^C mit dem cytosolischen Fyn interagiert (Mouillet-Richard *et al.*, 2000).

1.9. Hefe-„Prionen“

Das Prion Protein besitzt kein Homolog in der Hefe. Allerdings sind in der Hefe extrachromosomale Vererbungsgänge gefunden worden, die mit dem Prion-Konzept erklärt werden können (Wickner, 1994). Der Phänotyp [PSI⁺] wird durch die Aggregation des Proteins Sup35p ausgelöst (Cox, 1965; Paushkin *et al.*, 1996). Sup35p ist ein essentieller Translationsterminations-Faktor, dessen Fehlen sich durch ein Überlesen von Stop-Codons auszeichnet (Cox *et al.*, 1988). [PSI⁺] kann *de novo* auftreten, aber auch durch eine Überexpression von Sup35p induziert werden (Chernoff *et al.*, 1993). Es wurde gezeigt, dass das erste Drittel des Proteins die Prion-Determinierende-Domäne ist, welche für die Aggregation, nicht aber für die Funktion als Terminationsfaktor notwendig ist (Ter-Avanesyan *et al.*, 1993; Ter-Avanesyan *et al.*, 1994). Diese Domäne definiert unter verschiedenen Hefestämmen eine Speziesbarriere. So kann die Überexpression der Prion-Domäne des Hefestammes *Candida albicans* in *S. cerevisiae* kein [PSI⁺] induzieren (Santoso *et al.*, 2000; Chien und Weissman, 2001). Ein weiteres, ebenfalls gut charakterisiertes Hefe-Prion ist [URE3] (Lacroute, 1971; Aigle und Lacroute, 1975). Dieser Phänotyp wird durch die Aggregation des beim Stickstoffhaushalt beteiligten Proteins Ure2p ausgelöst (Edskes *et al.*, 1999).

1.10. Zielsetzung

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, die Biogenese und Funktion des Prion Proteins der Maus in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zu analysieren. Dazu sollten das Prion Protein der Maus und verschiedene Deletionsmutanten in *S. cerevisiae* exprimiert werden. Die Hefe gehört zu den am besten charakterisierten

Organismen, dessen Genom vollständig sequenziert ist (Mewes *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu anderen Modellsystemen sind zahlreiche Hefe-Stämme erhältlich oder leicht herstellbar, die durch Deletion oder Mutation von Genen bestimmte Funktionen, die die Biogenese von Proteinen beeinflussen, nicht mehr ausführen können. So sollten Aspekte der Qualitätskontrolle und der intrazellulären Lokalisation verschiedener PrP-Konstrukte in unterschiedlichen genetischen Hintergründen untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Geräte

Agarosegel-Elektrophoresekammern: Zentralwerkstatt, Max-Planck-Institut, Martinsried

Analysesoftware PSORT II: <http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>

Autoklav GE2606: Getinge Van Dijk, Straelen

Brutschränke: Heraeus, Hanau

Crosslinker UV Stratalinker 2400: Stratagene, Heidelberg

Filmentwickler X-Omat: Kodak, Stuttgart

Gelbetrachter: MWG Biotech, Ebersberg

Geltrockner SGD300: Savant, Holbrook, NY, USA

Invers-Mikroskop Axiovert 25: Carl Zeiss, Göttingen

Kühlzentrifuge GS-6R mit Rotor GH3.8: Beckman, Unterschleissheim

Kühlzentrifuge J2-21M mit Rotor JA-14: Beckman, Unterschleissheim

Kultur-Schüttler Forma Scientific 4518: ThermoQuest, Egelsbach

Mikrowelle M633: Samsung, Schwalbach/Ts.

PCR-Gerät GeneAmp PE2400: Perkin Elmer, Shelton, CT, USA

Phosphoimager FLA-2000 mit Software ImageGauge: Fuji Photo Film, Düsseldorf

Pipetten Gilson P2, P10, P20, P200, P1000 und Distriman: Abimed, Langenfeld

Pipettierhilfe vacu-petus: Bender & Hobein, Zürich, Schweiz

Polyacrylamidgel-Elektrophoresekammer Hoefer SE600 mit Power Supply EPS 601: Pharmacia Biotech, Freiburg

Quantifizierungssoftware AIDA: raytest, Straubenhardt

Reinstwasseranlage Milli-Q_{PLUS} PF: Millipore, Eschborn

Renderingsoftware POV-Ray for MacOS Version 3.1g.r2: <http://www.povray.org>

Schwenktisch GFL 3017: Merck eurolab, Ismaning

Spektrophotometer DU-640: Beckman, Unterschleissheim

Strukturanalysesoftware Swiss-PdbViewer v3.7b2:

<http://expasy.ch/spdbv/mainpage.html>

Thermoblöcke: Zentralwerkstatt, Max-Planck-Institut, Martinsried

Tischzentrifuge Biofuge A: Heraeus, Hanau

Tischzentrifuge Centrifuge 5415C: Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

Transferkammer Hoefer TE-Serie mit Power Supply EPS 2A200: Pharmacia Biotech, Freiburg

Überkopf-Mischer Heidolph REAX 2: Merck eurolab, Ismaning

Ultrazentrifuge Optima L90K mit Rotoren SW28, SW41Ti und SW55Ti: Beckman, Unterschleissheim

Ultrazentrifuge TLX-120 mit Rotor TLA-120.2: Beckman, Unterschleissheim

UV-Tisch Foto/UV21: FOTODYNE, Hartland, WI, USA

Vortex: Bender & Hobein, Zürich, Schweiz

Zählkammer, Neubauer: Merck eurolab, Ismaning

Zellkulturschränke Forma Scientific 3111: ThermoQuest, Egelsbach

Zellzerstörer Mini-BeadBeater 8, Biospec Products: Roth, Karlsruhe

2.2. Chemikalien, Enzyme und Materialien

β-Mercaptoethanol: Merck, Darmstadt

Aceton: Merck, Darmstadt

Agarose: Serva, Heidelberg

Aminosäuren: Sigma, Deisenhofen

Ampicillin: Boehringer Mannheim, Mannheim

Amplify: Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Anti-CPY Antikörper, Molecular Probes: Mo Bi Tec, Göttingen

Anti-Kaninchen Antikörper (HRP-gekoppelt) aus Esel: Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Anti-Maus Antikörper (HRP-gekoppelt) aus Schaf: Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Anti-PrP Antikörper 3F4: Signet Laboratories, Dedham, MA, USA

Anti-V-ATPase Antikörper, Molecular Probes: Mo Bi Tec, Göttingen

Bacto Agar: Difco Laboratories, Detroit, MI, USA

BSA: USB, Cleveland, OH, USA

Complete Protease-Inhibitor: Boehringer Mannheim, Mannheim

Coomassie-Brilliant-Blau G-250: USB, Cleveland, OH, USA

Desoxycholat: Sigma, Deisenhofen

Dinatriumhydrogenphosphat: Merck, Darmstadt

Doxycyclin: Sigma, Deisenhofen

DTT: Merck, Darmstadt

Dulbecco's PBS: GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe

ECL: Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

EDTA: USB, Cleveland, OH, USA

Endoglykosidase H: NEB, Schwalbach/Ts.

Essigsäure: Merck, Darmstadt

Ethanol: Sigma, Deisenhofen

Ficoll 400: Merck, Darmstadt

Formamid: Merck, Darmstadt

Fötales Rinderserum: GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe

Galaktose: Sigma, Deisenhofen

Gelladespitzen Sorensen MultiFlex RoundTips: Roth, Karlsruhe

Glasperlen, säuregewaschen, Ø = 0,45-0,65 mm: Sigma, Deisenhofen

Glukose: Sigma, Deisenhofen

Glycin: USB, Cleveland, OH, USA

HCl: Merck, Darmstadt

Hefe Nitrogen Base: Difco Laboratories, Detroit, MI, USA

Hefeextrakt: Difco Laboratories, Detroit, MI, USA

Hefeprotease-Inhibitor-Cocktail: Sigma, Deisenhofen
HEPES: USB, Cleveland, OH, USA
Heringspermien-DNA: Boehringer-Mannheim, Mannheim
Instant-Magermilchpulver: Uelzena, Uelzen
Kaliumacetat: Sigma, Deisenhofen
Kaliumchlorid: USB, Cleveland, OH, USA
Kaliumdihydrogenphosphat: Merck, Darmstadt
Lachsspermien-DNA: Roche Diagnostics, Mannheim
Lithiumacetat: Sigma, Deisenhofen
Magnesiumacetat: Sigma, Deisenhofen
Meglumin-Diatrizoat: Sigma, Deisenhofen
Methanol: Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat: Merck, Darmstadt
Natriumchlorid: Merck, Darmstadt
Natriumcitrat: Merck, Darmstadt
Natrium-Diatrizoat: Sigma, Deisenhofen
Natriumfluorid: Sigma, Deisenhofen
Natriumhydroxid: Merck, Darmstadt
Nitrozellulose-Membran BA85: Schleicher & Schuell, Dassel
Oligolabelling-Kit: Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml: ABgene, Hamburg
PEG3350: Sigma, Deisenhofen
Pepton: Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Petrischalen: Greiner, Frickenhausen
Pfu-DNA-Polymerase: Promega, Mannheim
Phosphorsäure 85%: Merck, Darmstadt
Pipettenspitzen für Gilson Distriman: Abimed, Langenfeld
Pipettenspitzen für Gilson P-Serie: Continental Lab Products, San Diego, CA, USA
PMSF: Sigma, Deisenhofen

Polyacrylamid/Bisacrylamid (19:1 und 29:1) 40%: Roth, Karlsruhe

Polyvinylpyrrolidon: Merck, Darmstadt

ProMix ³⁵S-Methionin/Cystein: Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Proteasominhibitor MG132: CALBIOCHEM, Bad Soden

Proteinase K: Boehringer Mannheim, Mannheim

ProteinA-Trisacryl-Matrix: Pierce, KMF Laborchemie, St. Augustin

ProteinG-Sepharose-Matrix: Pierce, KMF Laborchemie, St. Augustin

QIAprep Spin Plasmidextraktionskit: QIAGEN, Hilden

QIAquick Gelextraktionskit: QIAGEN, Hilden

Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml: Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

Restriktionsendonukleasen: NEB, Schwalbach/Ts.

RNeasy Minikit: QIAGEN, Hilden

Röntgenfilme Kodak Biomax MR: Sigma, Deisenhofen

Sarkosyl: USB, Cleveland, OH, USA

Schraubdeckel-Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml: Sarstedt, Nürnbrecht

SDS: Roth, Karlsruhe

Shrimp-Alkalische-Phosphatase: Roche Diagnostics, Mannheim

Sorbitol: Sigma, Deisenhofen

sterile Einwegpipetten für die Zellkultur, Nalge Nunc: Fisher Scientific, Nidderau

Sukrose: Sigma, Deisenhofen

T4-DNA-Ligase: NEB, Schwalbach/Ts.

Transfektionsreagenz Lipofectamine plus: GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe

Trichloressigsäure: Sigma, Deisenhofen

Tris: USB, Cleveland, OH, USA

Triton X-100: USB, Cleveland, OH, USA

Trypton: Difco Laboratories, Detroit, MI, USA

Tween-20: USB, Cleveland, OH, USA

Zellkulturmedien MEM, OPTI-MEM: GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe

Zellkulturschalen und -flaschen: BD Biosciences Falcon, Heidelberg

Zellkulturzusatz Penicillin/Streptomycin/Glutamin: GibcoBRL Life Technologies, Karlsruhe

2.3. Antikörper

Antikörper	Verdünnung
α -Gim2	1:1000
α -V-ATPase	1:1000
3F4	1:5000
A7	1:1000
RO73	1:2000

Polyklonale Antiseren wurden freundlicherweise von Prof. S.B. Prusiner (RO73) und Dr. Katja Siegers (α -Gim2) zur Verfügung gestellt. Das α -PrP-Antiserum A7 wurde durch Immunisierung von Kaninchen mit gereinigtem rekombinanten PrP hergestellt (Heller *et al.*, 2002).

2.4. Medien

Alle Medien wurden mit Wasser angesetzt, das durch eine Reinstwasseranlage zur Qualität *aqua bidest* gereinigt wurde. Die Medien wurden für 20 min bei 120°C autoklaviert. Zur Herstellung von Platten für *S. cerevisiae* wurde 2,3%, für *E. coli* 1,8% Bacto Agar zugefügt.

2.4.1. Medien für *Saccharomyces cerevisiae*

Vollmedium (YPD)

1% Hefeextrakt; 1% Pepton; 2% Glukose

Synthetisches Vollmedium (SC)

0,7% Hefe Nitrogen Base; 2% Glukose (SCD) oder 2% Galaktose (SCGal)

Aminosäuren bzw. Vorstufen der Nukleotidsynthese wurden je nach Bedarf der Zellen aus Stammlösungen hinzugefügt. Zu Selektionszwecken wurde die entsprechende Komponente weggelassen.

Medium zur Repression des Tetracyclin-kontrollierten Promoters enthielt Doxycyclin in unterschiedlichen Konzentrationen (Standard: 1 mg/l).

2.4.2. Medium für *Escherichia coli*

LB-Medium

1% Trypton; 1% NaCl; 0,5% Hefeextrakt

Selektivmedium enthielt 100 mg/l Ampicillin.

2.5. Stämme und Zellen

2.5.1. Stämme von *Saccharomyces cerevisiae*

Stamm	Genotyp	Herkunft
HU1	MATa; his3; ura3	M. Tector, unveröffentlicht
RSY2022	Mat α ; SEC61::HIS3; ade2; can-100; his3; leu2; trp1; ura3; [pSEC61 (CEN/LEU), pMZ11 (UPRE-lacZ CEN/TRP)]	Zhou und Schekman, 1999
RSY2027	wie RSY2022; statt pSEC61 psec61-R4 (kodiert Sec61p mit A130V-Mutation in der 3. Transmembrandomäne)	Zhou und Schekman, 1999
Y0150	MATa; his3; leu2; lys2; trp1; ura3; UBC1::HIS3	Jentsch, 1992

2.5.2. Stamm von *Escherichia coli*

Stamm	Genotyp	Herkunft
DH5 α	<i>supE44, ΔlacU169, (ϕ80lacZΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	Hanahan, 1983

2.5.3. Zellen von *Mus musculus*

Zelllinie	Typ	Herkunft
N2a	Neuroblastomzellen aus einem spontanen Gehirntumor einer Stamm A Albino-Maus	Klebe und Ruddle, 1969

2.6. Molekularbiologische Standardmethoden

Molekularbiologische Standardmethoden wurden für die Klonierung von DNA-Fragmenten, die Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen, die Quantifizierung von Nukleinsäuren, die Isolierung von Gesamt-DNA aus *S. cerevisiae*, die Agarose-Gelelektrophorese sowie für die Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese benutzt (Ausubel *et al.*, 1987-2001). DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des QIAquick Gelextraktionskits aus Agarosegelen eluiert. Plasmide wurden mit Hilfe des QIAprep Spin Plasmidextraktionskits aus *E. coli*-Zellen isoliert. RNA wurde mit dem RNeasy Minikit isoliert.

2.7. Plasmide

2.7.1. Plasmide für *S. cerevisiae*

Plasmid	Herkunft
pYES2	Invitrogen, Karlsruhe
pTET423	diese Arbeit

2.7.2. Herstellung des Plasmids pTET423

Für eine regulierbare Expression von Genen wurde das Plasmid pTET423 hergestellt, in dem der Promoter unter der Kontrolle des Tetracyclin-Transaktivators (tTA) steht. Das tTA-Gen, die Operatorsequenz (tetO), der CYC1-Promoter, die *Multiple Cloning Site* sowie die Transkriptionsterminationssequenz wurden mit dem Restriktionsenzym *PvuII* aus dem Plasmid pCM190 (Gari *et al.*, 1997) herausgeschnitten und in dieselben Schnittstellen des Plasmids pRS423 (Sikorski und Hieter, 1989) eingefügt. pTET423 ist ein induzierbares *multi copy*-Plasmid mit einem HIS3-Marker.

2.7.3. Plasmide für *E. coli*

Plasmid	Herkunft
pBluescript SK-	Stratagene, Heidelberg
pEGFP-C1	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
pBQ1R14	R. Barz
pcDNA3.1-3F4	Gilch <i>et al.</i> , 2001
pcDNA3.1-CD4	H.M. Schätzl

2.7.4. Plasmid für N2a-Zellen

Plasmid	Herkunft
pcDNA3.1-ZEO+	Invitrogen, Karlsruhe

2.8. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (Saiki *et al.*, 1988) dient der selektiven Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels thermostabiler DNA-Polymerase und spezifischen Oligonukleotiden (*Primer*).

2.8.1. Oligonukleotide (*Primer*)

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

	5'	3'
AV3-3	TACTGCCCCAACTGCCGCGACCCCGACCATATGCTTCAT	
AV3-5	CATATGGTCGGGGTTCGCGGCAGTTGGGGCAGTAGTG	
CD4-3	CTCCTCGCATGCTCAGATGAGATTATGGCTCTT	
CD4-5	TATTACGACGGGCGTCGATCTGTGTTCCCTGGCTTGCGTG	
cPrP3	TCCAGGCTTTGGCCGCTTTTTTCATTGTTGAGATTTAGCTGTGTTT	
cPrP5	AAACACAGCTAAATCTCAACAATGAAAAAGCGGCCAAAGCCTGGA	
GFP3	TTAGATGCATGCTTATCCGGACTTGTACAGCTC	
GFP5	CGGTCCGACGTC CCGGTGAGCAA	
GM3	GAAAAGGCATGCTCAGCTGGATCTTCTCCCGTCGTA ATAGGCCTG	
GmG+5	ACTGCGGATGACGTCCACCTGGAGGGTGGAAC	
GmG3	GACCCGTCGTAATAGGCCTGGGACTCCTT	
GmG5	TTTGCTGGCGTCGCAACTGCGAAAAAGCGGCCAAAGCCTGGA	
GPI3	ATGTAAGCATGCTGTTCTTTTTAATTTACCGGTGGT	
GPI5	CAGGCCTATTACGACGGGTCTTCTAGCAAGAAGAATGCTGCCACCA ACGTTAAAGCTAAC	
G-SS+3	GTTCCACCCTCCAGGTGGGACGTCATCCGCAGT	
G-SS3	TCCAGGCTTTGGCCGCTTTTTTCGCAGTTGCGACGCCAGCAAA	
G-SS5	CAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGT	
KAR2-3	TATCTACAATTCGTCTGTTTCGAAATAATCACCATCGTCATCTTCA TCTTC	
KAR2-5	CATACCATGTTTTTCAACAGACTAAGCGCTGGCAAG	
MPrP3	GGAAGGTCTAGATCATCCCACGATCAGGAAGAT	
MPrP5	GCGGAATTCTAAATGTTGTTTAAATCCCTTTCAA	
P116-3	ACGGCCCCGCATGCTCATGCAGCAGCGCCGGCCATGTGCTT	
P121-231-3	CATGTAGCCACCAAGGCCCCCTGGAACATCGTCCGCAGTTGC	
P121-231-5	GCAACTGCGGACGATGTTCCAGGGGGCCTTGGTGGCTACATG	
P133-3	GATCATGCATGCTCACATGGCGCTCCCCAGCAT	
P141-231-3	GCGGTCTCCAGTCGTTGCCTGGAACATCGTCCGCAGTTGC	

	5'	3'
P141-231-5	GCAACTGCGGACGATGTTCCAGGCAACGACTGGGAGGACCGC	
P157-231-3	CCTGTAGTACACTTGGTTAGGTGGAACATCGTCCGCAGTTGC	
P157-231-5	GCAACTGCGGACGATGTTCCACCTAACCAAGTGTACTACAGG	
P166-231-3	GTTCTGGTTGCTGTACTGATCTGGAACATCGTCCGCAGTTGC	
P166-231-5	GCAACTGCGGACGATGTTCCAGATCAGTACAGCAACCAGAAC	
P90-231-3	ATGGGTACCCCCTCCTTGTGGAACATCGTCCGCAGTTGC	
P90-231-5	GCAACTGCGGACGATGTTCCACAAGGAGGGGGTACCCAT	
P-CD4-3	CACGCAAGCCAGGAACACAGATCGACGCCCGTCGTAATA	
PcPrP-114-3	TGCCCC <u>GCGCCT</u> CAAGCCCCTGCCATATGCTT	
PcPrP-133-3	GATCAT <u>GCGCCT</u> CACATGGCGCTCCCCAGCAT	
PcPrP-145-3	ACGGTAG <u>GCGCCT</u> CACTCCCAGTCGTTGCCAAA	
PcPrP5	GAATCAA <u>AGCTT</u> ATGGCGAACCTTGGCTAC	
TM3	AAAATGGATCATGGGCCTGCTGGGCTTGTTCCACTG	
TM5	CAGTGAACAAGCCCAGCAGGCCCATGATCCATTTT	
tPrP3	TATTCATAG <u>CGGCCGCT</u> TATCAATTAGATCGACGCCCGTCGTAATA	
tPrP5	GCGGGATCCTAAATGTTGTTTAAATCCCTTTCAA	
NPrP-GFP5	AAAAAG <u>GACGTCCC</u> ACCTGGGGGGT	
NPrP-GFP3	AGCAGC <u>GACGTCTG</u> CCGCAGCCCCTGC	

2.8.2. Rekombinante PCR

Um verschiedene Genabschnitte ohne das Einfügen von Restriktionsschnittstellen miteinander zu verknüpfen, wurde die rekombinante Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt (Higuchi, 1990). Dabei werden in zwei getrennten Ansätzen Genfragmente mit *Primern* mit überlappender Sequenzhomologie amplifiziert (Abb. 5A). Diese werden dann in einer zweiten Reaktion als Matrize eingesetzt, wobei die hybridisierenden Sequenzhomologien als innere *Primer* fungieren und beide Stränge der DNA vervollständigt werden. Die externen *Primer* sorgen für die Amplifikation

des Produktes (Abb. 5B). Durch die Wahl der internen *Primer* können Mutationen, Insertionen oder Deletionen in ein Gen eingefügt werden.

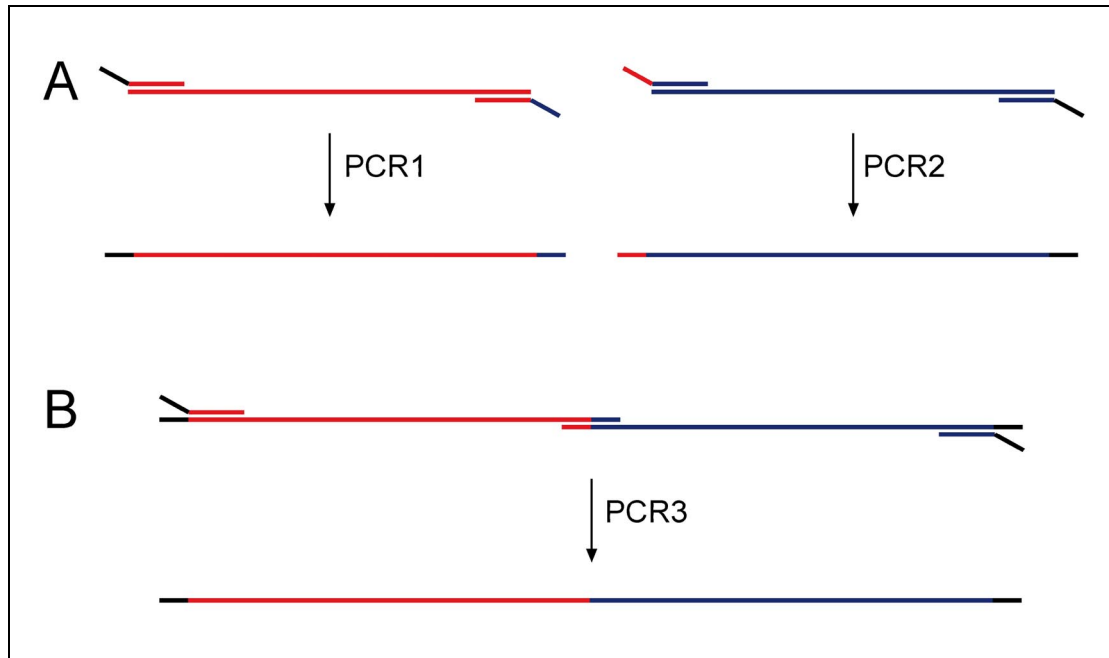


Abbildung 5. Klonierungsstrategie zur Verknüpfung zweier Genfragmente. A. Die beiden zu verknüpfenden Fragmente werden separat per PCR amplifiziert. Dabei weisen die internen Primer am 5'-Ende jeweils Sequenzen des anderen Fragments auf. B. In der folgenden PCR-Reaktion lagern sich die überlappenden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

2.8.3. PCR-Bedingungen

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

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

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

2.8.4. Sequenzierungen

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

2.8.5. Prion Protein-Konstrukte unter Kontrolle des GAL1-Promoters

Konstrukte zur Galaktose-induzierbaren Expression mit Hilfe des GAL1-Promoters wurden in den Vektor pYES2 (Invitrogen) ligiert.

2.8.5.1. Prion Protein der Maus: pYES2-mPrP

Das PrP kodierende Gen PRND wurde mit den *Primern* mPrP5 und mPrP3 amplifiziert. Als Matrize diente das Plasmid pcDNA3.1-3F4, in dem PRND so modifiziert war, dass es PrP mit den Mutationen L108M und V111M exprimiert. Diese Mutationen entsprechen den Aminosäuren des menschlichen PrP und erlauben eine Detektion des Proteins mit dem monoklonalen Antikörper 3F4 (Serban *et al.*, 1990). mPrP wurde über die Schnittstellen *EcoRI* und *XbaI* in das Plasmid pYES2 ligiert.

2.8.5.2. PrP ohne GPI-Anker: pYES2-mPrP Δ GPI

Das Konstrukt mPrP Δ GPI wurde mit den *Primern* mPrP5 und GM3 amplifiziert. Als Matrize diente das Plasmid pcDNA3.1-3F4. Es kodiert mPrP ohne die GPI-Anker-Erkennungssequenz bis zur Aminosäure 231 und wurde über die Schnittstellen *EcoRI* und *SphI* in das Plasmid pYES2 ligiert.

2.8.6. Prion Protein-Konstrukte unter Kontrolle des GAS1-Promoters

Zur konstitutiven Expression mit Hilfe des GAS1-Promoters (Nuoffer *et al.*, 1991; Conzelmann *et al.*, 1988) wurden Konstrukte mit dem GAS1-Promoter fusioniert und in den Vektor pYES2 ligiert. Diese Plasmide wurden mit pY benannt.

2.8.6.1. PrP mit Signalsequenzen der Hefe: pY-GmG

Bei dieser Klonierung wurde die Sequenz des gereiften mPrP (PrP23-231) mit dem Promoter des GAS1-Gens und den Signalsequenzen für ER-Import und GPI-Anker-Erkennung des Hefe-Proteins Gas1p fusioniert. In einer ersten Reaktion wurden der Promoter und die ER-Signalsequenz (Aminosäuren 1-22) mit den *Primern* G-SS5 und G-SS3 amplifiziert. Als Matrize diente das Plasmid pBQ1R14. Die PrP-Sequenz (Aminosäuren 23 bis 227) wurde mit den *Primern* GmG5 und GmG3 vom Plasmid pcDNA3.1-3F4 amplifiziert. Die GPI-Erkennungssequenz (Aminosäuren 523 bis 559) wurde mit den *Primern* GPI5 und GPI3 amplifiziert, ebenfalls mit dem Plasmid pBQ1R14 als Matrize. Dabei wurden die *Primer* GmG3 und GPI5 so ausgewählt, dass die in pBQ1R14 vorhandenen Mutationen der Gas1p-GPI-Ankersequenz zum Wildtyp revertiert wurden. Die drei Fragmente wurden nach dem Schema in Abb. 5 (2.8.2) zusammengefügt und über die Schnittstellen *SacI* und *SphI* in das Plasmid pYES2 ligiert.

2.8.6.2. PrP mit cytosolischer Lokalisation: pY-cyto-PrP

Um das Maus-PrP in das Cytosol zu dirigieren, wurden sämtliche Signalsequenzen deletiert. Der Promoter von Gas1p wurde mit den *Primern* G-SS5 und cPrP3 mit dem Plasmid pBQ1R14 als Matrize amplifiziert. Das PrP-kodierende Fragment (Aminosäuren 23 bis 231) wurde mit den *Primern* cPrP5 und GM3 mit dem Plasmid pcDNA3.1-3F4 als Matrize amplifiziert. Die Fragmente wurden verknüpft und über die Schnittstellen *SacI* und *SphI* in das Plasmid pYES2 ligiert.

2.8.6.3. PrP mit erweiterter Hefe-Sequenz: pY-fl-PrP

Bei diesem Konstrukt wurden die Aminosäuren 23-27 des PrP gegen die Aminosäuren 23-26 des Hefe-Proteins Gas1p ausgetauscht. Der Promoter und die Signalsequenz wurden in einer ersten Reaktion mit den *Primern* G-SS5 und G-SS+3 mit dem Plasmid pBQ1R14 als Matrize amplifiziert. Die PrP- und GPI-Anker-Sequenzen wurden mit den *Primern* GmG+5 und GPI3 mit dem Plasmid pY-GmG als

Matrize amplifiziert. Die Fragmente wurden verknüpft und über die Schnittstellen *SacI* und *SphI* in das Plasmid pYES2 ligiert.

2.8.6.4. PrP mit erweiterter Hefe-Sequenz ohne GPI-Anker: pY-PrP Δ GPI

Für das Konstrukt PrP Δ GPI wurde die GPI-Anker-Erkennungssequenz von fl-PrP deletiert. Von der Matrize pY-fl-PrP wurde ein Fragment mit den *Primern* G-SS5 und GM3 amplifiziert und über die Schnittstellen *SacI* und *SphI* in das Plasmid pYES2 ligiert.

2.8.6.5. PrP mit dreifacher A \rightarrow V-Mutation: pY-PrP-AV3

PrP-AV3 kodiert PrP Δ GPI, bei dem die Aminosäuren 112, 114 und 117 von Alanin zu Valin mutiert wurden. Das N-terminale Fragment wurde mit den *Primern* G-SS5 und AV3-3, das C-terminale Fragment mit den *Primern* AV3-5 und GM3 mit dem Plasmid pY-PrP Δ GPI amplifiziert. Beide Fragmente wurden verknüpft und über die Schnittstellen *SacI* und *SphI* in das Plasmid pYES2 ligiert.

2.8.6.6. PrP mit dreifacher A \rightarrow V-Mutation und CD4-Anker: pY-PrP-AV3-CD4

Um den C-terminalen Membrananker des T-Zell-Oberflächenproteins CD4 der Maus mit PrP-AV3 zu fusionieren, wurde der CD4-Anker (Aminosäuren 395 bis 457) mit den *Primern* CD4-5 und CD4-3 mit dem Plasmid pcDNA3.1-CD4 als Matrize amplifiziert. PrP-AV3 wurde mit den *Primern* G-SS5 und P-CD4-3 mit dem Plasmid pY-PrP-AV3 als Matrize amplifiziert. Die beiden Fragmente wurden verknüpft und über die Schnittstellen *SacI* und *SphI* in das Plasmid pYES2 ligiert.

2.8.6.7. PrP mit deletierter Transmembrandomäne: pY-PrP Δ TM

Bei PrP Δ TM sind das Stop Transfer Element (STE) und die potenzielle Transmembrandomäne deletiert (Aminosäuren 103 bis 133). Ausgehend vom Plasmid pY-PrP Δ GPI wurden das N-terminale Fragment mit den *Primern* G-SS5 und TM3

und das C-terminale Fragment mit den *Primern* TM5 und GM3 amplifiziert. Die Fragmente wurden verknüpft und über die Schnittstellen *SacI* und *SphI* in das Plasmid pYES2 ligiert.

2.8.6.8. C-terminal verkürzte PrP-Konstrukte: pY-PrP Δ 117-231 und pY-PrP Δ 134-231

Ausgehend vom Plasmid pY-PrP Δ GPI als Matrize wurden C-terminal verkürzte Konstrukte hergestellt, die alle die erweiterte Gas1p-Signalsequenz (Aminosäuren 1-26) enthalten. Als 5'-*Primer* fungierte in allen Fällen G-SS5. Alle Konstrukte wurden über die Schnittstellen *SacI* und *SphI* in das Plasmid pYES2 ligiert.

pY-PrP Δ 117-231

Dieses Konstrukt kodiert PrP von den Aminosäuren 28 bis 116 und wurde mit dem *Primer* P116-3 amplifiziert.

pY-PrP Δ 134-231

Dieses Konstrukt kodiert PrP von den Aminosäuren 28 bis 133 und wurde mit dem *Primer* P133-3 amplifiziert.

2.8.6.9. C-terminal verkürztes PrP-Konstrukt mit dreifacher A \rightarrow V-Mutation: pY-PrP-AV3 Δ 134-231

PrP-AV3 Δ 134-231 entspricht dem PrP-AV3 bis zur Aminosäure 133 und wurde mit den *Primern* G-SS5 und P133-3 mit pY-PrP-AV3 als Matrize amplifiziert und in das Plasmid pYES2 ligiert.

2.8.6.10. N-terminal verkürzte PrP-Konstrukte: pY-PrP Δ 28-89, pY-PrP Δ 28-140, pY-PrP Δ 28-156 und pY-PrP Δ 28-165

Alle N-terminal verkürzten PrP-Konstrukte wurden mit der erweiterten ER-Signalsequenz des Gas1p (Aminosäuren 1-26) fusioniert. Als Matrize fungierte in allen Fällen das Plasmid pY-PrP Δ GPI. Die Fragmente wurden jeweils nach 2.8.2 verknüpft und über die Schnittstellen *SacI* und *SphI* in das Plasmid pYES2 ligiert.

pY-PrP Δ 28-89

Bei diesem Konstrukt wurde der N-terminale Bereich von Aminosäure 28 bis 89 deletiert. Promoter und Signalsequenz wurden mit den *Primern* G-SS5 und P90-231-3 amplifiziert. Die PrP-Sequenzen wurden mit den *Primern* P90-231-5 und GM3 amplifiziert.

pY-PrP Δ 28-140

Bei diesem Konstrukt wurden N-terminale Bereich sowie das erste β -Faltblatt bis zur Aminosäure 140 deletiert. Promoter und Signalsequenz wurden mit den *Primern* G-SS5 und P141-231-3 amplifiziert. Die PrP-Sequenzen wurden mit den *Primern* P141-231-5 und GM3 amplifiziert.

pY-PrP Δ 28-156

Bei diesem Konstrukt wurden N-terminale Bereich sowie das erste β -Faltblatt und die erste α -Helix bis zur Aminosäure 156 deletiert. Promoter und Signalsequenz wurden mit den *Primern* G-SS5 und P157-231-3 amplifiziert. Die PrP-Sequenzen wurden mit den *Primern* P157-231-5 und GM3 amplifiziert.

pY-PrP Δ 28-165

Bei diesem Konstrukt wurden N-terminale Bereich sowie die beiden β -Faltblätter und die erste α -Helix bis zur Aminosäure 165 deletiert. Promoter und Signalsequenz wurden mit den *Primern* G-SS5 und P166-231-3 amplifiziert. Die PrP-Sequenzen wurden mit den *Primern* P166-231-5 und GM3 amplifiziert.

2.8.7. Prion Protein-Konstrukt unter Kontrolle des TET-Operators:**pTET-PrP Δ GPI**

Der kodierende Bereich des Plasmids pTET-PrP Δ GPI entspricht pY-PrP Δ GPI. Es wurde mit den *Primern* tPrP5 und tPrP3 mit dem Plasmid pY-PrP Δ GPI als Matrize amplifiziert. Das Fragment wurde über die Schnittstellen *Bam*HI und *Not*I in dieselben Schnittstellen des Plasmids pTET423 ligiert.

2.8.8. Prion Protein-Konstrukte unter Kontrolle des CMV-Promoters

Zur Expression in N2a-Zellen wurden PrP-Fragmente in den Vektor pcDNA3.1-ZEO+ ligiert. Durch die Wirkung des CMV-Promoters erfolgt eine konstitutive Expression.

pcDNA-mPrP Δ 115-231

Dieses Plasmid kodiert PrP bis zur Aminosäure 114. Der PrP-Leserahmen wurde mit den *Primern* pcPrP5 und pcPrP-114-3 amplifiziert und über die Schnittstellen *HindIII* und *KasI* in den Vektor ligiert.

pcDNA-mPrP Δ 134-231

Dieses Plasmid kodiert PrP bis zur Aminosäure 133. Der PrP-Leserahmen wurde mit den *Primern* pcPrP5 und pcPrP-133-3 amplifiziert und über die Schnittstellen *HindIII* und *KasI* in den Vektor ligiert.

pcDNA-mPrP Δ 146-231

Dieses Plasmid kodiert PrP bis zur Aminosäure 145. Der PrP-Leserahmen wurde mit den *Primern* pcPrP5 und pcPrP-145-3 amplifiziert und über die Schnittstellen *HindIII* und *KasI* in den Vektor ligiert.

2.8.9. Andere Plasmide

2.8.9.1. Grünes Fluoreszierendes Protein mit ER-Lokalisation: pY-GFP

Das GFP kodierende Fragment (Aminosäuren 2 bis 241) wurde mit den *Primern* GFP5 und GFP3 mit dem Plasmid pEGFP-C1 als Matrize amplifiziert. Aus dem Plasmid pY-PrP Δ GPI wurde über die Schnittstellen *AatII* und *SphI* der PrP-kodierende Bereich ausgeschnitten und der GFP-kodierende Bereich eingefügt, sodass GFP über die erweiterte Signalsequenz des Gas1p in das ER dirigiert wird. Die *AatII*-Schnittstelle liegt in den Codons 24 und 25 des GAS1-Gens.

2.8.9.2. Fusionsprotein von PrP-N-Terminus und GFP: pY-PrP Δ 117-231-GFP

Um den PrP-N-Terminus mit GFP zu fusionieren wurden die Aminosäuren 28 bis 116 des PrP mit den *Primern* NPrP-GFP5 und NPrP-GFP-3 und dem Plasmid pcDNA3.1-3F4 als Matrize amplifiziert. Über die an 5'- und 3'-Ende eingefügten *AatII*-Schnittstellen wurde dieses Fragment in die *AatII*-Schnittstelle des Plasmids pY-GFP ligiert.

2.8.9.3. Fragment des ER-Chaperons KAR2: pBS-KAR2

Das KAR2-Gen wurde mit den *Primern* KAR2-5 und KAR2-3 aus Hefe-Gesamt-DNA amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit den Enzymen *HindIII* und *XbaI* verdaut und in dieselben Schnittstellen des Plasmids pBluescript ligiert. Dieses C-terminale Fragment ist zirka 880 bp groß.

2.9. Hefetransformation

Hefezellen wurden nach einer modifizierten Lithiumacetat-Methode transformiert (Schiestl und Gietz, 1989; Knop *et al.*, 1999).

2.9.1. Herstellung kompetenter Hefe-Zellen

Hefezellen wurden von einer frischen Vorkultur angeimpft und bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,5 bis 0,7 gezogen. Die Zellen wurden geerntet, einmal mit 0,5 Volumen sterilem Wasser und einmal mit 0,2 Volumen SORB (100 mM LiOAc, 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 1 M Sorbitol, pH=8) bei Raumtemperatur gewaschen. Die Zellen wurden in 360 μ l SORB pro 50 ml Ausgangskultur aufgenommen, mit 40 μ l Heringsspermien-DNA (10 mg/ml) versetzt, á 50 μ l aliquotiert und bei -80°C gelagert (keine Schockgefrierung).

2.9.2. Transformieren der Zellen

10 µl kompetente Hefezellen wurden mit 0,2 bis 0,5 µg Plasmid-DNA versetzt (maximal 2 µl) und mit 6 Volumen PEG-Lösung (100 mM LiOAc, 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 40% PEG3350, pH=8) gut vermischt. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur folgte ein Hitzeschock für 15 min bei 42°C. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in 50 µl Wasser aufgenommen und auf selektive Platten ausgebracht.

2.10. Vergleich von Wachstumsraten

Das Wachstum der Hefezellen wurde in Flüssigkultur und auf festen Medien untersucht.

2.10.1. Wachstumskurven

Hefekulturen wurden frisch angeimpft, über Nacht hochgezogen und auf eine OD=0,05 verdünnt. In regelmäßigen Abständen wurden Proben entnommen, die OD gemessen und gegen die Zeit aufgetragen.

2.10.2. Tropfenassay

Übernachtskulturen wurden auf eine OD=1 verdünnt. Davon wurde eine serielle Verdünnung von 5 mal 1:5 angefertigt und auf Platten aufgetropft. Das Wachstum der Zellen bei 30°C wurde nach 2 Tagen dokumentiert.

2.11. Isolation von Gesamtprotein aus Mauszellen

Von einer konfluenten Schale mit Mauszellen wurde das Medium abgesaugt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit PBS abgeschabt, in ein Reaktionsgefäß überführt und 2 min bei 1000 g abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 500 µl Laemmli-Probenpuffer (Laemmli, 1970) aufgenommen. Die genomische DNA wurde durch mehrmaliges Aufziehen der Probe in eine 1 ml-Einwegspritze mit einer 26G-Kanüle geschert. 50 µl des Lysates wurden auf einem SDS-Gel analysiert.

2.12. Isolation von Gesamtprotein aus Hefe

Zu Kontrollzwecken wurde Gesamtprotein aus Hefe isoliert (Yaffe und Schatz, 1984). Ein bis zwei OD-Einheiten (zirka 1 bis 2 ml) einer über Nacht gewachsenen Hefekultur wurden abzentrifugiert, in 1 ml Wasser resuspendiert und mit 150 µl Lysierlösung (1,85 M NaOH, 1M β-Mercaptoethanol) aufgeschlossen. Die Proteine wurden mit 150 µl 50% TCA gefällt und zwei mal mit eiskaltem Aceton gewaschen. Der Niederschlag wurde getrocknet, in 200 µl Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und 5 min gekocht. 20 bis 40 µl der Probe wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblot aufgetrennt und analysiert.

2.13. Zellaufschluss mit Glasperlen

Der Zellaufschluss mittels Glasperlen erfolgte mit je nach Anwendung unterschiedlichen Lysiermedien. Standardmäßig wurde Phosphatpuffer (Dulbecco's PBS mit 0,5% Hefeprotease-Inhibitor-Cocktail) benutzt.

50 bis 100 OD-Einheiten wurden abzentrifugiert und erst mit sterilem eiskaltem Wasser, dann zweimal mit Lysispuffer gewaschen. Die Zellen wurden in Lysispuffer aufgenommen, mit 0,2 bis 0,4 g Glasperlen vermengt und 3 mal eine min auf der höchsten Stufe im Zellzerstörer aufgeschlossen. Der Gefäßhalter wurde dabei jeweils mit frischem Eis befüllt. Das Zelllysat wurde mit einer Pipette abgesaugt und in ein frisches Gefäß überführt. Durch eine kurze Zentrifugation (5 min, 1000 g, 4°C) wurden intakte Zellen, Zellkerne und -trümmer entfernt. Zur Lagerung wurde das Lysat in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C aufbewahrt.

2.14. Quantifizierung von Proteinen

Der Proteingehalt der Proben wurde nach der Bradford-Methode ermittelt (Bradford, 1976). 5 µl der Probe wurden 30 min bei 37°C mit 745 µl Bradford-Reagenz (0,01% Coomassie Brilliant Blue G-250, 5% Ethanol, 8,5% Phosphorsäure) inkubiert und die Extinktion bei 595 nm gegen eine Leerprobe ermittelt. Parallel wurden BSA-

Standards mit einer Konzentration von 0,25; 0,5; 1; 2,5 und 5 mg/ml gemessen und eine Eichkurve erstellt.

2.15. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden durch eindimensionale, diskontinuierliche SDS-PAGE aufgetrennt (Laemmli, 1970). Je nach der Größe des interessierenden Proteins wurde eine Polyacrylamid-Konzentration von 8%, 10%, 12% oder 15% für das Trenngel und 4% für das Sammelgel verwendet. Das Verhältnis des Quervernetzers Bisacrylamid zu Polyacrylamid betrug in 8%-, 10%- und 12%-Gelen 1:19, in 15%-Gelen 1:29. Die Elektrophorese wurde mit 150-250 V in einer Hoefer-SE600-Kammer durchgeführt.

2.16. Proteintransfer auf Nitrozellulose (*Western blot*)

Proteine wurden zum Zwecke der Immundetektion (siehe unten) mit Transferpuffer (20 mM Tris, 150 mM Glycin, 0,01% SDS, 20% Methanol) auf Nitrozellulose-Membranen der Porengröße 0,45 µm transferiert (Towbin *et al.*, 1979). Der Transfer erfolgte für 2 h bei einer festen Stromstärke von 1 A bei 4°C.

2.17. Immundetektion von Proteinen

Die Immundetektion wurde mit dem *Enhanced Chemiluminescence* (ECL)-System nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Membranen wurden eine Stunde in PBST (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 0,1% Tween-20) mit 5% Milchpulver bei Raumtemperatur blockiert und über Nacht bei 4°C mit den angegebenen Endkonzentrationen der primären Antikörper bzw. Antiseren inkubiert (2.3). Die Membranen wurden drei mal 10 min mit PBST gewaschen und 40 min mit dem sekundären Antikörper (Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelte Schaf-Anti-Maus oder Esel-Anti-Kaninchen, 1:5000 Verdünnung in PBST) inkubiert. Die Membranen wurden drei mal 10 min gewaschen und 1 min mit ECL inkubiert. Die Visualisierung der Signale erfolgte durch Exposition eines Röntgenfilms.

2.18. Nachweis der Löslichkeit

Um die Löslichkeit der Proteine zu analysieren, wurde Zelllysat auf eine Endkonzentration von je 1% Triton X-100 und Desoxycholat (TDOC) eingestellt und 30 min bei 20.000 g, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einem Volumen 2x Laemmli-Puffer versetzt. Der Niederschlag wurde in zwei Volumen 2x Laemmli-Puffer aufgenommen. Beide Proben wurden 5 min gekocht und in einem SDS-Gel aufgetrennt.

2.19. Nachweis der Glykosylierung

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

2.20. Nachweis der Protease-Resistenz

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

2.21. Nachweis der intrazellulären Lokalisation

Die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen wurde mit einer modifizierten Renografin-Dichtegradientenzentrifugation untersucht (Schandel und Jenness, 1994; Wang und Chang, 1999). 50 OD-Einheiten Hefezellen wurden 3 mal in Sorbitolpuffer (0,8 M Sorbitol, 50 mM Tris, 10 mM NaF, pH=7,6) und in TEH (TE, 50 mM Tris, 1

mM EDTA mit 0,5% Hefeprotease-Inhibitor-Cocktail, pH=7,6) gewaschen. Die Zellen wurden in 1 ml TEH resuspendiert und wie unter 2.13 lysiert. 500 µl des Lysates wurden mit 500 µl Renografin 76 (66% Meglumin-Diatrizoat, 10% Na-Diatrizoat, in TE, pH=7,6) vermischt und in einem Zentrifugenröhrchen platziert. Die Probe wurde sodann mit jeweils 1 ml 34%, 30%, 26% und 22% Renografin (Verdünnungen von Renografin 76 mit TE) überschichtet und 20 h mit 150.000 g, 4°C zentrifugiert. Von den Gradienten wurden 14 Fraktionen á 350 µl von oben entnommen. Je 100 µl der Fraktionen wurden 1:10 mit TE verdünnt und 1h mit 100.000 g, 4°C zentrifugiert. Die Niederschläge wurden in 100 µl Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und auf einem SDS-Gel analysiert.

2.22. Präparation von ER-Membranen (Mikrosomen)

Mikrosomen wurden durch einen Stufen-Gradienten gereinigt (Wuestehube und Schekman, 1992). Hefezellen wurden wie unter 2.13 mit Lysispuffer (0,1 M Sorbitol, 20 mM HEPES, pH=7,4, 50 mM K₂OAc, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) aufgeschlossen. 500 µl Lysat wurden auf einen Stufengradienten (je 1 ml 1,5 M und 1,2 M Sucrose in Lysispuffer) geladen und 1 h bei 100.000 g, 4°C zentrifugiert. Die Mikrosomen wurden von der 1,2M/1,5M-Phasengrenze gesammelt, mit einem Volumen Reaktionspuffer (20 mM HEPES, pH=7,4, 150 mM K₂OAc, 5 mM MgOAc, 250 mM Sorbitol) verdünnt und 10 min bei 27.000 g, 4°C abzentrifugiert. Die Mikrosomen wurden in 250 µl Reaktionspuffer aufgenommen und sofort weiter verarbeitet.

2.23. Nachweis der Proteintopologie mittels PK-Verdau

Die unter 2.22 gewonnenen Mikrosomen wurden einem PK-Verdau ausgesetzt, um die durch die Membranen geschützten Proteinbestandteile zu identifizieren. Dazu wurden die Proben auf eine Endkonzentration von 10 mg/ml PK gebracht und 30 min auf Eis inkubiert. Als Negativ-Kontrolle wurde 1% Triton X-100 zugefügt, um die

schützenden Membranen zu zerstören. Die Proben wurden mit Laemmli-Probenpuffer versetzt und auf einem SDS-Gel analysiert.

2.24. Alkalische Extraktion der Mikrosomen

Mikrosomen (2.22) wurden einer alkalischen Extraktion (Fujiki *et al.*, 1982) unterzogen, um lösliche und membranassoziierte Proteine von integralen Membranproteinen zu trennen. Dazu wurden 250 μ l Mikrosomen mit 10 ml 0,1 M Na_2CO_3 (pH=11,5) gemischt und 30 min auf Eis gelagert. Nach einer Zentrifugation (1 h, 100.000g, 4°C) wurde der Niederschlag (integrale Proteine) in 100 μ l Laemmli-Probenpuffer aufgenommen. Der Überstand (lösliche und membranassoziierte Proteine) wurde mit einer Endkonzentration von 5% TCA gefällt, einmal mit eiskaltem Aceton gewaschen und ebenfalls in 100 μ l Laemmli-Probenpuffer aufgenommen.

2.25. *In vivo*-Markierung von Hefe-Proteinen (*pulse/chase*)

Um Synthese und Abbau von Proteinen innerhalb eines kurzen Zeitraumes zu verfolgen, wurden *pulse/chase*-Experimente durchgeführt. Dazu wurden Hefekulturen über Nacht auf eine OD von 0,5 bis 1 in Medium mit 1 mM Methionin und 0,2 mM Cystein angezogen, um die Eigensynthese dieser Aminosäuren zu unterbinden. Die Zellen wurden mit Medium gewaschen und 30 min wachsen gelassen, um restliches Methionin und Cystein aufzubreuchen, zentrifugiert und in Medium mit 200 μ Ci/ml Promix (^{35}S -Methionin/Cystein) aufgenommen. Nach 15 min wurde ein Überschuß an unmarkiertem Methionin/Cystein (Endkonzentration je 1 mM) zugefügt und sofort die erste Probe entnommen, abzentrifugiert und mit Wasser gewaschen (*pulse*). Nach weiteren 30 bzw. 90 min wurden nochmals Proben entnommen und wie oben behandelt (*chase*). Bis zur Entnahme der letzten Probe wurden die anderen Proben in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die Zellen wurden ein mal mit PBS und ein mal mit IP-Puffer (PBS, 0,5% Sarkosyl, 0,5% Hefeprotease-Inhibitor-Cocktail) gewaschen.

Die Zellen wurden in IP-Puffer aufgenommen und wie unter 2.13 beschrieben lysiert. Es folgte eine Immunpräzipitation (2.27).

2.26. *pulse/chase* von Maus-Proteinen

2.26.1. Transfektion

Eine konfluent bewachsene Flasche mit N2a-Zellen wurde mit PBS gewaschen und mit 500 µl Trypsin-Lösung behandelt, bis sich die Zellen vom Boden lösten. Die Zellen wurden in N2a-Medium (MEM, 10% FCS, 1x PenStrep) aufgenommen und in einer Neubauer-Kammer gezählt. 10^6 Zellen wurden auf einer Schale von 3,5 cm Durchmesser ausplattiert. Nach einem Tag wurden die Zellen zweimal mit MEM gewaschen und mit 1 µg Plasmid-DNA mit dem Transfektions-Kit Lipofectamine plus nach Angaben des Herstellers transfiziert.

2.26.2. Markierung

Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 30 min in Markierungsmedium (MEM -Methionin, 1x PenStrep) inkubiert, um vorhandenes Methionin (Met) aufzubrechen. Das Medium wurde abgenommen und durch 500 µl frisches Markierungsmedium mit [³⁵S]-Met (ProMix, 300 µCi/ml) ersetzt. Nach 30 min Markierung wurden die Zellen zweimal mit MEM gewaschen. Die zur Bestimmung der während der *pulse*-Phase synthetisierten Proteine vorgesehene Schale wurde in Lysispuffer (PBS, 0,5% Triton X-100, 0,5% DOC, Complete Protease-Inhibitor) geerntet (*pulse*). Die anderen Schalen wurden eine weitere Stunde mit MEM inkubiert und dann wie oben lysiert (*chase*). Die Proben wurden auf eine Endkonzentration von 0,5% Sarkosyl gebracht. Es folgte eine Immunpräzipitation (2.27).

2.27. Immunpräzipitation (IP)

Die Zellysate wurden bei 20.000 g, 4°C für 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Gefäß überführt. Es wurden 2 µl Antikörper/Antiserum zugefügt und über Nacht bei 4°C in einem Überkopf-Dreher inkubiert.

Um die Protein/Antikörper-Komplexe zu isolieren, wurden 30 µl einer vier mal in IP-Puffer gewaschenen Mischung aus ProteinA-Trisacryl-Matrix und ProteinG-Sepharose-Matrix (1:1, vol/vol) zugefügt und die Inkubation bei 4°C für weitere 90 min in einem Überkopf-Dreher fortgesetzt. Die Komplexe wurden dann bei 20.000 g für 20 sec abzentrifugiert, vier mal mit IP-Puffer gewaschen und in 50 µl Laemmli-Probenpuffer 5 min gekocht. Je 30 µl der Probe wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen.

2.28. Autoradiogramme

Gele mit radioaktiv markierten Proteinen wurden 30 min fixiert (40% Methanol, 7% Essigsäure) und 30 min mit Amplify inkubiert. Auf einem Whatman-Papier wurden sie dann in einem Gelrockner für 2 h bei 50°C unter Vakuum getrocknet. Die markierten Proteine wurden durch Exposition eines Röntgenfilms oder mittels Phosphoimaging (siehe unten) visualisiert.

2.29. Phosphoimaging

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

2.30. RNA-Nachweis (*Northern blot*)

Je Probe wurden 10 µg Gesamt-RNA in einem Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylon-Membran (Hybond N+) übertragen und mit UV-Licht fixiert. Die Membran wurde für mindestens 2 h bei 45°C in Hybridisierungspuffer (5x SSC, 10x Denhardt, 50% Formamid, 1% SDS, 1% BSA, 600 µg/ml Lachsspermien-DNA) prähybridisiert und über Nacht bei 45°C in Hybridisierungspuffer mit der Sonde hybridisiert. Die Sonde wurde nach den Angaben des Herstellers mit 50 ng DNA und 50 µCi [α -³²P]dCTP mit dem Oligolabelling-Kit (Amersham) hergestellt. Die Membran wurde dann 3 mal 15 min bei 45°C in Waschpuffer I (2x SSC, 1% SDS, 50% Formamid) und 3 mal 10 min bei 60°C in Waschpuffer II (0,2x SSC, 1% SDS) gewaschen. Die Membran wurde auf ein Whatman-Papier gelegt, in Frischhaltefolie gewickelt und die Signale wurden mittels Autoradiografie visualisiert. 20x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat; 100x Denhardt: 2% Ficoll 400, 2% BSA, 2% Polyvinylpyrrolidon.

3. Ergebnisse

Das Prion Protein (PrP) ist in murinen Neuroblastomzellen (N2a-Zellen) zum größten Teil stark glykosyliert. Spur 1 in Abb. 7 zeigt zelluläres PrP^C aus dem Lysat von N2a-Zellen, wobei die starke, diffuse Bande komplex glykosyliertem PrP und die schwächere Bande bei 23 kDa unglykosyliertem PrP entspricht.

3.1. Expression des Prion Proteins in *S. cerevisiae*

Um das Prion Protein in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zu untersuchen, wurde das Gen PRNP in das *multi copy*-Plasmid pYES2 ligiert (mPrP, Abb. 6), das eine Überexpression mittels GAL1-Promoter erlaubt.

Im *S. cerevisiae*-Wildtypstamm HU1 wurde die Expression von mPrP durch Wachstum der Zellen in Medium mit 2% Galaktose (SCGal) induziert. Von den Zellen wurde Gesamtprotein isoliert und auf einem SDS-Gel aufgetrennt. PrP wurde durch einen Immunoblot mit dem Antiserum RO73 nachgewiesen. Der Proteinnachweis liefert eine schwache Bande von 29 kDa. Dies entspricht der von der DNA-Sequenz abgeleiteten Größe des vollständigen, unprozessierten mPrP. Wird die 22 Aminosäuren lange ER-Signalsequenz prozessiert, so verringert sich die errechnete Größe des Proteins um 2 kDa. Eine sehr schwache Bande von ca. 27 kDa könnte mPrP mit prozessierter ER-Signalsequenz sein (Abb. 7, Spur 2).

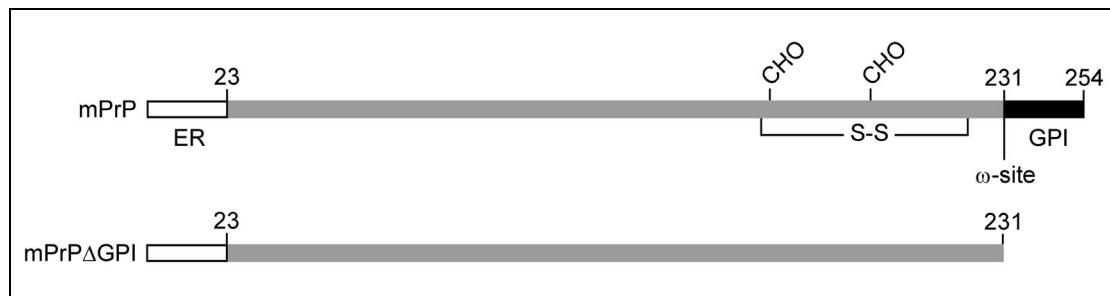


Abbildung 6. Schematische Darstellung der in der Hefe exprimierten Prion Protein Konstrukte der Maus. Das komplette Wildtyp-PrP (mPrP) enthält die 22 Aminosäuren lange ER-Signalsequenz (ER, weiß) sowie die 23 Aminosäuren lange GPI-Ankersequenz (GPI, schwarz). Letztere wird bei der Anheftung des GPI-Ankers an die ω -site abgespalten. Das Konstrukt mPrP Δ GPI ist bis auf die fehlende GPI-Ankersequenz mit mPrP identisch. CHO: Glykosylierungsstellen; S-S: Disulfidbrücke.

Um zu überprüfen, ob ein GPI-Anker an mPrP angeheftet wird, wurde ein Konstrukt mit deletierter GPI-Ankersequenz erstellt (mPrP Δ GPI, Abb. 6). Da die GPI-Ankersequenz von mPrP bei erfolgter GPI-Anheftung abgespalten wird, sollte es in diesem Fall im SDS-Gel auf derselben Höhe laufen wie mPrP Δ GPI. Wie Spur 3 in Abb. 7 zeigt, war mPrP Δ GPI kleiner als mPrP. Dies bedeutet, dass die GPI-Ankersequenz von mPrP in der Hefe nicht prozessiert wurde.

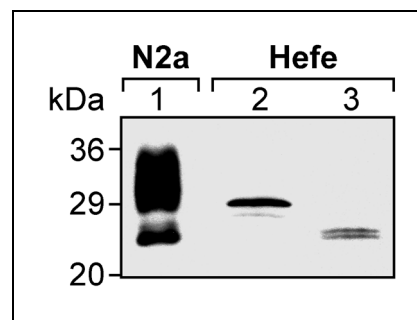


Abbildung 7. Die Expression von mPrP in der Hefe. Endogenes PrP aus Neuroblastomzellen der Maus (N2a, Spur 1) zeigt die für eine komplexe Glykosylierung von mPrP typische diffuse Bande von 29-36 kDa. Die Bande bei 23 kDa entspricht dem unglykosylierten mPrP mit prozessierten Signalsequenzen. In der Hefe exprimiertes mPrP wird kaum prozessiert; Die starke Bande entspricht dem vollständigen Protein, während die sehr schwache kleinere Bande ins ER importiertes und prozessiertes mPrP darstellt (Hefe, Spur 2). Der Vergleich mit mPrP Δ GPI zeigt, dass bei mPrP in der Hefe auch der GPI-Anker nicht angehängt wurde (Hefe, Spur 3). Gleiche Proteinnengen von N2a-Zellen und Hefe-Kulturen wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und PrP wurde mittels Immunoblot mit dem Antiserum RO73 visualisiert.

3.2. Modifikation des PrP-Gens

Die schwache Expression des mPrP und die sehr schwache Prozessierung der Signalsequenzen legen die Vermutung nahe, dass diese in der Hefe nicht funktional sind. Aus diesem Grund wurde ein Konstrukt erstellt, bei dem sowohl die ER-Signalsequenz als auch die GPI-Ankersequenz gegen die des Hefeproteins Gas1p ausgetauscht wurde. Gas1p ist ein 125 kDa großes, GPI-verankertes Glykoprotein der Zelloberfläche. Das Fusionsprotein GmG (**Gas1-mPrP-Gas1**) besteht aus den 22 Aminosäuren der Gas1p-ER-Signalsequenz, den Aminosäuren 23 bis 227 des PrP und den 37 C-terminalen Aminosäuren des Gas1p (Abb. 8). Die 31 letzten Aminosäuren des Gas1p entsprechen der GPI-Ankersequenz, die 6 davor liegenden Aminosäuren

entstammen der Serin-reichen Region, dem dibasischen Motiv und der GPI-Anheftungsstelle (ω -site). Das direkt vor der ω -site gelegene dibasische Motiv sorgt in der Hefe für eine Lokalisation des Proteins in der Plasmamembran. GPI-verankerte Proteine ohne dieses Motiv werden oft in die Zellwand integriert (Nuoffer *et al.*, 1991). Bei der Klonierung wurde außerdem der konstitutive Promoter des GAS1-Gens eingefügt.

Die Expression des Fusionsproteins GmG zeigte keinerlei Unterschiede zur Expression von mPrP in Hefe (nicht dargestellt).

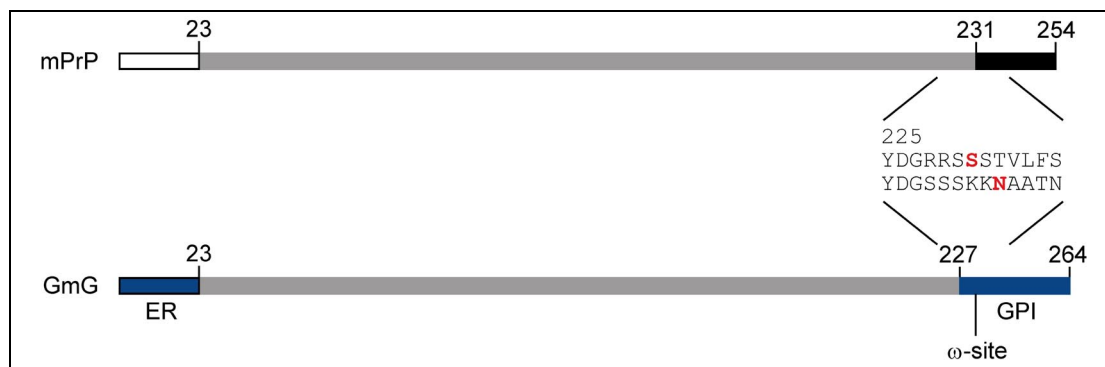


Abbildung 8. Schematische Darstellung des PrP-Konstruktes mit Signalsequenzen des Hefeproteins Gas1p. Die Signalsequenzen von mPrP (weiße und schwarze Box) wurden gegen die ebenfalls 22 Aminosäuren lange ER-Signalsequenz (ER) sowie die 37 C-terminalen Aminosäuren von Gas1p ausgetauscht. Die GPI-Ankersequenz von Gas1p (GPI) enthält vor der ω -site (rot) drei Serine der Serin-reichen Region sowie das dibasische Motiv.

Warum wird PrP in der Hefe trotz endogener Signalsequenzen nicht posttranslational modifiziert?

Ein Vergleich der Sequenz von mPrP mit Sequenzen anderer sekretorischer Hefe- und Maus-Proteine zeigte, dass mPrP hier eine einzigartige Stellung hat: Während bei den meisten anderen Proteinen die ersten fünf Aminosäuren, die der Signalsequenz folgen, keine oder eine negative Ladung zeigen, sind diese bei mPrP stark positiv geladen (Tab. 3).

		Signal-peptidase	Ladung
		↓	
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Pdi1</i>	MKFSAGAVLSWSSLLLASSVFAQQEAVA-----	P EDSA -2
	<i>Ire1</i>	MRLRRNMLVLTLLVCF-----	SSIIS 0
	<i>Mpd1</i>	MLFLNIIKLLGLFIMNEVKA-----	QNFYD -1
	<i>Sed1</i>	MKLSTVLLSAGLASTTTLA-----	QFSNS 0
	<i>Lhs1</i>	MRNVLRLFLTAFAIGSLA-----	AVLGV 0
	<i>Cyp5</i>	MKLQFFSFITLFACLFTTAIFA-----	K EDTA -1
	<i>Wbp1</i>	MRTDWNFFFCILLQAI FVVG-----	TQTSR +1
	<i>Emp24</i>	MASFATKFVIACFLFFSASA-----	H NVLL +1
	<i>Fkb2</i>	MMFNIIYLFVTFSTILA-----	GSLSD -1
	<i>Eug1</i>	MQVTTRFISAIVSFCLFASFTLAENSARA-----	TPGSD -1
	<i>Kre5</i>	MRLALVLLLLCAPLRA-----	WTYSL 0
	<i>Kar2</i>	MFFNRLSAGKLLVPLSVVLYALFVVILPLQNSFHSSNVLVRG	A DDVE -3
<i>Mus musculus</i>	<i>Pdi</i>	MLSRALLCLALAWAARVGA-----	D ALEE -3
	<i>Grp78</i>	MMKFTVVAALLLLGAVRA-----	E EEDK -3
	<i>Pda3</i>	MRFSCLALLPGVALLLASARLAAA-----	SDVLE -2
	<i>Grp94</i>	MRVLWVGLCCVLLTFGFVRA-----	D DEVD -4
	<i>Crtc</i>	MLLSVPLLLGLLGLAAA-----	DPAIY -1
	<i>Cb45</i>	MVWLVAMTPRQSSLCGLAAHGLWFLGLVLLMDATA-----	R PANH +2
	<i>Es22</i>	MCLSALILVSLAAFTAGAG-----	H PSSP +1
	<i>Estm</i>	MACLLLI FPTTVIG-----	P KVTQ +1
	<i>Vegf</i>	MNFLSWVHWTLALLLYLHHAKWSQA-----	APTTE -1
	<i>Retb</i>	MEVWVALVLLAALGGGSA-----	E RDCR -1
	<i>Fkb2</i>	MRLSWILTILSICLSALAAATG-----	A EGRK +1
	<i>Pltp</i>	MVLLWALFLALLAGAHA-----	E LPGC -1
	<i>Prnp</i>	MANLGYWLLALFVTMWTDVGLC-----	K KRPK +4

Tabelle 3. Vergleich der ER-Signalsequenzen und der 5 N-terminalen Aminosäuren reifer Proteine. Je 12 Proteine mit abschneidbarer ER-Signalsequenz von *S. cerevisiae* und *M. musculus* wurden auf die Ladung des unmittelbar auf die Schnittstelle folgenden Bereichs hin untersucht. Die durchschnittliche Nettoladung dieser Bereiche ist -0,75, während die Ladung dieser Region bei PrP +4 beträgt. Fett: saure Aminosäuren, rot: basische Aminosäuren

Um einen Einfluss dieser unterschiedlichen Ladungen zu untersuchen, wurde ein PrP-Konstrukt hergestellt, bei dem außer der ER-Signalsequenz und der GPI-Ankersequenz auch die ersten 5 Aminosäuren des prozessierten PrP durch Aminosäuren des reifen Gas1p ersetzt wurden (Abb. 9, *full-length(fl)*-PrP). Alle nachfolgenden Konstrukte außer cyto-PrP enthielten diese erweiterte ER-Signalsequenz (ER+) des Gas1p. Um auch hier die Prozessierung der Signalsequenzen zu verfolgen, wurden das Prion Protein mit deletierter GPI-Ankersequenz (Abb. 9, PrPAGPI) sowie ein PrP ganz ohne Signalsequenzen (Abb. 9, cyto-PrP) hergestellt.

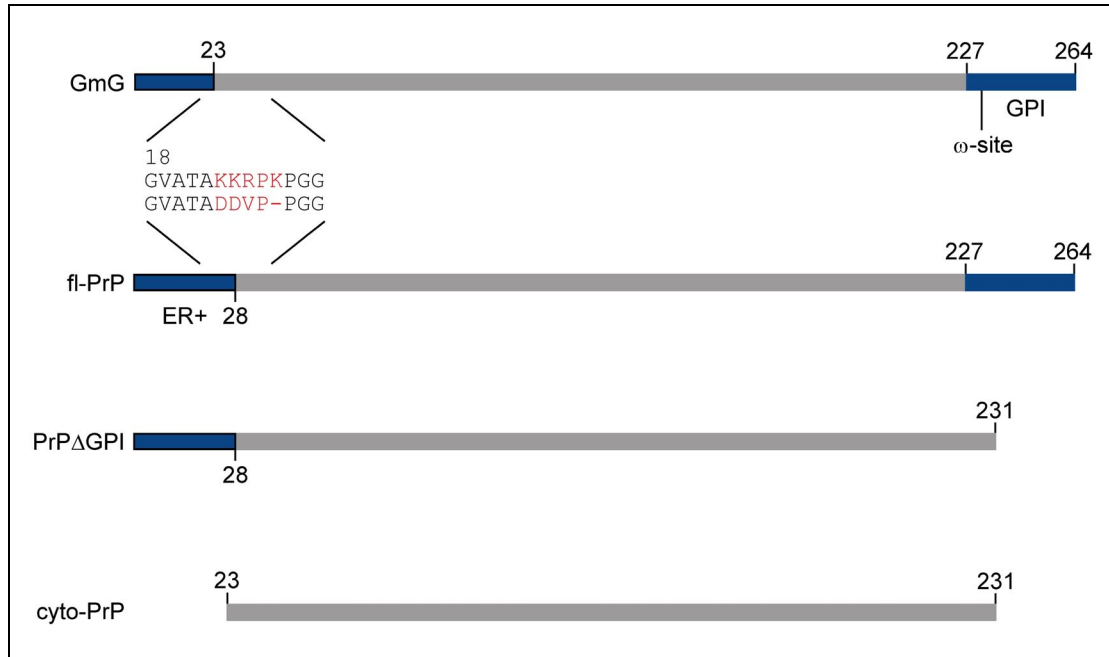


Abbildung 9. Schematische Darstellung der PrP-Konstrukte mit erweiterter ER-Signalsequenz. Für die erweiterte ER-Signalsequenz (ER+) des Konstruktes *full-length*(fl)-PrP wurden neben den Signalsequenzen zusätzlich die Aminosäuren 23 bis 27 des PrP gegen die Aminosäuren 23 bis 26 von Gas1p ausgetauscht (rot). Für PrP Δ GPI wurde die GPI-Ankersequenz deletiert. Zur cytoplasmatischen Lokalisation wurden alle Signalsequenzen deletiert (cyto-PrP). ER+:erweiterte Signalsequenz.

Hefezellen, die fl-PrP, PrP Δ GPI oder cyto-PrP exprimieren, wurden mit Glasperlen in Phosphatpuffer in Gegenwart von Proteaseinhibitoren lysiert. Das Lysat wurde durch eine kurze Zentrifugation von Zelltrümmern und -kernen befreit (siehe Methoden). Zur Bestimmung der Löslichkeit wurde das Lysat auf eine Endkonzentration von je 1% Triton X-100 und Desoxycholat (TDOC) eingestellt und zentrifugiert. Der Status der Glykosylierung wurde durch einen Verdau mit der Endoglykosidase H (EndoH) untersucht. Dieses Enzym aus *Streptomyces plicatus* entfernt Asparagin-gekoppelte Zuckerketten von Proteinen (Robbins *et al.*, 1984; Maley *et al.*, 1989). Die Proben wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und PrP wurde mittels Immunoblot mit dem α -PrP-Antikörper 3F4 nachgewiesen.

Der Proteinnachweis der Zellextrakte zeigte bei PrP Δ GPI drei Banden von 22 bis 24 kDa ausschließlich in der unlöslichen Fraktion (Abb. 10, PrP Δ GPI, S/P). Der EndoH-Verdau änderte die Größe der Proteine nicht, d.h. sie wurden nicht glykosyliert (Abb. 10, PrP Δ GPI, E). Die Analyse von cyto-PrP lieferte zwei Banden, die den beiden

unteren PrP Δ GPI-Banden entsprechen. Dies zeigt, dass die Signalsequenz bei ungefähr zwei Dritteln des PrP Δ GPI prozessiert wurde. Auch cyto-PrP fand sich fast ausschließlich in der unlöslichen Fraktion. Bei der untersten Bande handelt es sich vermutlich um ein Abbauprodukt (Abb. 10, cyto-PrP, S/P).

Der Immunnachweis des fl-PrP zeigte gegenüber PrP Δ GPI zwei weitere Banden. Die beiden oberen Banden traten in einer mit EndoH behandelten Probe nicht auf; es handelt sich also um glykosyliertes fl-PrP. Die Zunahme der Intensität der kleinsten Bande in der mit EndoH behandelten Probe weist darauf hin, dass es sich bei der glykosylierten Spezies um fl-PrP handelt, bei dem auch die GPI-Ankersequenz prozessiert wurde. Insgesamt zeigte fl-PrP eine gegenüber PrP Δ GPI erhöhte Löslichkeit (Abb. 10, fl-PrP, S/P/E).

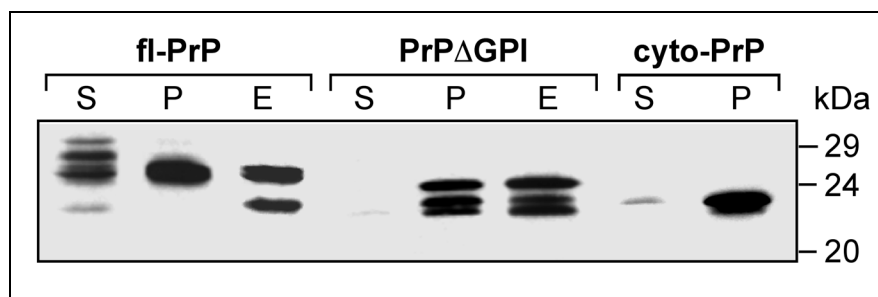


Abbildung 10. Die modifizierte ER-Signalsequenz erlaubt eine effiziente Expression von PrP Δ GPI. Zellysate wurden auf je 1% Triton X-100 und DOC eingestellt und durch Zentrifugation in lösliche (S) und unlösliche (P) Bestandteile aufgeteilt. Im Gegensatz zu fl-PrP sind PrP Δ GPI und cyto-PrP vollkommen unlöslich. Ein Verdau mit Endoglykosidase H zeigt, dass fl-PrP teilweise und PrP Δ GPI gar nicht glykosyliert ist (E). Die Proteine wurden per Immunoblot mit dem Antikörper 3F4 nachgewiesen.

3.3. PrP Δ GPI hat Eigenschaften von PrP^{Sc}

Wie in Abschnitt 3.2 gezeigt wurde, ist PrP Δ GPI in nichtionischen Detergenzien unlöslich. Diese Eigenschaft teilt es mit PrP^{Sc} infektiöser Prionen. Neben den Löslichkeitseigenschaften ist die limitierte Proteaseresistenz von PrP^{Sc} ein weiteres Kriterium für den Unterschied zwischen PrP^C und PrP^{Sc}. So führt ein proteolytischer

Verdau mit der Proteinase K (PK) zur vollständigen Degradation von PrP^C, während von PrP^{Sc} ein stabiles Fragment verbleibt (Caughey und Raymond, 1991).

Zur Untersuchung der PK-Resistenz wurde Lysat von PrPΔGPI-exprimierenden Zellen ohne Proteaseinhibitor hergestellt. Das Lysat wurde mit verschiedenen PK-Konzentrationen auf Eis inkubiert (siehe Methoden).

Abbildung 11 zeigt, dass der PK-Verdau ein ca. 15 kDa großes Fragment von PrPΔGPI generierte (3 μg/ml PK, Pfeilkopf). Eine Erhöhung der PK-Konzentration auf 30 μg/ml führte dazu, dass neben einer unspezifischen Bande nur noch das PrPΔGPI-Fragment erhalten blieb. Eine weitere Erhöhung der PK-Konzentration auf 300 μg/ml degradierte alle PrPΔGPI-spezifischen Banden.

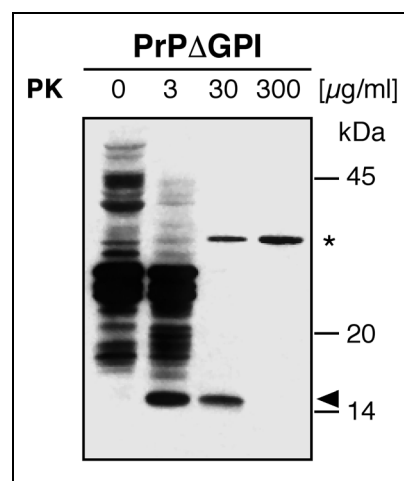


Abbildung 11. PrPΔGPI zeigt eine partielle Resistenz gegen einen limitierten Protease-Verdau. Dabei entsteht ein Fragment von ca. 15 kDa (Pfeilkopf). Lysat von PrPΔGPI-exprimierenden Zellen wurde mit den angegebenen Mengen Proteinase K (PK) für eine Stunde auf Eis inkubiert. Die Proben wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und mit einem Immunoblot nachgewiesen. Der Stern kennzeichnet eine Kreuzreaktion des Antikörpers 3F4 mit PK.

Ein weiterer Hinweis auf einen dem PrP^{Sc} ähnlichen, aggregierten Zustand war die hohe Stabilität von PrPΔGPI gegenüber endogenen Proteasen der Hefe. Wurde Lysat von PrPΔGPI-exprimierenden Zellen bei 30°C inkubiert, so war auch nach 28 h keine nennenswerte Degradation zu erkennen (Abb. 12, -Detergenz). Auch die Zerstörung von Membranen durch den Zusatz von Triton X-100 (0,5%) führte nur zu einer sehr schwachen Degradation nach 28 h Inkubation (Abb. 12, TX). Wurde das Lysat

dagegen mit SDS (1%) versetzt, konnte schon nach einer Inkubationszeit von 5 min eine einsetzende Degradation mit der Bildung von Fragmenten beobachtet werden. Nach 60 min war PrP Δ GPI fast vollständig degradiert (Abb. 12, SDS).

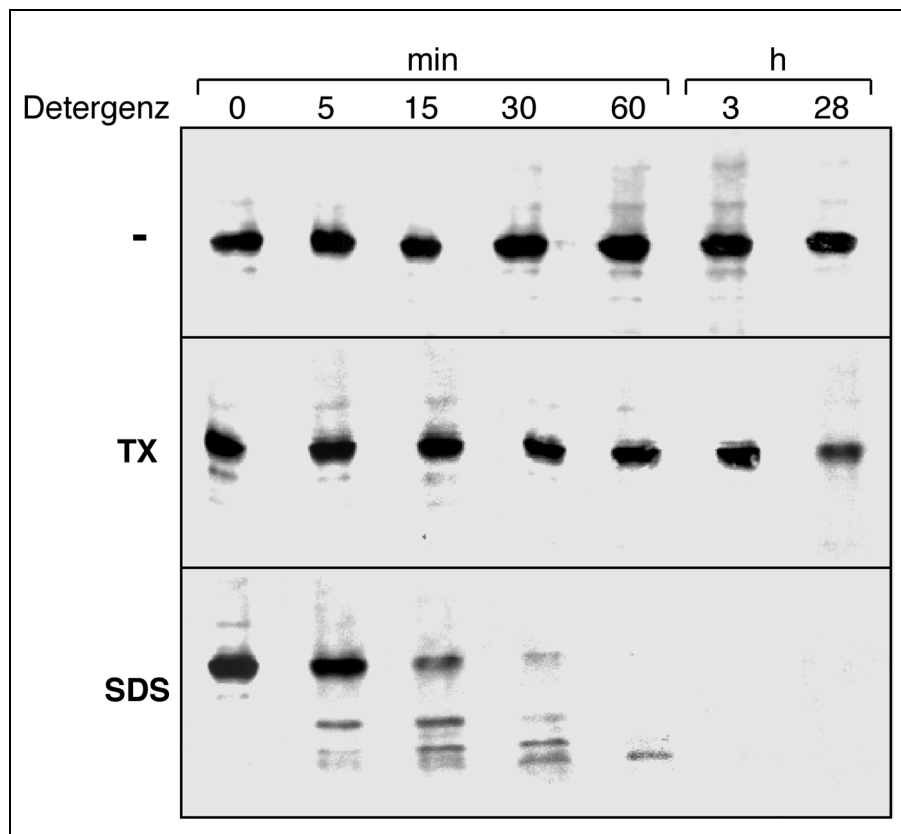


Abbildung 12. PrP Δ GPI ist resistent gegen endogene Proteasen der Hefe. Lysat (-) und mit 0,5% Triton X-100 (TX) oder 1% SDS (SDS) versetztes Lysat wurden bei 30°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. PrP wurde mit dem Antikörper 3F4 nachgewiesen.

3.4. PrP wird in das ER importiert

Ein Verdau mit der Endoglykosidase H (EndoH) zeigte, dass PrP Δ GPI nicht glykosyliert wird (Abb. 10, PrP Δ GPI, P/E), obwohl die Konsensussequenzen für eine Asparagin-gekoppelte Glykosylierung (N-X-S oder N-X-T) in Säuger- und Hefezellen identisch sind (Struck und Lennarz, 1980; Gavel und von Heijne, 1990).

Da PrP Δ GPI in den Hefezellen nicht glykosyliert wurde, könnte es sein, dass das Protein nicht in das ER importiert wurde.

Um den Import von PrP Δ GPI zu untersuchen, wurde eine Membranfraktionierung durchgeführt. Hefezellen, die PrP Δ GPI oder cyto-PrP exprimieren sowie Zellen, die nur den leeren Vektor tragen, wurden in TE lysiert. Die Lysate wurden in einem Renografin-Dichtegradienten aufgetrennt (siehe Methoden). Hierbei schwimmen die Membranvesikel je nach ihrer Dichte in dem Gradienten auf. Es werden vakuoläre Membranen von ER-Membranen und Plasmamembranen getrennt (Schandel und Jenness, 1994; Wang und Chang, 1999).

Abb. 13 zeigt, dass PrP Δ GPI im Gradienten mit Membranvesikeln assoziiert war (Fraktionen 1-11), während cyto-PrP am Boden des Gradienten verblieb (Fraktionen 12-14). Als Kontrollen wurden Fraktionen auf die Verteilung des Plasmamembranproteins Gas1p (Abb. 13, Vektor/ α Gas1) sowie die Untereinheit Gim2p (Abb. 13, Vektor/ α Gim2) des cytosolisch lokalisierten Gim-Chaperonin-Komplexes untersucht. PrP Δ GPI hat also den sekretorischen Weg eingeschlagen, auch wenn es nicht glykosyliert wurde.

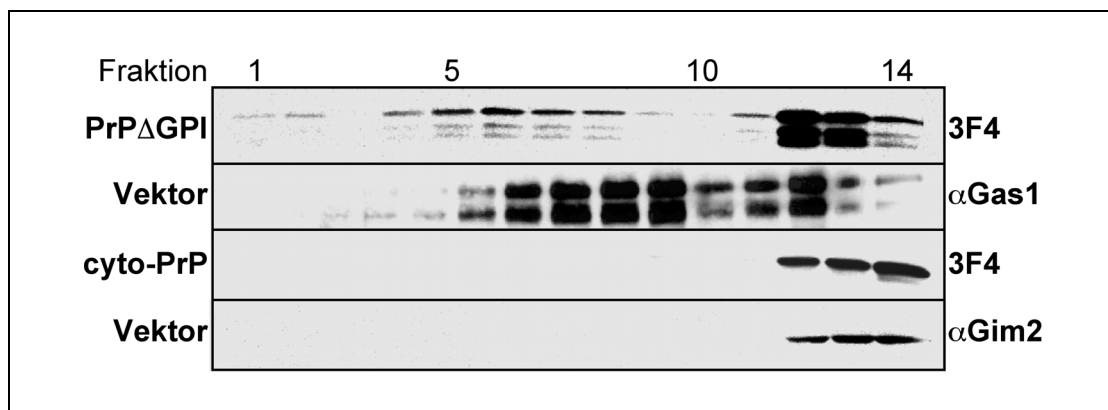


Abbildung 13. PrP Δ GPI wird in das ER transloziert. PrP Δ GPI ist wie das Plasmamembranprotein Gas1p mit Membranvesikeln (Fraktionen 1-11) assoziiert, die vom Boden des Gradienten (Fraktionen 12-14) aufschwimmen (PrP Δ GPI, Vektor/ α Gas1). Cytosolisches PrP verbleibt dagegen wie die Untereinheit 2 des Gim-Komplexes in den Bodenfraktionen (cyto-PrP, Vektor/ α Gim2). Hefezellen, die PrP Δ GPI oder cyto-PrP exprimieren oder den leeren Vektor tragen, wurden lysiert und das Lysat einer Renografin-Dichtezentrifugation unterzogen (siehe Methoden). Je 14 Fraktionen wurden von oben entnommen. Nach einer SDS-PAGE folgte die Immundetektion mit dem Antikörper 3F4 (PrP Δ GPI, cyto-PrP) oder den Antiseren α Gas1 und α Gim2.

Die Expression verschiedener PrP-Konstrukte in *S. cerevisiae* hat gezeigt, dass eine den N2a-Zellen entsprechende posttranslationale Modifikation von Wildtyp-PrP (mPrP) in der Hefe nicht stattfindet. Der Austausch der Signalsequenzen und der basischen N-terminalen AS gegen Sequenzen des endogenen Proteins Gas1p ermöglicht einen Import in das ER. Während fl-PrP teilweise löslich und glykosyliert ist, befindet sich PrP Δ GPI in der unlöslichen Fraktion und ist unglykosyliert. Die Unlöslichkeit von PrP Δ GPI in milden Detergenzien und die Generation eines proteaseresistenten Fragmentes nach einem PK-Verdau sind Eigenschaften von PrP^{Sc}.

3.5. PrP-Expression führt zu einem Wachstumsdefekt

Nach der Transformation der Hefezellen konnte man beobachten, dass fl-PrP oder PrP Δ GPI-exprimierende Kulturen nach drei Tagen Inkubation wesentlich kleinere Kolonien bildeten als Vergleichskulturen, die nur mit dem leeren Vektor transformiert wurden. Um diesen Wachstumsdefekt zu messen, wurden Vorkulturen auf die gleiche Dichte verdünnt und das Wachstum der Zellen durch die Lichtstreuung im Photometer verfolgt (OD₆₀₀). Es zeigte sich, dass die GPI-Ankersequenz keinen Einfluss auf den Wachstumsdefekt hatte (Abb. 14, PrP Δ GPI, fl-PrP). Wurde PrP im Cytosol exprimiert, so wuchsen die Hefezellen wie Kontrollzellen, hatten also keinen Wachstumsdefekt (Abb. 14, cyto-PrP, Vektor). Hierbei wurde cyto-PrP genauso stark exprimiert wie PrP Δ GPI. Dies schließt aus, dass der von PrP Δ GPI ausgelöste Wachstumsdefekt durch eine gegenüber cyto-PrP erhöhte Menge an missgefaltetem Protein verursacht wurde.

Als weitere Kontrolle wurde das Grüne Fluoreszierende Protein (GFP) exprimiert, welches wie die PrP-Konstrukte durch die erweiterte Signalsequenz von Gas1p in das ER transloziert wurde. Auch GFP wurde sehr stark exprimiert und war größtenteils unlöslich (Daten nicht gezeigt), führte aber nicht zu einem Wachstumsdefekt (Abb. 14, GFP).

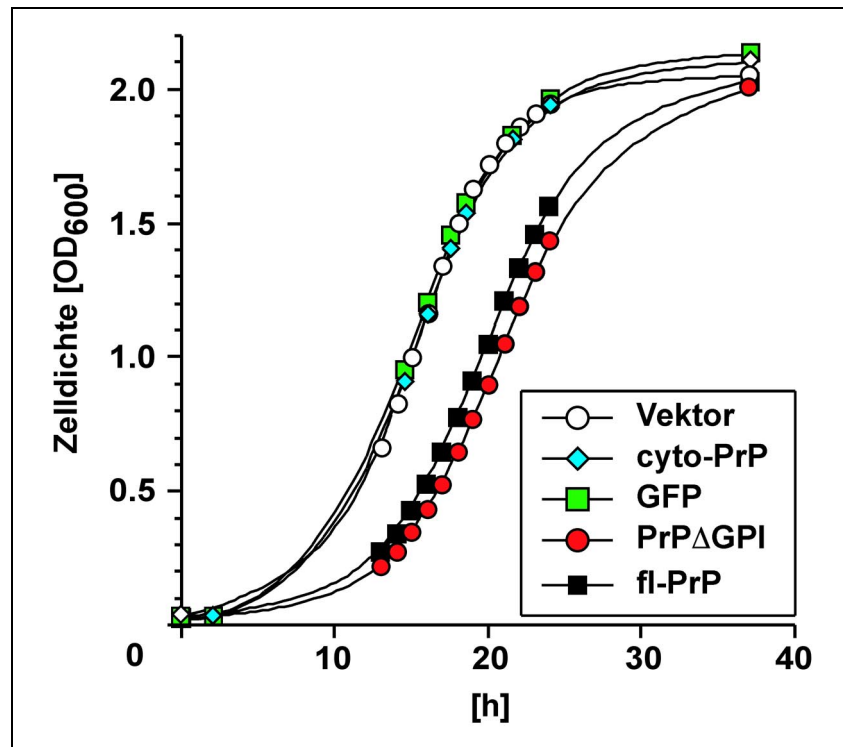


Abbildung 14. Die Expression von fl-PrP und PrP Δ GPI in der Hefe führt zu einem Wachstumsdefekt. Während cytosolisches PrP (cyto-PrP) und sekretorisches GFP (GFP) keinen Einfluss auf das Wachstum haben, wachsen Zellen, die PrP Δ GPI oder fl-PrP exprimieren, deutlich langsamer. Übernachtkulturen wurden auf die gleiche optische Dichte (OD₆₀₀) verdünnt. Das Wachstum wurde durch regelmäßige Messung der OD verfolgt.

3.6. Der Wachstumsdefekt ist reversibel

Ist die PrP-Expression der Grund für den Wachstumsdefekt? Um zu überprüfen, ob der beobachtete Wachstumsdefekt direkt durch die Expression verursacht wurde und ob die Hefezellen dauerhaft durch die Anwesenheit des PrP Δ GPI-Gens bzw. -Proteins in ihrem Wachstum gehemmt wurden, wurde PrP Δ GPI in einem induzierbaren System exprimiert.

Hierzu wurde das Plasmid pTET-PrP Δ GPI hergestellt, in dem PrP Δ GPI unter der Kontrolle des Tetracyclin-Transaktivators (tTA) steht. Bei Supplementierung des Nährmediums mit dem Tetracyclinderivat Doxycyclin dissoziiert der Transaktivator von der Operator-Sequenz (tetO) des Plasmids und es findet keine Aktivierung des Promoters statt. Wird das Doxycyclin aus dem Nährmedium entfernt, bindet der Transaktivator und der Promoter entfaltet seine volle Aktivität (Gari *et al.*, 1997).

Zur Kontrolle der Expression wurde eine Kultur in Gegenwart von Doxycyclin inkubiert. Dieses wurde durch Auswaschen entfernt und durch Medium mit verschiedenen Doxycyclin-Konzentrationen ersetzt. Die Zellen wurden nach zweistündigem Wachstum lysiert, durch Zentrifugation in lösliche und unlösliche Bestandteile getrennt und auf einem SDS-Gel analysiert. Es zeigte sich, dass die PrPAGPI-Expression nach zweistündiger Induktion mittels *Western-Blot* nachweisbar war und dass die Stärke der Induktion durch die Variation der Doxycyclinkonzentration verändert werden konnte. Während bei einer Doxycyclinkonzentration von 1 µg/ml keine Expression festgestellt werden konnte, lag bei 0,1 µg/ml eine schwache Expression vor. In Nährmedium ohne Doxycyclin war eine starke Expression von PrPAGPI zu beobachten (Abb. 15).

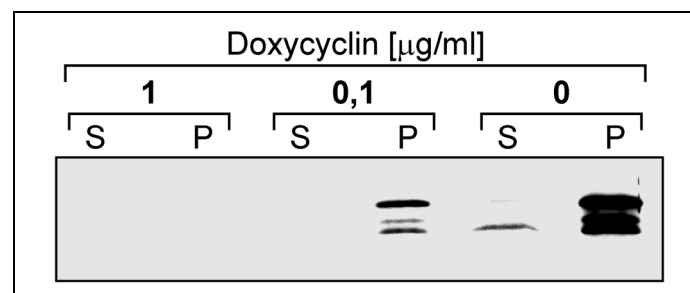


Abbildung 15. Doxycyclin-abhängige Expression von PrPAGPI. Hefezellen, die das Plasmid pTET-PrPAGPI tragen, wurden in Medium mit der angegebenen Doxycyclin-Konzentration überführt. Nach 2 h Inkubation wurde von den Zellen Gesamtprotein isoliert und auf einem SDS-Gel aufgetrennt. PrPAGPI wurde mittels Immunoblot mit dem Antikörper 3F4 nachgewiesen.

Wurde eine Vorkultur in Medium mit und ohne Doxycyclin eingebracht, so wuchsen die Zellen mit Doxycyclin wesentlich schneller als die Zellen ohne Doxycyclin, in welchen PrPAGPI mittels *Western-Blot* nachgewiesen werden konnte. Wurde diese langsam wachsende Kultur wiederum in Medium mit und ohne Doxycyclin verdünnt, so wurde der Wachstumsdefekt in Medium mit Doxycyclin aufgehoben, während er in Medium ohne Doxycyclin anhielt. Der *Western-Blot* zeigt, dass durch die Zugabe von Doxycyclin kein PrPAGPI mehr produziert wurde (Abb. 16).

Die Expression von PrP Δ GPI mittels dieses Systems zeigt, dass der Wachstumsdefekt durch die Expression von PrP Δ GPI ausgelöst wurde und vollständig reversibel war.

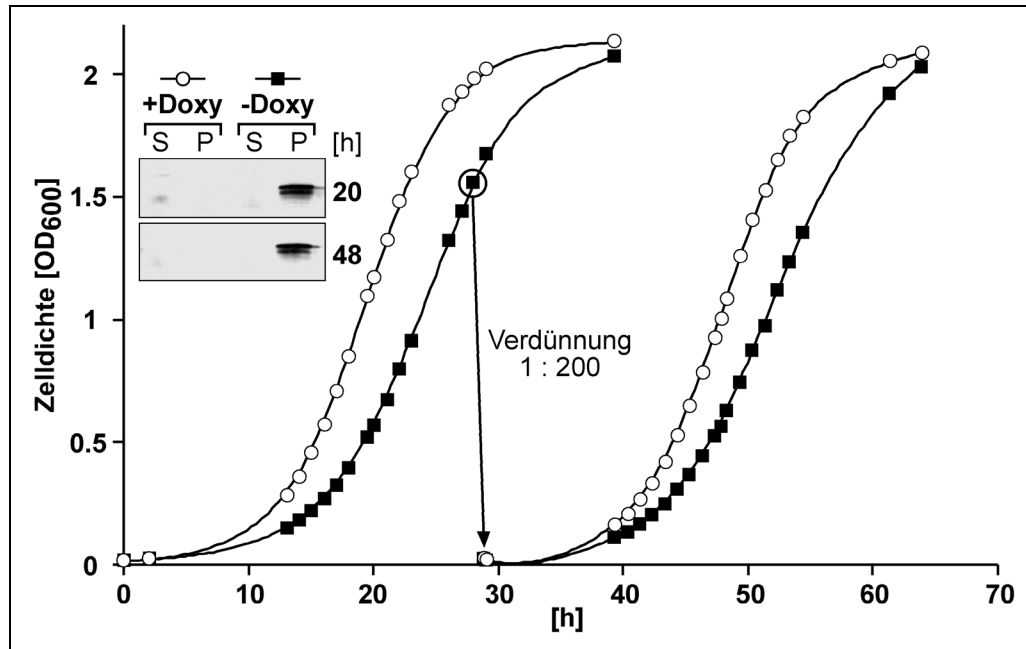


Abbildung 16. Der Wachstumsdefekt wird durch die PrP Δ GPI-Expression ausgelöst und ist reversibel. Eine Übernachtskultur wurde in frisches Medium mit Doxycyclin (+Doxy, Kreis) und ohne Doxycyclin (-Doxy, Quadrat) verdünnt. Die PrP Δ GPI-exprimierende Kultur (Einsatz, -Doxy, 20 h) wurde nach 28 h Wachstum nochmals wie oben verdünnt. Es zeigt sich, dass mit der Zugabe von Doxycyclin kein PrP Δ GPI mehr nachgewiesen werden kann (Einsatz, +Doxy, 48 h) und das ursprüngliche Wachstum wieder hergestellt wird.

3.7. Der Aminoterminus von PrP Δ GPI ist für die Ausbildung des Wachstumsdefekts nicht notwendig

Wie in Abschnitt 3.3 gezeigt wurde, bildet PrP Δ GPI nach einem proteolytischen Verdau ein resistentes Fragment, welches dem C-terminalen Bereich des PrP von den Aminosäuren ~90 bis 231 entspricht. Weiterhin können transgene Mäuse, die nur PrP mit einer N-terminalen Deletion (PrP Δ 28-89) exprimieren, mit Scrapie infiziert werden (Fischer *et al.*, 1996).

Um zu untersuchen, ob dieser Bereich zur Ausbildung des Wachstumsdefekts ausreichend ist, wurden zwei Konstrukte kloniert, die den N-Terminus des PrP von den Aminosäuren 28 bis 116 (PrP Δ 117-231) oder den C-Terminus von den

Aminosäuren 90 bis 231 (PrP Δ 28-89) kodieren. Die Expression beider Konstrukte im Hefestamm HU1 zeigte, dass PrP Δ 117-231 keinen Wachstumsdefekt verursachte, während PrP Δ 28-89 denselben Wachstumsdefekt verursachte wie PrP Δ GPI (Abb. 17). Eine potenzielle Beeinflussung des Wachstums durch den PrP-N-Terminus könnte eine bestimmte Mindestgröße des Proteins zur Grundlage haben. Um dies zu analysieren, wurde der PrP-N-Terminus mit GFP fusioniert (PrP Δ 117-231-GFP), wodurch das Protein gegenüber PrP Δ 117-231 um 27 kDa vergrößert wurde. Auch PrP Δ 117-231-GFP zeigte ein normales Wachstum, das dem der Vektor-Kontrolle entsprach (Abb. 17). Die Ergebnisse zeigten, dass der N-Terminus des PrP keinen Einfluss auf die Ausprägung des Wachstumsdefektes hat. Das PK-resistente C-terminale Fragment induzierte dagegen einen Wachstumsdefekt.

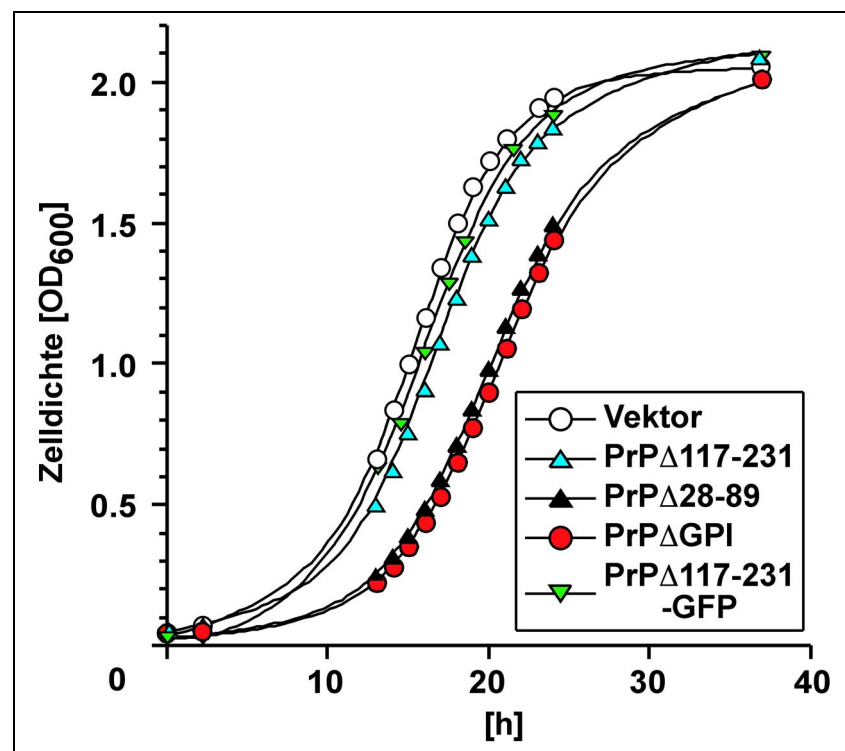


Abbildung 17. Der proteaseresistente C-terminale Bereich von PrP ist für die Ausbildung des Wachstumsdefektes ausreichend, während der N-Terminus keinen nachteiligen Effekt ausübt. Das Wachstum von Zellen, die den PrP-N-Terminus bis zur Aminosäure 116 (PrP Δ 117-231), ein Fusionsprotein des N-Terminus mit GFP (PrP Δ 117-231-GFP) oder den PrP-C-Terminus von Aminosäure 90 bis 231 (PrP Δ 28-89) exprimieren, wurde mit dem Wachstum von PrP Δ GPI-exprimierenden Zellen verglichen (siehe Abb. 14).

3.8. Die Transmembrandomäne des PrP Δ GPI vermittelt Fehlfaltung und Wachstumsdefekt

Um die Region(en) des PrP Δ GPI, die für die Fehlfaltung und den Wachstumsdefekt verantwortlich sind, weiter einzugrenzen, wurden Konstrukte kloniert, bei denen strukturelle Elemente des Proteins schrittweise deletiert wurden. Als Grundlage dafür diente die Zuordnung von Aminosäuren zu α -Helices und β -Faltblättern nach Riek (Riek *et al.*, 1996; Riek *et al.*, 1997). Dabei blieben jeweils die Signalsequenz sowie die folgenden 4 Aminosäuren von Gas1p erhalten, um ER-Import und Prozessierung sicherzustellen (Abb. 18). Da das Prion Protein keine bekannte enzymatische Funktion hat, wurden als Indikator für eine erfolgreiche Faltung des Proteins das Löslichkeitsverhalten in Puffer mit je 1% Triton X-100 und DOC (TDOC) und der Glykosylierungsstatus analysiert. Die Glykosylierung der Proteine wurde durch einen Verdau mit der Endoglykosidase H (EndoH) nachgewiesen. Endo H entfernt Asparagin-gekoppelte Zuckerketten von Proteinen, wodurch sich ihre Mobilität in SDS-Gelen erhöht.

Die Deletion des N-Terminus (Aminosäuren 28-89) bewirkte eine leichte Erhöhung der Löslichkeit in TDOC (Abb. 18, PrP Δ 28-89, S/P). Der EndoH-Verdau zeigte allerdings keine Glykosylierung dieses Proteins (Abb. 18, PrP Δ 28-89, E).

Die sukzessiven Deletionen der Transmembrandomäne und des ersten β -Faltblattes (PrP Δ 28-140), der ersten α -Helix (PrP Δ 28-156) und des zweiten β -Faltblattes (PrP Δ 28-165) erhöhten die Löslichkeit weiter, sodass PrP Δ 28-165 fast vollständig löslich ist. Schon bei der Deletionsmutante PrP Δ 28-140 zeigte sich, dass mehr als 50% des Proteins glykosyliert waren. Eine vollständige Glykosylierung wurde durch die Deletion der Aminosäuren 28-156 bzw. 28-165 erreicht (Abb. 18, PrP Δ 28-156, PrP Δ 28-165, S/P/E).

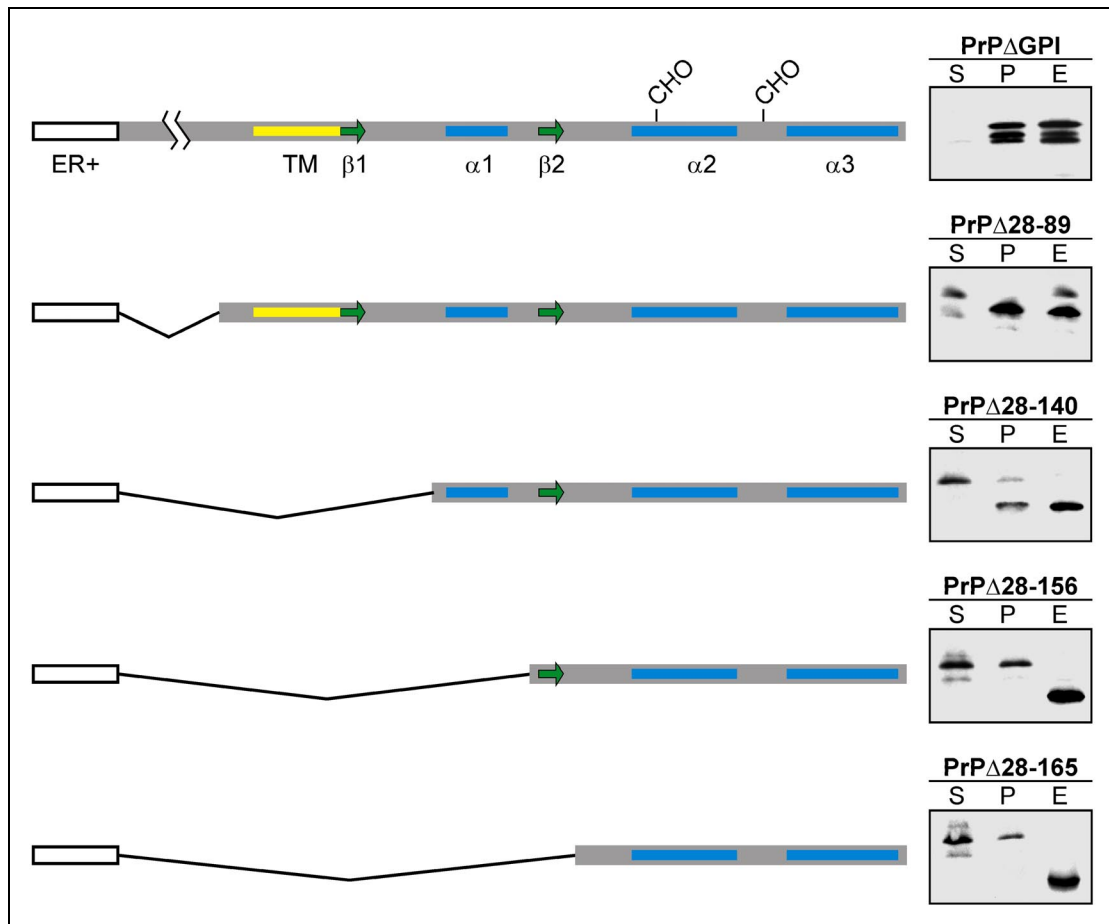


Abbildung 18. Die potenzielle Transmembrandomäne vermittelt die Fehlfaltung von PrP Δ GPI. Die sukzessive Deletion struktureller Elemente erhöht die Löslichkeit in milden Detergenzien und erlaubt die Glykosylierung. Die links schematisch dargestellten Konstrukte wurden in Hefezellen exprimiert. Zelllysate wurden auf eine Endkonzentration von 1% TDOC gebracht und lösliche (S) und unlösliche (P) Proteine wurden durch Zentrifugation voneinander getrennt. Der Glykosylierungsstatus wurde durch einen Verdau mit EndoH untersucht (E). Weiß: erweiterte ER-Signalsequenz; gelb: potenzielle Transmembrandomäne; blau: α -Helix; grün: β -Faltblatt; schwarze Linie: Deletion.

Abbildung 19 zeigt, dass PrP-Mutanten in Hefezellen keinen Wachstumsdefekt mehr auslösten, sobald die potenzielle Transmembrandomäne in die Deletion des N-Terminus eingeschlossen wurde (PrP Δ 28-140, PrP Δ 28-156, PrP Δ 28-165).

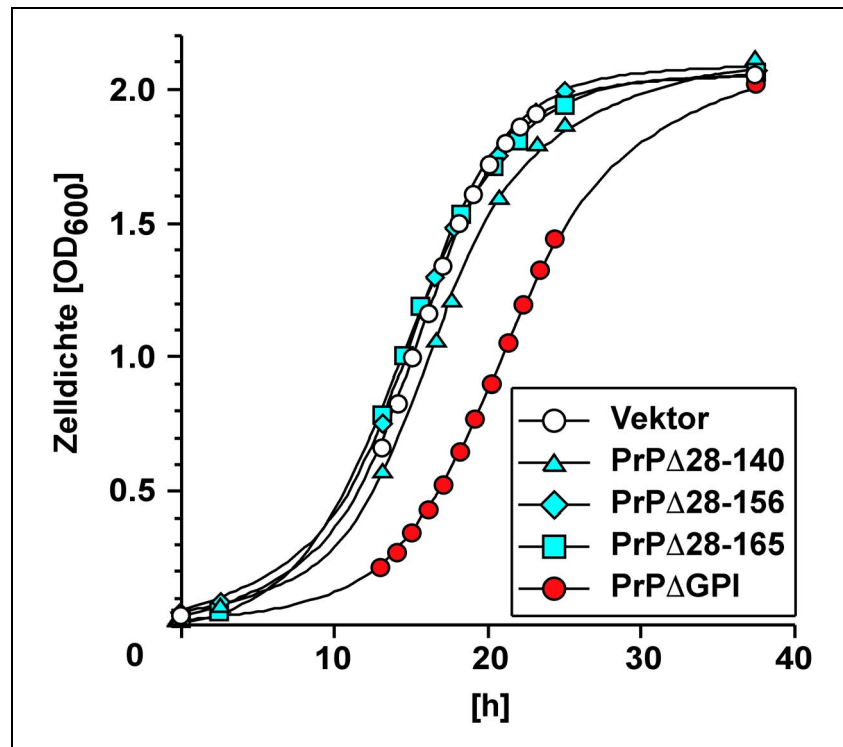


Abbildung 19. Die Deletion der potenziellen Transmembrandomäne stellt das normale Wachstum wieder her. Das Wachstum von Zellen, die PrP Δ 28-140, PrP Δ 28-156 oder PrP Δ 28-165 exprimieren wurde mit PrP Δ GPI-exprimierenden Zellen verglichen (siehe Abb. 14).

Die Untersuchung der N-terminal verkürzten Deletionsmutanten hat gezeigt, dass die potenzielle Transmembrandomäne eine wichtige Rolle für die Faltung und die Ausprägung des Wachstumsdefektes hat.

Obwohl PrP in Säugerzellen mit einem GPI-Anker an der Zelloberfläche verankert ist, wurden Teile des PrP sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als Transmembranprotein gefunden. Dabei kann PrP zwei Orientierungen einnehmen: N^{tm} PrP mit dem N-Terminus im ER-Lumen und C^{tm} PrP mit dem C-Terminus im ER-Lumen. Die Anteile von PrP, N^{tm} PrP und C^{tm} PrP sind variabel und können durch verschiedene Mutationen beeinflusst werden (Hegde *et al.*, 1998a; Hegde *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001).

Um die Rolle der Transmembrandomäne für den Wachstumsdefekt weiter zu untersuchen, wurden zwei Konstrukte erstellt, die sich hinsichtlich der Membrantopologie voneinander unterscheiden. Das Konstrukt PrP-AV3 enthält die drei Alanin \rightarrow Valin-Mutationen der Aminosäuren 112, 114 und 117 (AV3), welche in

früheren Versuchen einen besonders hohen Anteil an $C^{tm}PrP$ verursachten (Hegde *et al.*, 1998a). Im Konstrukt $PrP\Delta TM$ wurde die Region der Transmembrandomäne (Aminosäuren 103 bis 133) deletiert, was eine Membranintegration verhindern sollte (Abb. 20).

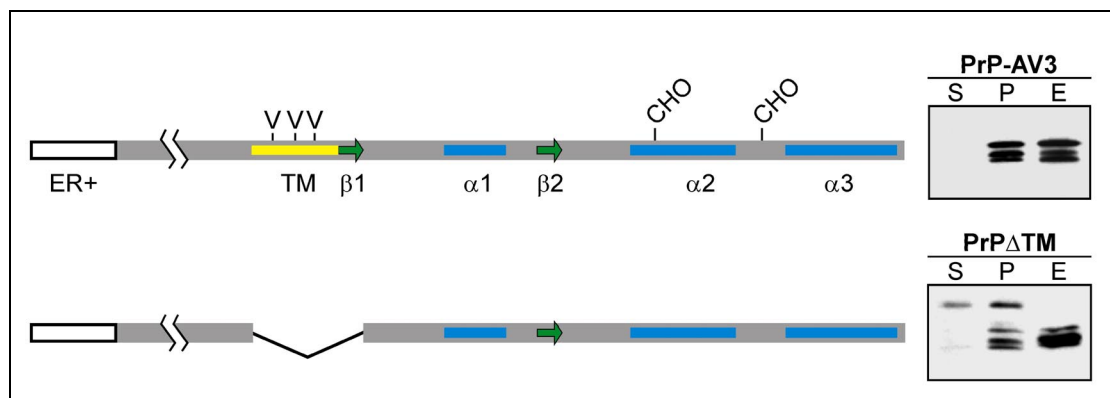


Abbildung 20. Die Deletion der potenziellen Transmembrandomäne führt zu einer verbesserten Faltung von PrP. PrP Δ GPI mit AV3-Mutation (PrP-AV3) oder der Deletion der potenziellen Transmembrandomäne (PrP Δ TM) wurde auf Löslichkeit und Glykosylierung untersucht (Legende siehe Abb. 18)

Der Proteinnachweis zeigte für PrP-AV3 exakt das gleiche Bandenmuster wie für PrP Δ GPI, nämlich Unlöslichkeit in TDOC sowie fehlende Glykosylierung (Abb. 20, PrP-AV3). Bei PrP Δ TM dagegen erschien ein geringer Teil des Proteins in der löslichen Fraktion (Abb. 20, PrP Δ TM, S/P). Dieser lösliche Bestandteil gehörte zur glykosylierten Fraktion von PrP Δ TM, wie ein Verdau mit EndoH zeigte (Abb. 20, PrP Δ TM, E).

Haben diese die Membrantopologie modulierenden Mutationen auch einen Einfluss auf den Wachstumsdefekt?

Ein Vergleich der Wachstumsraten von PrP-AV3- oder PrP Δ TM-exprimierenden Zellen zeigt, dass die AV3-Mutation den Wachstumsdefekt von PrP in der Hefe noch verstärkte, während die Deletion der Transmembranregion dazu führte, dass ein annähernd normales Wachstum der Zellen stattfand (Abb. 21).

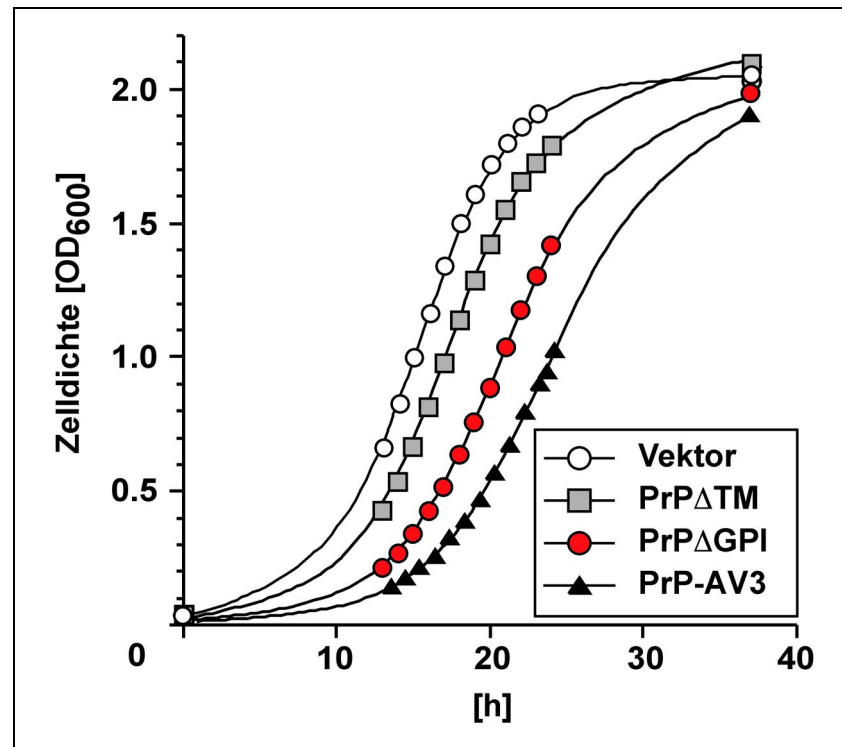


Abbildung 21. Die Transmembranregion von PrP moduliert den Wachstumsdefekt. Der Wachstumsdefekt wurde durch die Alanin→Valin-Mutationen an den Positionen 112, 114 und 117 (PrP-AV3) verstärkt, während er durch die Deletion der Transmembrandomäne (PrP Δ TM) fast vollständig aufgehoben wurde. Das Wachstum der Zellen wurde wie in Abb. 13 beschrieben untersucht.

Liegt PrP-AV3 auch in der Hefe als Ctm-Form vor?

Um die Topologie des PrP-AV3 zu untersuchen, wurden Vesikel von ER-Membranen (Mikrosomen) gereinigt (Wuestehube und Schekman, 1992). Nach einem Verdau der Mikrosomen mit Proteinase K (PK) konnte festgestellt werden, dass ein durch die Membranen geschütztes Fragment von PrP-AV3 auftrat (Abb. 22A, +PK, -TX, Pfeilkopf). Dieses Fragment trat in der unbehandelten Probe nicht auf (Abb. 22A, -PK, -TX) und die Zerstörung der Membranen mit Triton X-100 führte zur Degradation des Fragments (Abb. 22A, +PK, +TX). Parallel behandelte Mikrosomen von PrP Δ TM-exprimierenden Zellen zeigten kein durch PK generiertes Fragment (Abb. 22A, +PK, -TX), was darauf hindeutet, dass PrP Δ TM komplett in das ER importiert wurde.

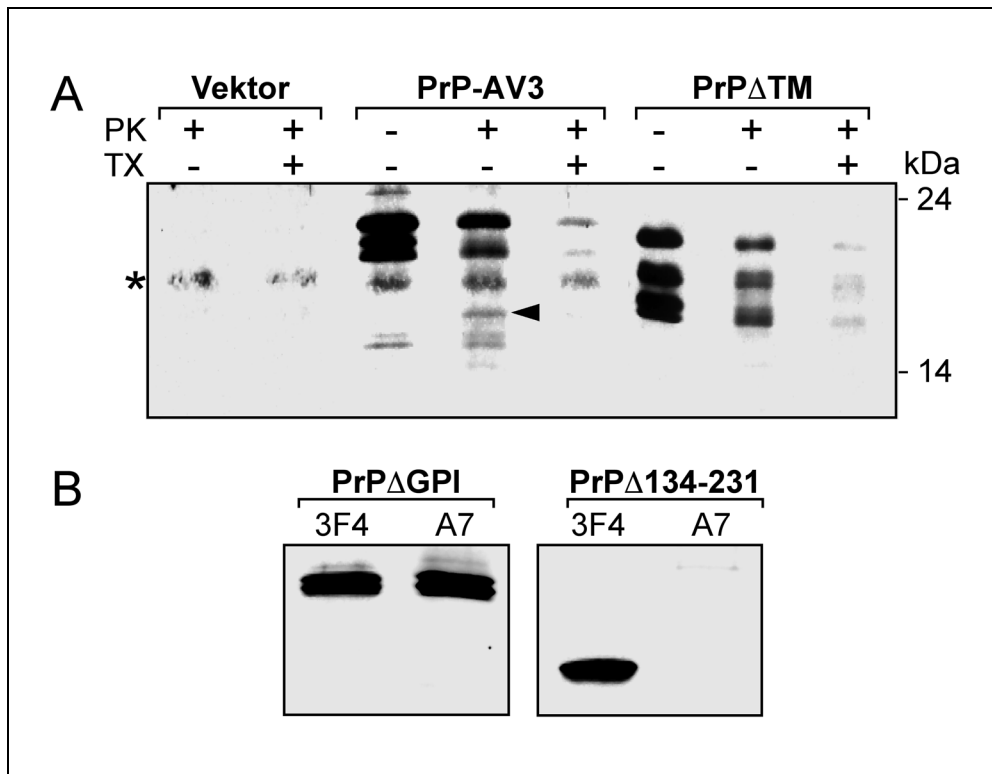


Abbildung 22. PrP-AV3 liegt teilweise in Transmembran-Form vor. **A.** Gereinigte Mikrosomen von Hefezellen, die PrP-AV3 oder PrP Δ TM exprimieren oder den leeren Vektoren tragen, wurden mit Proteinase K (PK) mit oder ohne Detergenz Triton X-100 (TX) inkubiert. Das ca. 18 kDa große Ctm PrP-Fragment (Pfeilkopf) entsteht nur bei PrP-AV3 und wird durch die Zugabe von Detergenz zerstört. In PrP Δ TM-Mikrosomen entsteht kein Fragment. Die Proteine wurden nach einem SDS-Gellauf mit dem α -PrP Antiserum A7 visualisiert. Der Stern kennzeichnet eine unspezifische Bande. **B.** Das α -PrP Antiserum A7 erkennt nur den C-terminalen Bereich von PrP. Werden die Aminosäuren 134-231 deletiert (PrP Δ 134-231), so wird das Protein nur noch vom monoklonalen Antikörper 3F4 erkannt.

Dass es sich bei dem gezeigten Fragment um Ctm PrP handelte, ergab sich aus der Größe von ca. 18 kDa, während Ntm PrP eine Größe von ca. 14 kDa aufweist (Hegde *et al.*, 1998a). Weiterhin wies die Verwendung des für den C-Terminus von PrP spezifischen Antiserums A7 auf eine Ctm PrP-Form hin. Im Gegensatz zum monoklonalen Antikörper 3F4 erkannte A7 den PrP-N-Terminus nicht (Abb. 22B, PrP Δ 134-231, 3F4/A7).

Diese Experimente zeigten, dass PrP-AV3 durch die Transmembrandomäne teilweise in die Membran integriert wird. Dagegen führt die Deletion der Transmembrandomäne in PrP Δ TM dazu, dass keine Membranintegration stattfindet.

3.9. Ein C-terminaler Membrananker supprimiert den Wachstumsdefekt

In Säugerzellen wurde gezeigt, dass eine korrekte Biogenese von PrP von der Membranverankerung abhängig ist. So wird PrP ohne GPI-Anker nicht komplex glykosyliert. Die Membranverankerung kann durch einen C-terminalen Transmembrananker des CD4-Proteins (CD4-Anker) wieder hergestellt werden, wodurch auch die korrekte Glykosylierung des PrP erreicht wird (Taraboulos *et al.*, 1995). Das CD4-Protein ist ein Glykoprotein der Zelloberfläche aus T-Zellen der Maus. Der 63 Aminosäuren lange CD4-Anker besteht aus einer 25 Aminosäuren langen Transmembrandomäne, die restlichen 38 Aminosäuren sind im Cytosol lokalisiert (Tourvieille *et al.*, 1986; Littman und Gettner, 1987).

Da die GPI-Verankerung in Hefezellen selbst mit GPI-Erkennungssequenzen der Hefe sehr ineffizient war, stellte sich die Frage, ob ein CD4-Anker die Faltung von PrP in der Hefe sowie den Wachstumsdefekt beeinflusst. Dazu wurde ein Konstrukt erstellt, bei dem das PrP-AV3 mit dem 63 Aminosäuren langen CD4-Anker fusioniert wurde (Abb. 23, PrP-AV3-CD4).

Die Membranverankerung des PrP-AV3-CD4 führte zu einer erhöhten Löslichkeit und einer sehr schwachen Glykosylierung des Proteins (Abb. 23, PrP-AV3-CD4, S/P/E).

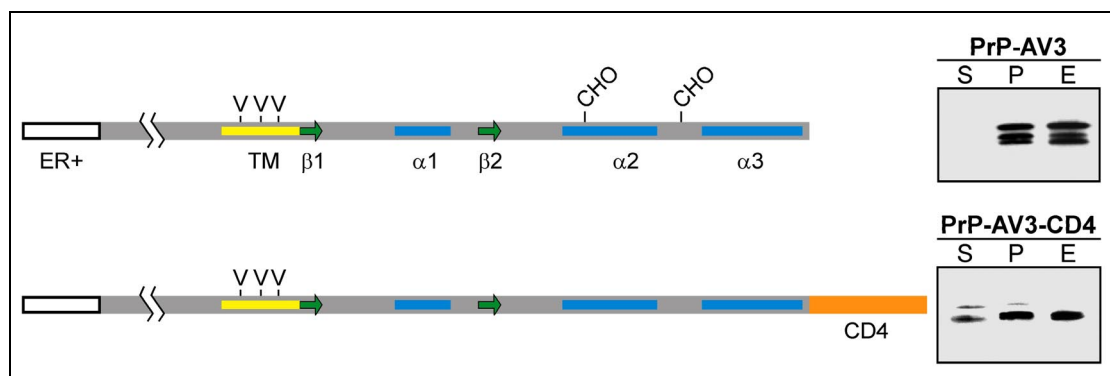


Abbildung 23. Ein C-terminaler Membrananker unterstützt die Faltung von PrP-AV3. Im Gegensatz zu PrP-AV3 ist PrP-AV3-CD4 teilweise löslich und glykosyliert. Zelllysate wurden in lösliche (S) und unlösliche (P) Bestandteile aufgetrennt oder einem Verdau mit EndoH (E) unterzogen. PrP wurde nach einer SDS-PAGE mit dem monoklonalen Antikörper 3F4 nachgewiesen.

Im Gegensatz zu dem weiterhin bestehenden Faltungsdefekt des PrP-AV3-CD4 war jedoch das Wachstum der PrP-AV3-CD4-exprimierenden Hefezellen normal.

Das Wachstum der Hefezellen wurde hier mit einem Tropfenassay untersucht, bei dem eine serielle Verdünnungsreihe der Zellen auf selektive Agarplatten aufgetropft wurde. Abbildung 24 zeigt, dass PrP-AV3-CD4-exprimierende Zellen so wuchsen wie Zellen mit einem Plasmid ohne PrP. PrP-AV3-exprimierende Zellen dagegen sind durch ihr langsames Wachstum in den letzten zwei Verdünnungsstufen nicht mehr zu sehen (Abb. 24, links).

Zur Kontrolle, ob die gleichen Zellzahlen aufgetropft wurden, wurde jeweils ein paralleler Ansatz auf nicht selektives Vollmedium aufgetropft. Durch die fehlende Selektion auf das Plasmid können die Zellen die nun nicht mehr benötigten Plasmide verlieren und exprimieren kein PrP mehr (Abb. 24, rechts).

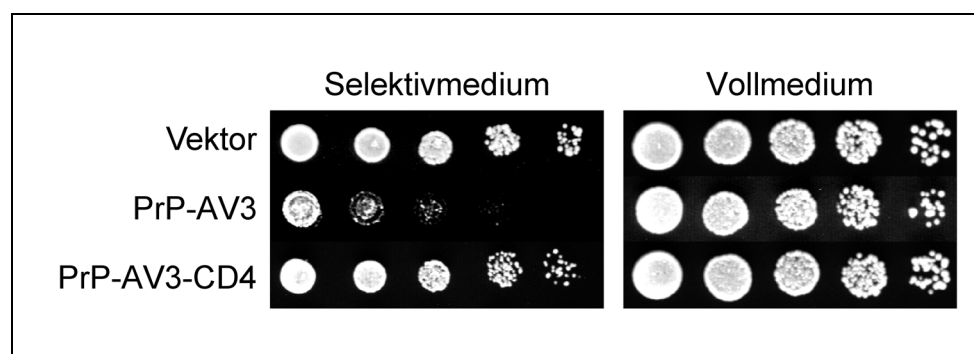


Abbildung 24. Eine effektive C-terminale Membranverankerung supprimiert den starken Wachstumsdefekt von PrP-AV3. Von PrP-AV3 und PrP-AV3-CD4 exprimierenden Zellen wurden Verdünnungsreihen angefertigt und auf selektives (links) oder Vollmedium (rechts) aufgetropft. Die Platten wurden nach zwei Tagen Wachstum bei 30°C ausgewertet.

Zusammenfassend haben die oben dargestellten Ergebnisse gezeigt, dass die Expression von PrP in *S. cerevisiae* einen reversiblen Wachstumsdefekt verursacht, der von der ER-Lokalisation des PrP abhängt. Der proteaseresistente C-terminale Teil von PrP (PrP Δ 28-89) ist für die Ausbildung des Wachstumsdefekts ausreichend. Es zeigt sich, dass die potenzielle Transmembrandomäne die Faltung von PrP und die Ausbildung des Wachstumsdefekts beeinflusst. Der schwere Wachstumsdefekt von

PrP-AV3 kann durch eine CD4-Anker-vermittelte Membranverankerung supprimiert werden.

3.10. PrP Δ GPI und die Qualitätskontrolle in der Hefe

Könnte die Ausbildung des Wachstumsdefektes durch PrP-Expression in der Hefe darin begründet sein, dass die Qualitätskontroll-Mechanismen im ER, die *Unfolded Protein Response* (UPR) und die ER-assoziierte Degradation (ERAD) in Bezug auf PrP nicht wirken? Um diese Möglichkeit zu analysieren, wurden PrP-exprimierende Zellen auf die Aktivierung von UPR und ERAD untersucht.

3.10.1. Die Unfolded Protein Response wird nicht aktiviert

Die schlechte Löslichkeit sowie die fehlende Glykosylierung von PrP in den Hefezellen läßt darauf schließen, dass PrP in missgefalteter, aggregierter Form im ER vorliegt. Eine zelluläre Reaktion auf die Ansammlung missgefalteter Proteine im ER ist die *Unfolded Protein Response* (UPR). Sie hat zum Zweck, durch die spezifische Induktion von Genen die Konzentration von molekularen Chaperonen und anderen faltungsfördernden Proteinen im ER zu erhöhen, um der Missfaltung von Proteinen entgegenzuwirken.

Die Expression zweier Proteine wurde in Bezug auf die Aktivierung der UPR untersucht: In das ER dirigiertes PrP-AV3, welches unlöslich war und einen starken Wachstumsdefekt verursachte, und cyto-PrP, welches zwar auch unlöslich war, aber nicht in das ER transloziert wurde und normales Wachstum zeigte.

Bei einer Aktivierung der UPR wird in Hefezellen die Transkription des KAR2-Gens gesteigert, was zu einem nachweisbaren Anstieg der mRNA-Menge des ER-Chaperons Kar2p führt. Die Analyse des KAR2-mRNA-Gehalts mittels *Northern Blot* zeigte, dass die Menge des KAR2-Transkripts in PrP-AV3-exprimierenden Zellen gegenüber cyto-PrP-exprimierenden Zellen nicht erhöht, die UPR also nicht aktiviert war (Abb. 25).

Weiterhin wurde in beiden Kulturen die UPR experimentell induziert, um zu untersuchen, ob in PrP-AV3-exprimierenden Zellen die Induktion prinzipiell möglich ist. Dazu wurde den Kulturen eine Stunde vor der RNA-Präparation Tunicamycin (5 µg/ml) zugefügt. Dieses Pilzgift verhindert die Glykosylierung von Proteinen, wodurch die Menge an missgefalteten Proteinen im ER erhöht und die UPR induziert wird (Duksin und Mahoney, 1982; Kohno *et al.*, 1993).

Hier zeigte sich, dass sowohl in PrP-AV3- als auch in cyto-PrP-exprimierenden Zellen die UPR induziert werden kann (Abb. 25, +Tm).

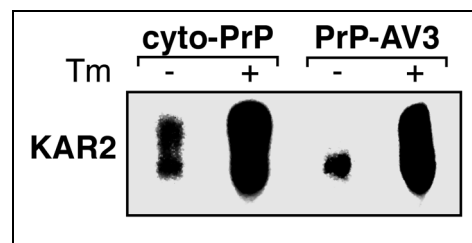


Abbildung 25. Die PrP-Expression führt nicht zu einer Aktivierung der UPR. Der Gehalt an KAR2-mRNA war durch die ER-Lokalisation des PrP (PrP-AV3, -Tm) gegenüber cytosolischem PrP nicht erhöht (cyto-PrP, -Tm). In beiden Kulturen konnte die UPR experimentell mit Tunicamycin induziert werden (cyto-PrP, PrP-AV3, +Tm). Von cyto-PrP- oder PrP-AV3-exprimierenden Zellen wurde RNA isoliert, auf einem Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer ³²P-markierten KAR2-Sonde hybridisiert. Die UPR wurde durch Zugabe von 5 µg/ml Tunicamycin 1 h vor der RNA-Isolierung induziert (+Tm).

3.10.2. Die Transmembrandomäne vermindert die ER-assoziierte Degradation

Der Einfluss der potenziellen Transmembrandomäne auf die Biogenese des PrP und das Wachstum der Zellen wurde in den oben dargestellten Experimenten mit N-terminal verkürzten PrP-Konstrukten untersucht.

Um den Einfluss der Transmembrandomäne auf die ER-assoziierte Degradation (ERAD) zu untersuchen, wurden C-terminal verkürzte Konstrukte kloniert, die den PrP-N-Terminus ohne (PrP Δ 117-231) und mit Transmembrandomäne (PrP Δ 134-231) kodieren. Ein weiteres Konstrukt kodierte den PrP-N-Terminus, dessen

Transmembrandomäne die drei Alanin-zu-Valin-Mutationen der Aminosäuren 112, 114 und 117 enthielt (PrP-AV3Δ134-231) (Abb. 26).

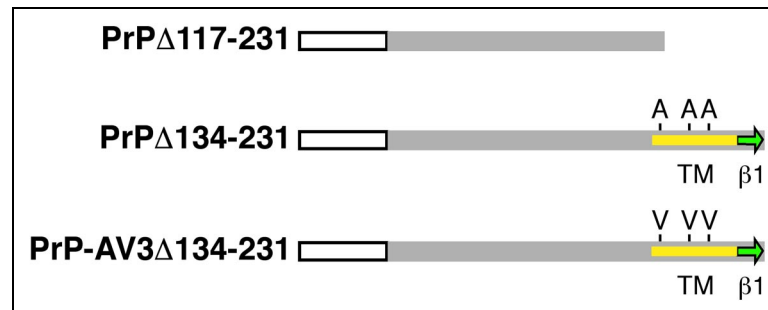


Abbildung 26. Schematische Darstellung der N-terminalen PrP-Konstrukte. Alle Proteine enthalten die erweiterte Signalsequenz von Gas1p (weiße Box) und PrP bis zur Aminosäure 116 (PrPΔ117-231) oder 133 (PrPΔ134-231, PrP-AV3Δ134-231). PrP-AV3Δ134-231 trägt 3 Alanin→Valin-Mutationen an den Positionen 112, 114 und 117 der potenziellen Transmembrandomäne (gelbe Box). β-Faltblatt: grüner Pfeil.

In *pulse/chase*-Experimenten wurde die Stabilität dieser Proteine in Hefezellen ermittelt. Dazu wurden die Proteine 15 Minuten metabolisch mit radioaktivem ^{35}S -Methionin und -Cystein markiert (*pulse*). Die Markierung wurde durch die Zugabe eines Überschusses an unmarkierten Aminosäuren gestoppt (*chase*), sodass neu synthetisierte Proteine nicht mehr radioaktiv markiert wurden. PrP wurde zu den Zeitpunkten 0, 30 und 90 Minuten der *chase*-Periode durch Immunpräzipitation mit dem monoklonalen Antikörper 3F4 isoliert, in einem SDS-Gel aufgetrennt und mittels *Phosphoimaging* quantifiziert.

Die Analysen zeigten, dass PrPΔ117-231 in Wildtypzellen des Stammes RSY2022 (Sec61) sehr schnell abgebaut wurde. Das während der *pulse*-Periode synthetisierte PrPΔ117-231 war nach 90 min *chase* komplett abgebaut (Abb. 27A, Sec61).

Der Nachweis, dass PrPΔ117-231 durch den ERAD-Mechanismus abgebaut wurde, erfolgte durch die Wiederholung des Versuchs mit den ERAD-defizienten Stämmen RSY2027 (sec61) und Y0150 (Δubc1). Der Hefestamm RSY2027 trägt eine Mutation im Protein Sec61p, der Hauptkomponente der zentralen Importpore. Diese Mutation erlaubt zwar den Import von Proteinen in das ER, verhindert aber deren retrograden

Transport vom ER in das Cytosol und somit die Degradation durch das 26S-Proteasom. Substrate, die normalerweise durch den ERAD-Mechanismus abgebaut werden, akkumulieren im ER (Zhou und Schekman, 1999). Der Stamm Y0150 ist durch die Deletion des Gens UBC1 in der ERAD eingeschränkt. Ubc1p ist eines der Ubiquitin-konjugierenden Enzyme, die an der ERAD-spezifischen Ubiquitinierung zum Abbau bestimmter Proteine beteiligt sind (Seufert *et al.*, 1990).

Es zeigte sich, dass PrP Δ 117-231 in ERAD-defizienten Stämmen wesentlich stabiler war als im korrespondierenden Wildtypstamm. Im Stamm RSY2027 waren nach 90 min *chase* noch 50% des initialen PrP Δ 117-231 vorhanden. Im Stamm Y0150 waren noch 15% des PrP Δ 117-231 erhalten (Abb. 27A, *sec61*/ Δ *ubc1*).

Im Gegensatz zu PrP Δ 117-231 war PrP Δ 134-231 sowohl im ERAD-defizienten Stamm als auch im Wildtypstamm stabilisiert (Abb. 27B, *Sec61/sec61*). PrP- Δ V3 Δ 134-231 hat in beiden Stämmen eine längere Halbwertszeit als PrP Δ 134-231 (Abb. 27C, *Sec61/sec61*).

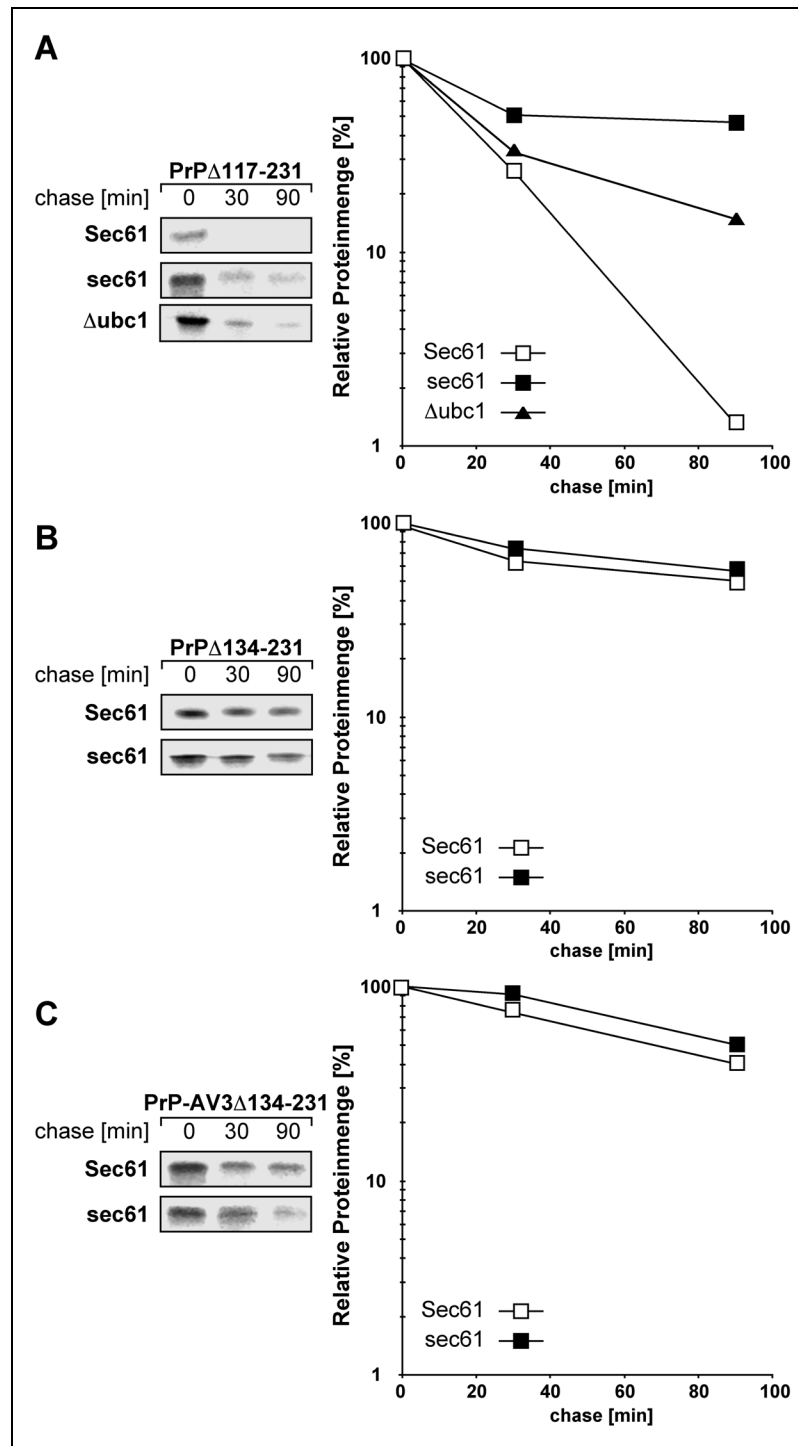


Abbildung 27. Die potenzielle Transmembrandomäne vermindert die ER-assoziierte Degradation des PrP-N-Terminus. In ERAD-kompetenten (Sec61) oder -defizienten (sec61, Δ ubc1) Zellen wurden der PrP-N-Terminus (PrP Δ 117-231, A), der PrP-N-Terminus mit der potenziellen Transmembrandomäne (PrP Δ 134-231, B) oder der PrP-N-Terminus mit der potenziellen Transmembrandomäne und AV3-Mutation (PrP-AV3 Δ 134-231, C) exprimiert. Die Zellen wurden metabolisch mit 35 S-markiertem Methionin markiert und der Abbau der PrP-Fragmente wurde durch *chase*-Perioden mit nachfolgender Immunpräzipitation verfolgt. Die Proben wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mittels Phosphoimaging visualisiert (links). Eine Quantifizierung der Banden erfolgte mit dem Programm AIDA (rechts). Dabei wurden die zum Beginn der *chase*-Periode erhaltenen Intensitäten als 100% gesetzt.

3.10.3. ERAD-Defizienz erhöht die Membranassoziation des PrP-N-Terminus

Um zu untersuchen, ob der PrP-N-Terminus durch die Transmembrandomäne in Membranen integriert und ob dieser Effekt durch eine ERAD-Defizienz gesteigert wird, wurde eine Membranextraktion durchgeführt (Fujiki *et al.*, 1982). Die alkalische Membranextraktion trennt integrale Membranproteine von peripheren und löslichen Proteinen. Dazu wurden von PrP Δ 117-231- oder PrP-AV3 Δ 134-231-exprimierenden Zellen Mikrosomen isoliert und einer alkalischen Extraktion unterzogen. 75% des PrP Δ 117-231 befanden sich dabei in der löslichen Fraktion, wenn die Mikrosomen aus Wildtypzellen isoliert wurden (Abb. 28A, Sec61). Der lösliche Anteil sank auf ca. 70% in Mikrosomenpräparationen aus dem ERAD-defizienten Stamm RSY2027 (Abb. 28A, sec61). Der lösliche Anteil von PrP-AV3 Δ 134-231 beträgt dagegen schon im Wildtypstamm nur 45%, d.h. 55% sind in Membranen integriert (Abb. 28B, Sec61). Wurde PrP-AV3 Δ 134-231 im ERAD-defizienten Stamm exprimiert, so waren sogar 90% des Proteins membranassoziiert (Abb. 28B, sec61).

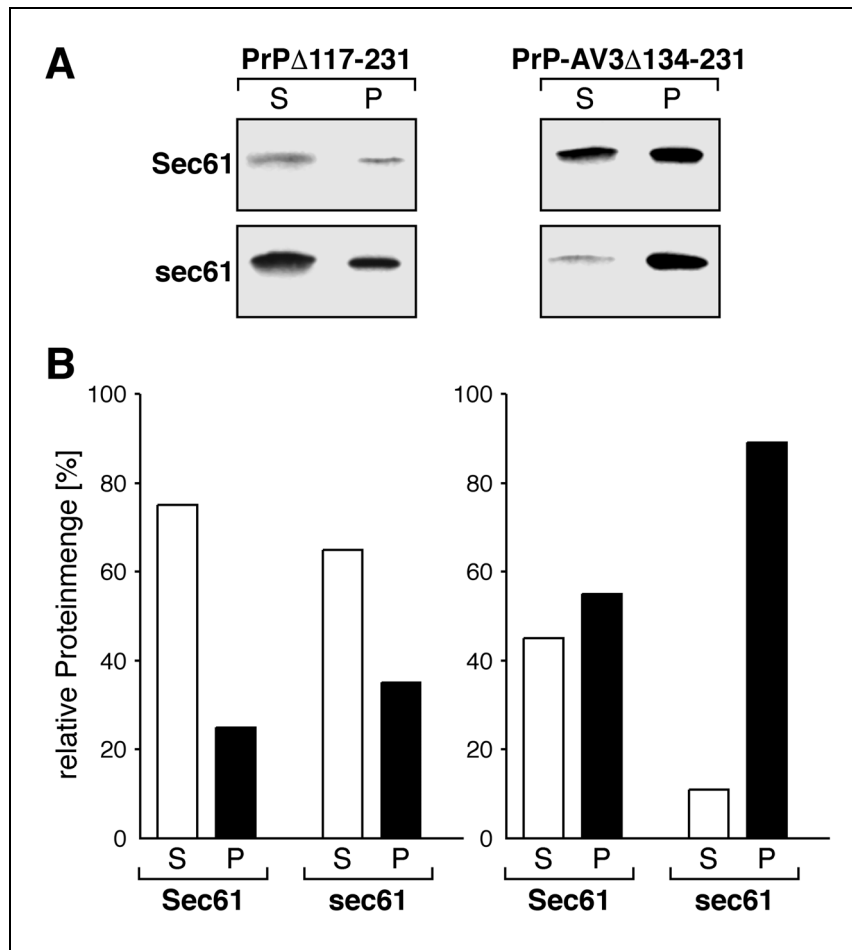


Abbildung 28. Die Transmembrandomäne verankert den PrP-N-Terminus in der Membran. Diese Verankerung wird durch eine ERAD-Defizienz gesteigert. PrP Δ 117-231 (A) oder PrP-AV3 Δ 134-231 (B) wurde in Wildtypzellen (Sec61) oder ERAD-defizienten Zellen (sec61) exprimiert. Die Zellen wurden lysiert und Mikrosomen wurden gereinigt. Die Mikrosomen wurden einer alkalischen Extraktion unterzogen. Lösliche (S) und membranassozierte (P) Fraktionen wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt. PrP wurde durch Immunoblot mit dem Antikörper 3F4 visualisiert (links). Die Quantifizierung (rechts) wurde nach dem Scannen der Blots mit dem Programm AIDA durchgeführt.

3.10.4. Der PrP-N-Terminus wird in Neuroblastomzellen durch ERAD abgebaut

Ist der Abbau von PrP oder PrP-Fragmenten durch den ERAD-Mechanismus nur auf Hefezellen beschränkt oder ist PrP auch in Säugerzellen ein ERAD-Substrat? Um die Übertragbarkeit der mit Hefe durchgeführten Experimente auf Säugerzellen zu untersuchen, wurde die Halbwertszeit von N-terminalen PrP-Fragmenten in murinen Neuroblastomzellen analysiert. Dazu wurden in N2a-Zellen N-terminale PrP-Mutanten transient exprimiert, deren Deletionen analog zu den in der Hefe

untersuchten Mutanten PrP Δ 117-231 und PrP Δ 134-231 waren. Da keine ERAD-defizienten N2a-Zellen vorliegen, wurde das 26S-Proteasom mit MG132 chemisch inhibiert (Tsubuki *et al.*, 1993). Auch in N2a-Zellen wurde die Stabilität der PrP-Fragmente mittels *pulse/chase*-Experimenten untersucht. Die Proteine wurden dazu 30 min metabolisch mit radioaktivem Methionin/Cystein markiert. Die *chase*-Periode wurde durch einen Mediumwechsel mit unmarkierten Aminosäuren eingeleitet. Die Zellen wurden dann mit oder ohne MG132 eine weitere Stunde inkubiert.

Der Vergleich der in Anwesenheit des Proteasom-Inhibitors inkubierten Proben (Abb. 29, +chase, +MG132) zeigte, dass das initial vorhandene mPrP Δ 115-231 und mPrP Δ 134-231 durch MG132 stabilisiert wurden, während sie ohne MG132 vollständig abgebaut wurden (Abb. 29, +chase, -MG132). Dagegen wurde mPrP Δ 146-231 auch ohne die Zugabe von MG132 zumindest teilweise stabilisiert (Abb. 29, +chase, -MG132).

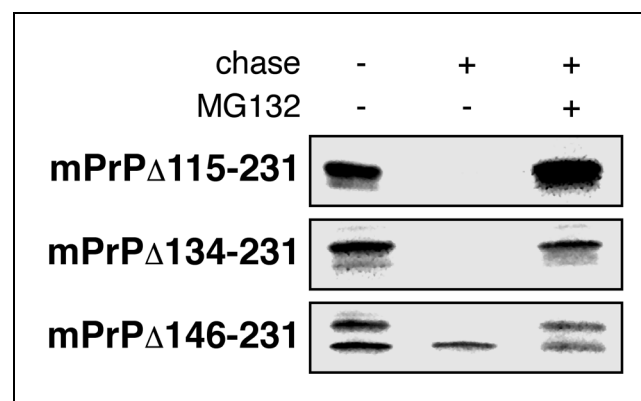


Abbildung 29. Der PrP-N-Terminus wird in N2a-Zellen durch ERAD abgebaut. In N2a-Zellen wurden N-terminale PrP-Fragmente bis zu den Aminosäuren 114, 133 oder 145 (mPrP Δ 115-231, mPrP Δ 134-231, mPrP Δ 146-231) exprimiert. Die Zellen wurden 30 min mit radioaktivem Methionin/Cystein markiert (-chase, -MG132). In zwei weiteren Ansätzen wurde der Abbau der Fragmente durch eine einstündige *chase*-Periode (+chase) ohne (-MG132) oder mit Proteasom-Inhibitor (+MG132) verfolgt. Die Zellen wurden lysiert und PrP-Fragmente wurden mit dem Antikörper 3F4 immunpräzipitiert. Die Signale wurden nach einer SDS-PAGE durch ein Autoradiogramm visualisiert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der PrP-N-Terminus auch in Säugerzellen durch ERAD abgebaut wurde. Im Gegensatz zur Hefe war für eine Stabilisierung des PrP-N-Terminus in N2a-Zellen die Verlängerung des Proteins um die Transmembrandomäne

(mPrP Δ 134-231) nicht ausreichend. Erst eine Verlängerung um weitere 12 Aminosäuren führte zu einer Stabilisierung (mPrP Δ 146-231).

3.10.5. In ERAD-defizienten Zellen ist der Wachstumsdefekt verstärkt

Wie in den vorangegangenen Experimenten gezeigt wurde, führte die ERAD-Defizienz von Hefezellen zu einer längeren Halbwertszeit des PrP-N-Terminus. PrP-Konstrukte mit Transmembrandomäne wurden in ERAD-defizienten Stämmen noch langsamer abgebaut als in Wildtypzellen. Um zu untersuchen, ob die Verlängerung der Halbwertszeit von PrP zu einer Verstärkung des Wachstumsdefekts führt, wurde das Wachstum von PrP exprimierenden ERAD-kompetenten und -defizienten Zellen verglichen.

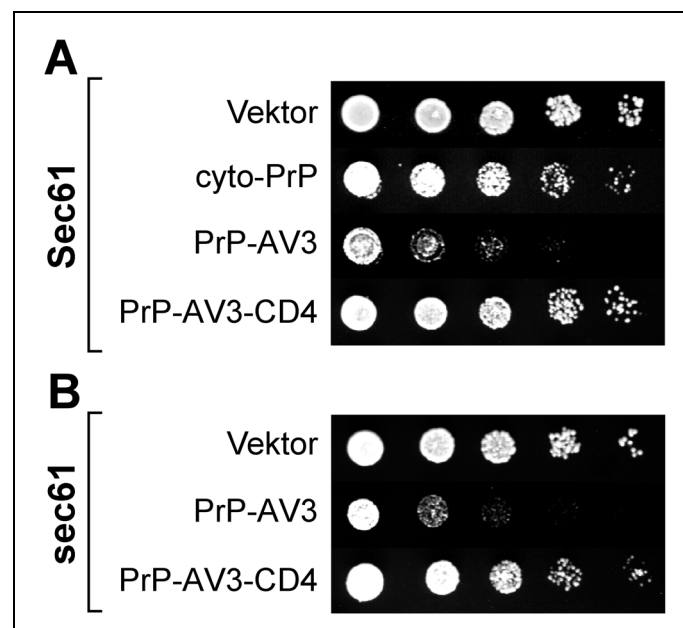


Abbildung 30. ERAD-Defizienz führt zu einer Verstärkung des PrP-vermittelten Wachstumsdefektes. **A** Im Stamm mit funktioneller ERAD (Sec61) bilden PrP-AV3 exprimierende Zellen einen Wachstumsdefekt aus. Der C-terminale CD4-Anker (PrP-AV3-CD4) oder eine cytosolische Lokalisation (cyto-PrP) unterdrücken diesen Effekt. **B** Im ERAD-defizienten Stamm (sec61) ist der Wachstumsdefekt verstärkt (PrP-AV3). Das Wachstum der Zellen wurde wie in Abb. 24 beschrieben untersucht.

Hier zeigte sich, dass die Expression von PrP-AV3 im Stamm RSY2027 zu einem noch schlechteren Wachstum führte, als dies im Wildtypstamm RSY2022 der Fall war (Abb. 30).

3.11. Intrazelluläre Lokalisation und Wachstumsdefekt

Die in den vorangegangenen Abschnitten dargestellten Ergebnisse (Abb. 24 und 30) zeigten, dass eine Membranverankerung des PrP-AV3 mittels CD4-Anker (PrP-AV3-CD4) ein dem Wildtyp entsprechendes Wachstum erlaubt. Wodurch könnte es begründet sein, dass der CD4-Anker die wachstumshemmende Wirkung des PrP-AV3 aufhebt? Die Möglichkeit, dass eine effektive Membranverankerung einen anterograden Transport, d.h. die Weiterleitung des Proteins vom ER in den Golgi-Apparat oder die Vakuole, erlaubt, wurde durch eine Renografin-Dichtegradientenzentrifugation untersucht. Wie bereits erwähnt, werden dabei Membranen und Vesikel der unterschiedlichen Zellkompartimente voneinander getrennt.

In den Gradienten befand sich nur wenig PrP Δ GPI in den Fraktionen 1 bis 6 der vakuolären Membranen. PrP-AV3, welches einen noch stärkeren Wachstumsdefekt verursachte, war in diesen Fraktionen überhaupt nicht vorhanden (Abb. 31).

Im Gegensatz dazu wurden PrP Δ 28-156 und PrP-AV3-CD4, deren Expression keinen Wachstumsdefekt verursachte, effizient in das vakuoläre Kompartiment transportiert. Als vakuolärer Marker wurde die Verteilung der V-ATPase (Kane *et al.*, 1992) bestimmt (Abb. 31).

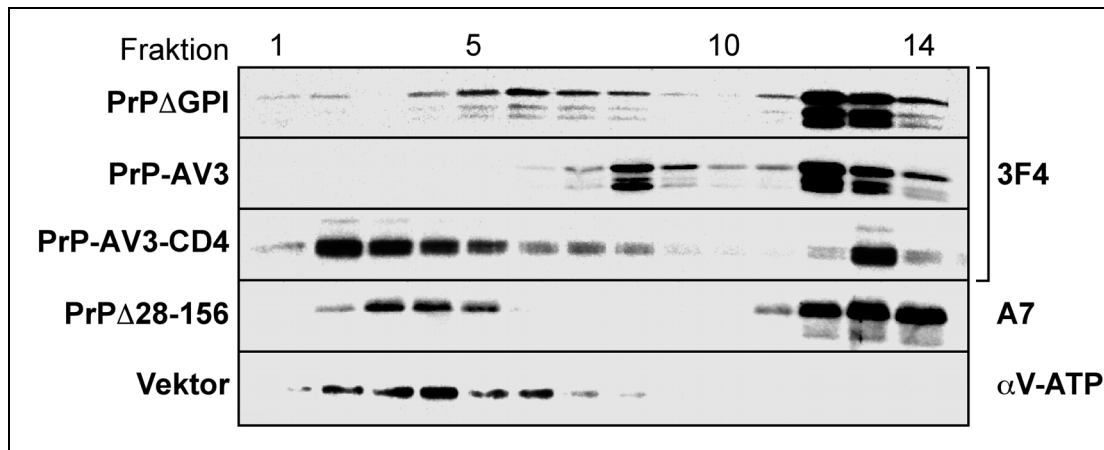


Abbildung 31. Intrazelluläre Lokalisation verschiedener PrP-Mutanten. Membranvesikel von Zellen, die die links angegebenen Proteine exprimieren oder den leeren Vektor enthalten, wurden in einem Renografin-Dichtegradienten aufgetrennt (siehe Abb. 12). Die Proteine wurden nach einer SDS-PAGE mit den rechts angegebenen Antikörpern/Antiserum nachgewiesen.

Obwohl alle in Abb. 31 dargestellten PrP-Konstrukte die ER-Signalsequenz des Hefeproteins Gas1p tragen, befanden sich beträchtliche Proteinmengen in den cytosolischen Fraktionen 12-14. Trotzdem war das PrP dieser Fraktionen glykosyliert (PrP Δ 28-156) oder die ER-Signalsequenz wurde prozessiert (PrP Δ GPI, PrP-AV3), was darauf hindeutet, dass diese Proteine während der Zellyse teilweise aus den Membranvesikeln entfernt wurden.

Diese Ergebnisse haben gezeigt, dass PrP in Hefezellen einen Wachstumsdefekt verursacht, wenn es hauptsächlich im ER verbleibt. Die Deletion der potenziellen Transmembrandomäne oder die Membranverankerung mittels CD4-Anker führt dagegen dazu, dass PrP aus dem ER entfernt werden kann und kein Wachstumsdefekt ausgebildet wird.

Zusammenfassend haben die vorangegangenen Experimente gezeigt, dass die potenzielle Transmembrandomäne von PrP Δ GPI sowohl mit dem retrograden Transport in das Cytosol und der ERAD als auch mit dem anterograden Export aus dem ER von Hefezellen interferiert. Die hauptsächliche ER-Lokalisation von PrP in *S. cerevisiae* korreliert mit einem Wachstumsdefekt. Entgegen den Erwartungen löst missgefaltetes PrP im Hefe-ER keine UPR aus.

4. Diskussion

Das Prion Protein (PrP) ist ein hoch konserviertes, GPI-verankertes Glykoprotein der Zelloberfläche, das hauptsächlich in Nervenzellen exprimiert wird. Neben der zellulären Form (PrP^C) mit einem hohen Anteil α -helikaler Struktur existiert eine missgefaltete Form (PrP^{Sc}), die einen hohen β -Faltblatt-Anteil aufweist, schwer löslich und proteaseresistent ist. PrP^{Sc} ist der Hauptbestandteil infektiöser Partikel (Prionen), die Transmissible Spongiforme Encephalopathien (TSEs) wie die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, Kuru, Scrapie oder BSE auslösen. TSEs manifestieren sich neben der Ablagerung von Prionen im Gehirn durch eine progressive Degeneration von Nervenzellen. Der Mechanismus dieser Neurodegeneration ist bis heute unbekannt. Weiterhin ist es trotz intensiver Bemühungen bislang nicht gelungen, PrP eine eindeutige Funktion zuzuweisen.

Um neue Einblicke in die Biogenese von PrP, dessen krankheitsassoziierte Mutanten und den Mechanismus der PrP-vermittelten Zelldegeneration zu gewinnen, wurde in dieser Arbeit das Prion Protein der Maus in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* untersucht. Das genetische System der Hefe ist sehr gut charakterisiert und einfach zu manipulieren. Zusätzlich erlauben die zahlreich vorhandenen Deletionsmutanten oder Mutanten mit temperaturabhängigen Defekten, zelluläre Prozesse einzugrenzen und einzuordnen. Ein weiterer Vorteil des Hefe-Systems ist die Möglichkeit, sowohl nach genetischen als auch nach chemischen Suppressoren zu suchen, die einen Defekt ausgleichen können.

4.1. Die Biogenese des PrP in *S. cerevisiae*

Das PrP der Maus wird als 254 Aminosäuren langes Vorläuferprotein synthetisiert. Nach dem Import des Proteins in das Endoplasmatische Reticulum (ER) wird die 22 Aminosäuren lange ER-Signalsequenz abgespalten und die hydrophobe, 23

Aminosäuren lange C-terminale GPI-Anker-Erkennungssequenz durch einen GPI-Anker ersetzt. Die Struktur von PrP wird durch die Ausbildung einer Disulfidbrücke stabilisiert. Die im ER an zwei Asparagine angehefteten Zuckergrundgerüste werden im Golgi-Apparat zu komplex verzweigten Zuckerketten modifiziert.

Das Wildtyp-PrP der Maus (mPrP) wurde in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nur sehr schwach exprimiert. Die im *Western blot* nachgewiesene Größe des Proteins von ca. 29 kDa entspricht der des vollständigen, posttranslational nicht modifizierten Präproteins. Der Vergleich von mPrP mit mPrP Δ GPI, bei dem die GPI-Ankersequenz des mPrP deletiert wurde, zeigt, dass diese in der Hefe nicht prozessiert wird (Abb. 6, 7).

Die fehlende posttranslationale Modifikation des mPrP könnte daran liegen, dass die ER-Signalsequenz des Maus-Proteins in der Hefe nicht funktionell ist und mPrP deshalb nicht in das ER importiert wird. Für ER-Importsignale gibt es keine Konsensus-Sequenz spezifisch notwendiger Aminosäuren, die Erkennung dieses Signals durch die Importmaschinerie erfolgt durch dessen strukturelle Eigenschaften. Wird die intrazelluläre Lokalisation für mPrP mittels eines Computerprogramms abgefragt, so wird die abspaltbare ER-Signalsequenz durch das Programm „psort“ (Nakai, 2000) erkannt, und zwar auch für Hefezellen.

Um trotz dieser positiven Computerabfrage eine Inkompatibilität der Maus-Signalsequenzen in der Hefe auszuschliessen, wurden sowohl die ER-Signalsequenz als auch die GPI-Ankersequenz gegen Sequenzen des endogenen Zelloberflächenproteins Gas1p ausgetauscht (Abb. 8). Dieser Austausch zeigte allerdings keine Auswirkungen (Daten nicht dargestellt).

In der Hefe existiert kein zu PrP homologes Protein. Selbst das in Säugerzellen vorhandene Protein Doppel hat eine nur 30%ige Homologie zu PrP, wobei der unstrukturierte N-Terminus fehlt (Moore *et al.*, 1999). Wird nur der N-Terminus des PrP in die Suche nach homologen Proteinen einbezogen, bleibt sie ergebnislos. Hat

diese Einzigartigkeit des PrP-N-Terminus einen Einfluss auf den ER-Import in der Hefe?

In einer Datenbankrecherche wurden Proteine der Maus und der Hefe *S. cerevisiae* identifiziert, die eine abspaltbare ER-Signalsequenz besitzen. Von diesen Proteinen wurden die fünf Aminosäuren verglichen, die der Signalsequenz folgen. Es stellte sich heraus, dass die untersuchten Proteine in diesem Bereich durchschnittlich eine Ladung von -0,75 aufwiesen. Im Gegensatz dazu haben die ersten fünf Aminosäuren des reifen PrP eine Nettoladung von +4 (Tab. 3).

Der Austausch der positiv geladenen Aminosäuren des PrP gegen Sequenzen des Gas1p (Abb. 9) führte dazu, dass PrP in der Hefe effizient exprimiert werden kann (Abb. 10). Der Vergleich der Eigenschaften von *full-length*(fl)-PrP, PrP Δ GPI und cyto-PrP zeigt, dass die erweiterte ER-Signalsequenz prozessiert wird: cyto-PrP ist ca. 2 kDa kleiner als PrP Δ GPI, was der Größe der abgespaltenen ER-Signalsequenz entspricht. Weiterhin treten von fl-PrP glykosylierte Anteile auf, wie ein Verdau mit EndoH zeigt (Abb. 10). Durch die Entfernung der Zuckerketten von fl-PrP wird eine Bande verstärkt sichtbar, die der Größe des reifen PrP (AS 23-231) entspricht. Dies weist darauf hin, dass bei einem geringen Anteil des fl-PrP die GPI-Ankersequenz prozessiert wurde.

Der geringe Anteil an GPI-verankertem fl-PrP in der Hefe wirft die Frage auf, warum die endogene GPI-Ankersequenz so ineffizient prozessiert wird. Eine Möglichkeit wäre, dass die zweifelsohne vorhandene Prozessierungsmaschinerie noch weitere strukturelle Voraussetzungen des Zielproteins voraussetzt, die nicht in der GPI-Ankersequenz liegen. Ein weiterer Grund, warum die an PrP fusionierte Gas1p-GPI-Ankersequenz nicht funktionell ist, wäre, dass sie durch eine sehr schnelle (Miss)faltung des PrP nicht mehr zugänglich ist. Einen Hinweis darauf gibt der hohe unlösliche Anteil an fl-PrP, der mehr als 50% der PrP-Menge ausmacht und posttranslational nicht modifiziert wurde. Weiterhin wurde in einer *in vitro*-Studie nachgewiesen, dass PrP von den bis jetzt untersuchten Proteinen das am schnellsten faltende ist. Diese schnelle Faltung erfolgt ohne nachweisbare Intermediate

(Wildegger *et al.*, 1999). Ein sehr schneller Übergang des fl-PrP vom ungefalteten in den aggregierten Zustand könnte das die Faltung unterstützende Eingreifen molekularer Chaperone verhindern: Neben den spontan faltenden gibt es viele Proteine, die für die Einnahme ihrer korrekten tertiären Struktur der essentiellen Hilfe von Chaperonen bedürfen (Ellis, 1990; Hartl, 1996; Johnson und Craig, 1997).

Zur Unterstützung der Faltung von Proteinen unter normalen Wachstumsbedingungen, vor allem aber nach Stresszuständen wie Hitze- oder Kälteschock, osmotischem Schock oder Dehydrierung, existieren in allen Zellen Hilfsproteine, die molekulare Chaperone oder Hitzeschockproteine (Hsp). Die Unterschiede zwischen Säuger- und Hefezellen bezüglich der Ausstattung und Bindungsspezifität der molekularen Chaperone könnten für die Fehlfaltung von PrP in der Hefe verantwortlich sein. Das ER von Säugerzellen verfügt mit Calnexin, Calreticulin, der Protein-Disulfid-Isomerase (PDI), dem Hsp70-Homolog BiP und dem Hsp90-Homolog Grp94 über eine reichhaltige Ausstattung an Chaperonen. Für alle diese Proteine wurde eine transiente Bindung an PrP kurz nach dem Import in das ER nachgewiesen, was eine aktive Rolle dieser Chaperone für die PrP-Faltung nahelegt. Während die Interaktionen mit Chaperonen für Wildtyp-PrP kurze Zeit nach dem Import nicht mehr nachweisbar sind, bleiben faltungsinkompetente Mutanten mit Calnexin und Grp94 assoziiert (Capellari *et al.*, 1999). Das Calnexin-Homolog Cne1p aus *S. cerevisiae* hat eine ca. 30%ige Sequenzhomologie zum menschlichen Calnexin (de Virgilio *et al.*, 1993; Parlati *et al.*, 1995). Obwohl Calnexin *in vitro* auch unglykosylierte Proteine vor Aggregation schützen kann, entfaltet es seine volle Aktivität erst bei der Bindung von Glykoproteinen (Stronge *et al.*, 2001). Daher kann es zur Faltung des nur schwach glykosylierten fl-PrP bzw. des unglykosylierten PrP Δ GPI wahrscheinlich keinen Beitrag leisten. Die Wirkung von Grp94 könnte darin liegen, PrP nach dem Import in Lösung zu halten, bis posttranslationale Modifikationen wie die Glykosylierung und die Ausbildung der Disulfidbrücke stattgefunden haben. Das Fehlen eines Hsp90-Homologs im ER der Hefe (Argon und Simen, 1999) könnte ein Grund dafür sein, dass PrP aggregiert und nachfolgend nicht

glykosyliert und korrekt gefaltet werden kann. Im Gegensatz zu Hsp90 verfügt das Hefe-ER über das hoch konservierte Hsp70-Homolog Kar2p, dessen Deletion lethal ist (Normington *et al.*, 1989; Rose *et al.*, 1989). Kar2p besteht wie alle Hsp70-Chaperone aus einer N-terminalen ATPase-Domäne und einer C-terminalen Substratbindungsdomäne (McKay, 1993). Als generelles Chaperon des ER zeigt Kar2p keine Sequenzspezifität, sondern bindet vorzugsweise exponierte hydrophobe Heptapeptidsequenzen (Blond-Elguindi *et al.*, 1993). Dies geschieht jedoch nicht mit allen erkennbaren Bindungsmotiven, sondern nur mit solchen, die während des Faltungsvorgangs ihre finale Position in der Struktur relativ spät einnehmen (Gething *et al.*, 1995). Generell bindet Kar2p eher Proteine mit einer langsamen Faltung (Hellman *et al.*, 1999). Wie bereits oben erwähnt, gehört PrP zu den am schnellsten faltenden Proteinen. Diese schnelle Faltung könnte eine Bindung von Kar2p an fl-PrP oder PrP Δ GPI verhindern und so zur Aggregation der Proteine führen.

Kar2p spielt neben der Faltung von ER-Proteinen auch eine wichtige Rolle beim Import. Für die Funktion von Kar2p beim Import von Proteinen in das ER existieren zwei Modelle, die sich allerdings nicht gegenseitig ausschliessen: Das *molecular ratchet*-Modell schlägt vor, dass Kar2p an exponierte Stellen des Importproteins bindet und so ein Zurückgleiten des Proteins in das Cytosol verhindert (Simon *et al.*, 1992; Schneider *et al.*, 1994; Matlack *et al.*, 1999). Im *molecular motor*-Modell übt Kar2p zusammen mit der Sec63p-Untereinheit der Translokationspore durch eine Konformationsänderung eine aktive Zugkraft auf das zu importierende Protein aus (Glick, 1995). Hinsichtlich des Imports von fl-PrP bzw. PrP Δ GPI in das Hefe-ER spielt die Signalsequenz des Gas1p, über die beide Proteine verfügen, eine Rolle. Nach dem Hydrophobizitätsmodell (Ng *et al.*, 1996) leitet diese Sequenz einen posttranslationalen Import in das ER ein. Dies könnte dazu führen, dass PrP schon im Cytosol eine kompakte Form einnimmt oder mit anderen Proteinen interagiert, was den Import in das ER stören könnte. Eine weitere Funktion von Kar2p während des Imports liegt darin, das neu synthetisierte Protein solange in Lösung zu halten, bis alle für die Faltung des Proteins oder einer Protein-Domäne wichtigen Regionen

importiert sind (Craig *et al.*, 1993). Eine unzureichende Bindung von Kar2p an fl-PrP oder PrP Δ GPI während des Imports könnte zur schnellen Aggregation von PrP in *S. cerevisiae* beitragen.

Im Cytosol lokalisiertes PrP (cyto-PrP) kann wegen der vorherrschenden reduzierenden Bedingungen nicht gefaltet werden, da die Disulfidbrücke nicht gebildet werden kann. Auch *in vitro* wird PrP vom Chaperonin GroEL nicht gefaltet (Stöckel und Hartl, 2001). GroEL gehört zu den Chaperonen der Hsp60-Klasse (Chaperonine), die zylindrische Strukturen aus zwei heptameren Ringen bilden, ungefaltete Proteine binden und unter ATP-Verbrauch falten können. Chaperonine finden sich im Cytosol von Bakterien (GroEL), Eukaryoten (TRiC) sowie in Mitochondrien (Hsp60), aber nicht im ER, sodass sie für die Faltung von PrP nicht in Betracht kommen.

PrP mit deletiertem GPI-Anker (PrP Δ GPI) liegt in Hefezellen als unglykosyliertes und unlösliches Aggregat vor (Abb. 10). Diese Eigenschaft von PrP Δ GPI zeigt sich nicht nur in *S. cerevisiae*, sondern auch in Säugerzellen. In murinen Neuroblastomzellen (N2a-Zellen) exprimiertes PrP Δ GPI ist ebenfalls unlöslich und nicht glykosyliert (Rogers *et al.*, 1993; Kocisko *et al.*, 1994; Walmsley *et al.*, 2001).

Die Unlöslichkeit von PrP in milden Detergenzien wie Triton X-100 und Desoxycholat ist eine Eigenschaft von PrP^{Sc}. Um PrP Δ GPI auf ein weiteres Merkmal von PrP^{Sc}, die limitierte Resistenz gegenüber der Proteinase K (PK), zu untersuchen wurde ein PK-Verdau durchgeführt. Hier zeigte sich, dass durch die PK-Behandlung Fragmente von PrP Δ GPI entstehen (Abb. 11). Die Definition der PK-Resistenz variiert in unterschiedlichen Studien. Während der PK-Verdau bei der Aufreinigung von PrP^{Sc} aus Scrapie-infizierten Hamstern mit 50 μ g/ml PK für eine Stunde bei 37°C durchgeführt wurde (Pan *et al.*, 1993), definieren andere Forscher eine PK-Resistenz nach einem Verdau mit 20 μ g/ml PK, 1h, 37°C (Stöckel und Hartl, 2001), 5 μ g/ml PK, 30 min, 37°C (Ma und Lindquist, 1999) oder 3,3 μ g/ml PK, 1-5 min, 37°C

(Zanusso *et al.*, 1999). Die in dieser Arbeit festgestellte Resistenz von PrP Δ GPI gegenüber 30 μ g/ml PK, 1h, 0°C liegt somit im Mittel der anderen Studien.

Einen weiteren Hinweis auf einen aggregierten Zustand von PrP Δ GPI ergab dessen Resistenz gegenüber endogenen Proteasen der Hefe. Eine rasche Degradation von PrP Δ GPI konnte erst festgestellt werden, wenn die Aggregate mit SDS aufgelöst wurden. Durch eine Zerstörung potenziell schützender Membranen durch die Zugabe von nichtionischen Detergenzien konnte die Degradation von PrP Δ GPI nicht beschleunigt werden (Abb. 12).

Eine Auflösung von Proteinaggregaten durch Chaperone ist in verschiedenen Studien nachgewiesen worden. Die kombinierte Wirkung von Hsp70 und dem nur in der Hefe nachgewiesenen Hsp104 führte zur Disaggregation von hitzeinduzierten Aggregaten und von amyloiden [PSI⁺]-assoziierten Sup35-, „Prionen“ und von PrP (Schirmer und Lindquist, 1997; Newnam *et al.*, 1999). Die hohe Stabilität (Daten nicht gezeigt) und Unlöslichkeit von cyto-PrP (Abb. 10) legen nahe, dass diese Disaggregation bei cyto-PrP nicht stattfindet. Da Hsp104 kein ER-Homolog besitzt, kommt dieser Mechanismus zur Auflösung ER-residenter Aggregate nicht in Betracht.

4.2. PrP-Missfaltung im ER verursacht einen Wachstumsdefekt

Da die GPI-Anker-Prozessierung von fl-PrP sehr ineffizient war, wurden weitere Versuche zur Faltung von PrP in *S. cerevisiae* mit PrP Δ GPI durchgeführt. Hierbei war von besonderem Interesse, welche Regionen des PrP die Faltung in der Hefe behindern.

Durch die Expression sowohl von PrP Δ GPI als auch von fl-PrP wurde das Wachstum der Hefezellen erheblich beeinträchtigt (Abb. 14). Dieser Wachstumsdefekt ist reversibel; sobald die Expression unterbunden wird, stellt sich das normale Wachstum wieder ein (Abb. 16). Die Reversibilität des Wachstumsdefektes zeigt, dass die Hefezellen nach einer PrP-Expression nicht dauerhaft verändert werden. Ein Beispiel für eine solche Änderung ist der Phänotyp [PSI⁺], der durch eine Überexpression des

Proteins Sup35p ausgelöst werden kann und auch dann erhalten bleibt, wenn die Überexpression eingestellt wird (Chernoff *et al.*, 1993).

Als erstes konnte festgestellt werden, dass die Aggregation von PrP allein nicht für den Wachstumsdefekt verantwortlich war. So ist auch im Cytosol exprimiertes PrP (cyto-PrP) extrem unlöslich (Abb. 10) und PK-resistent (Daten nicht dargestellt), Eigenschaften, die schon früher beschrieben wurden (Ma und Lindquist, 1999). Die cyto-PrP-Aggregate haben aber keinen negativen Einfluss auf das Wachstum der Hefezellen (Abb. 14).

Ein erstes Paar von Deletionsmutanten zeigte, dass ein dem PK-resistenten C-terminalen Fragment von PrP^{Sc} und PrP Δ GPI entsprechendes Konstrukt (PrP Δ 28-89) den selben Wachstumsdefekt verursachte wie PrP Δ GPI, während die Löslichkeit leicht erhöht wurde. Die Expression eines N-terminalen Konstruktes, von dem sämtliche strukturellen Merkmale (Riek *et al.*, 1996; James *et al.*, 1997; Riek *et al.*, 1997; Donne *et al.*, 1997) deletiert wurden (PrP Δ 117-231), verursachte dagegen keinen Wachstumsdefekt (Abb. 17). Ausgehend von PrP Δ 28-89 wurde der deletierte Bereich von PrP zum C-Terminus hin ausgeweitet, um schrittweise Elemente der Tertiärstruktur zu entfernen. Durch diese Deletionsmutanten konnte festgestellt werden, dass die potenzielle Transmembrandomäne (AS 113-133) die Faltung von PrP beeinflusst: Wird die potenzielle Transmembrandomäne deletiert (PrP Δ TM), kann glykosyliertes und lösliches PrP Δ TM nachgewiesen werden. Dies wird besonders deutlich, wenn auch der unstrukturierte N-Terminus deletiert wird. So führt die Deletion der AS 28-140 zu einem deutlich erhöhten Anteil an löslichem und glykosyliertem PrP Δ 28-140. Die zusätzliche Deletion der ersten α -Helix (PrP Δ 28-156) und des ersten β -Faltblattes (PrP Δ 28-165) führen dazu, dass sämtliches PrP löslich und glykosyliert ist (Abb. 18, 20).

Der Einfluss der potenziellen Transmembrandomäne auf die Faltung von PrP ist nicht nur in *S. cerevisiae*, sondern auch in Neuroblastomzellen zu beobachten. Auch in diesen Zellen führt die Deletion der potenziellen Transmembrandomäne zu einer

Wiederherstellung der Faltung von PrP Δ TM, d.h. der Glykosylierung und der Löslichkeit (Heller *et al.*, 2002).

Wie die potenzielle Transmembrandomäne die Faltung von PrP beeinflusst, ergibt sich nicht direkt aus der NMR-Struktur, da sie bis auf das erste β -Faltblatt Teil des unstrukturierten N-Terminus von PrP ist. Einen Einfluss dieser Region auf die Stabilität des strukturierten PrP-C-Terminus haben bisherige Studien nicht gezeigt (Donne *et al.*, 1997; Riek *et al.*, 1996; Riek *et al.*, 1997). Für ein aus der Region der potenziellen Transmembrandomäne abgeleitetes Peptid (PrP106-126) wurde eine Aggregation *in vitro* und eine toxische Wirkung auf Kulturen primärer Neuronen gezeigt (Forloni *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1996; Haik *et al.*, 2000). In Zellkultur-Versuchen wurde gezeigt, dass synthetisch produzierte PrP-Fragmente der AS 106-126 die Aggregation von PrP^C induziert (Gu *et al.*, 2002). So könnte die Aggregationsneigung der potenziellen Transmembrandomäne die Missfaltung von PrP Δ GPI initiieren.

Die potenzielle Transmembrandomäne hat auch auf den durch die Missfaltung von PrP Δ GPI ausgelösten Wachstumsdefekt einen deutlichen Einfluss: Die Deletion der N-terminalen Aminosäuren 28-140 (PrP Δ 28-140) oder der Transmembrandomäne allein (PrP Δ TM) stellt das normale Wachstum wieder her (Abb. 21). Den gegenteiligen Effekt hat die Einführung der neuropathogenen Mutation AV3 (Hegde *et al.*, 1998a) in die Transmembrandomäne (PrP-AV3), bei der Alanin an den Positionen 112, 114 und 117 des PrP zu Valin mutiert ist. Hefezellen, die PrP-AV3 exprimieren, zeigen einen gegenüber PrP Δ GPI verstärkten Wachstumsdefekt (Abb. 20, 21). Für PrP-AV3 wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Transmembrantopologie gezeigt, bei der der C-Terminus im ER-Lumen residiert (^{Ctm}PrP). Transgene Mäuse, die diese Mutation tragen, sind nur sehr eingeschränkt lebensfähig (Hegde *et al.*, 1998a; Hegde *et al.*, 1999). In den *in vitro*-Versuchen führte die AV3-Mutation zu einem ^{Ctm}PrP-Anteil von ca. 50% (Hegde *et al.*, 1998a). In *S. cerevisiae* nimmt PrP-AV3 nur zu einem geringen Teil eine Transmembrantopologie ein (Abb. 22). Ob dieser geringe Anteil an ^{Ctm}PrP in der Hefe

die Ursache für den Wachstumsdefekt ist, bleibt offen. Die Verstärkung des PrP-vermittelten Wachstumsdefektes könnte auch darin begründet sein, dass die Aggregation von PrP durch die AV3-Mutation moduliert wird. So war der β -Faltblatt-Anteil in PrP106-126-Peptiden erhöht, wenn die Mutation A117V eingefügt wurde (Brown, 2000).

Ein genereller Defekt in der Biogenese sekretorischer Proteine als Ursache für den Wachstumsdefekt PrP-AV3-exprimierender Hefezellen ist nicht wahrscheinlich. Zwei untersuchte Proteine, die vakuoläre Carboxypeptidase Y (CPY) sowie das Plasmamembranprotein Gas1p, zeigten in PrP-AV3-exprimierenden Zellen gegenüber Wildtypzellen keine Veränderungen in Proteinmenge, Glykosylierung oder Prozessierung (Daten nicht dargestellt).

4.3. Qualitätskontrollmechanismen im ER

Wie alle eukaryotischen Organismen verfügen Hefezellen über ein mehrstufiges System der Qualitätskontrolle, durch das die korrekte Faltung von Proteinen und die Assemblierung von Proteinkomplexen überprüft wird. Zu diesen Mechanismen gehören die *Unfolded Protein Response* (UPR) und die ER-assoziierte Degradation (ERAD).

Die Ausbildung eines Wachstumsdefektes durch die Expression von fl-PrP oder PrP Δ GPI könnte darin begründet sein, dass die Qualitätskontroll-Mechanismen der Hefe in Bezug auf PrP nicht wirksam sind.

Die Missfaltung der ins ER dirigierten Konstrukte fl-PrP, PrP Δ GPI und PrP-AV3 legt eine Induktion der UPR nahe. Eine Analyse der mRNA-Menge des ER-Chaperons Kar2p zeigte, dass in PrP-AV3-exprimierenden Zellen die Menge des Transkriptes gegenüber cyto-PrP-exprimierenden Zellen nicht erhöht war (Abb. 25). Der genaue Sensor-Mechanismus, durch den eine Anhäufung missgefalteter Proteine im ER detektiert wird, ist noch nicht bekannt. Ein aktuelles Modell besagt, dass die

transmembrane Kinase/RNase Ire1p durch Kar2p in einem inaktiven, monomeren Zustand gehalten wird. Die Anhäufung missgefalteter Proteine im ER führt dann dazu, dass Kar2p diese mit höherer Affinität bindet und von Ire1p abdissoziiert. Ire1p kann daraufhin dimerisieren, was der erste Schritt der Aktivierung der UPR ist (Shamu und Walter, 1996; Liu *et al.*, 2000; Okamura *et al.*, 2000). Eine dauerhafte Aktivierung der UPR durch ER-ständiges, missgefaltetes PrP-AV3 wäre eine schöne Erklärung für den Wachstumsdefekt, da bereits gezeigt wurde, dass die konstitutive Aktivierung der UPR das Wachstum der Zellen verlangsamt (Cox und Walter, 1996). Die fehlende Induktion der UPR in PrP-AV3-exprimierenden Hefezellen ist nur dadurch zu erklären, dass der Sensormechanismus missgefaltetes PrP-AV3 nicht erkennt. Ein dominant negativer Effekt der PrP-AV3-Expression auf die UPR-Aktivierung ist nicht erkennbar, da die UPR in PrP-AV3-exprimierenden Zellen experimentell induzierbar ist (Abb. 25).

4.4. Die potenzielle Transmembrandomäne von PrP interferiert mit der ERAD

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die potenzielle Transmembrandomäne von PrP dessen retrograden Transport aus dem ER und damit die cytosolische Degradation durch das 26S-Proteasom verhindert. In *S. cerevisiae* wurde der PrP-N-Terminus ohne Transmembrandomäne (PrP Δ 117-231) so schnell degradiert, dass er in Gesamtprotein-Präparationen mittels *Western blot* nicht nachweisbar war (Daten nicht dargestellt). Erst durch eine Aufreinigung von ER-Vesikeln oder durch radioaktive Markierung mit nachfolgender Immunpräzipitation konnte PrP Δ 117-231 nachgewiesen werden (Abb. 27, 28). In *pulse/chase*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass in Wildtypzellen innerhalb von 90 min 99% des PrP Δ 117-231 degradiert werden (Abb. 27).

Die Stabilisierung von PrP Δ 117-231 in den Mutanten RSY2027 und Y0150 zeigte, dass der ERAD-Mechanismus für dessen Degradation verantwortlich ist (Abb. 27).

Der Stamm RSY2027 trägt eine Mutation im Protein Sec61p der zentralen Translokationspore der ER-Membran, die zwar den Proteinimport, nicht aber den retrograden Export erlaubt. Dies führt zur Akkumulation der zum Abbau bestimmten Proteine im ER (Zhou und Schekman, 1999). Im Stamm Y0150 wird die ERAD von Substraten durch die Deletion des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms Ubc1p verhindert (Seufert *et al.*, 1990). Die Ubiquitinierung von Proteinen ist die Voraussetzung für eine Degradation durch das 26S-Proteasom (Jentsch, 1992).

Der schnelle Abbau von PrP Δ 117-231 durch die ERAD reflektiert die fehlende tertiäre Struktur dieses PrP-Bereiches, wie es in NMR-Studien nachgewiesen wurde (Riek *et al.*, 1996; James *et al.*, 1997; Riek *et al.*, 1997; Donne *et al.*, 1997). Überraschend war dagegen, dass der PrP-N-Terminus mit Transmembrandomäne (PrP Δ 134-231) nicht nur in den ERAD-defizienten Zellen des Stammes RSY2027, sondern auch in Wildtypzellen stabilisiert wurde. Die Stabilisierung wurde durch die AV3-Mutation (PrP-AV3 Δ 134-231) verstärkt. PrP Δ 134-231 enthält außer dem ersten β -Faltblatt (Aminosäuren 131-133) ebenfalls keine strukturellen Elemente.

Durch eine alkalische Extraktion konnte gezeigt werden, dass die potenzielle Transmembrandomäne von PrP-AV3 Δ 134-231 die Membranassoziiierung gegenüber PrP Δ 117-231 erhöht. Die stärkere Stabilisierung im ERAD-defizienten Stamm RSY2027 weist darauf hin, dass PrP Δ 134-231 während des versuchten Exports in das Cytosol in die ER-Membran entlassen werden könnte.

Wichtig ist auch hier, dass die Stabilisierung von PrP-Fragmenten durch die potenzielle Transmembrandomäne auch in Säugerzellen wiederholt werden konnte. In N2a-Zellen wurden PrP Δ 117-231 und PrP Δ 134-231 innerhalb von 60 min komplett abgebaut, während von PrP Δ 146-231 nach dieser Zeitspanne noch ca. 50% präsent waren. Alle Fragmente wurden stabilisiert, wenn das 26S-Proteasom und damit die ERAD mit MG132 inhibiert wurde. Was ist die Ursache für die Stabilisierung des PrP-N-Terminus durch die potenzielle Transmembrandomäne? Erstens könnte eine Membranintegration der Fragmente dazu führen, dass der retrograde Transport vom ER in das Cytosol verlangsamt wird. Dies wird durch eine Studie unterstützt, die für

Membranproteine und luminal Proteine von *S. cerevisiae* unterschiedliche Wege der Qualitätskontrolle nachweist: Danach werden Membranproteine direkt im ER zurückgehalten (*retention pathway*), während lösliche Proteine erst den Golgi-Apparat passieren und wieder ins ER zurückgeleitet werden (*retrieval pathway*), wo beide Wege zum retrograden Transport führen (Vashist *et al.*, 2001). Eine zweite Möglichkeit der PrP-Stabilisierung könnte eine Inhibition der Ubiquitinierungs-Maschinerie oder des 26S-Proteasoms durch die potenzielle Transmembrandomäne beinhalten.

Dass nur relativ geringe Mengen an missgefaltetem PrP^C über den ERAD-Mechanismus abgebaut werden (Ma und Lindquist, 2001; Yedidia *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2000; Heller *et al.*, 2002) mag darin begündet sein, dass ein mit dem retrograden Transport verbundenes Entfalten des Proteins energetisch ungünstig ist.

Eine schnelle und komplette ERAD-vermittelte Degradation von PrP Δ 146-231 wurde in einer früheren Studie gezeigt (Zanusso *et al.*, 1999), was in einem scheinbaren Widerspruch zu dieser Arbeit steht. Dort aber wurde die Degradation der Mutante PrP-Y145stop mit der des Wildtyp-PrP verglichen, welches stabiler als PrP Δ 146-231 ist. Auch wurde mit humanen M17-Neuroblastomzellen eine andere Zelllinie benutzt, die nicht transient, sondern stabil transfiziert wurde. Eine stabile Transfektion hat möglicherweise die Selektion von Zellen zur Folge, die eine besonders starke ERAD aufweisen.

4.5. Eine Membranverankerung fördert den anterograden Transport von PrP aus dem ER und supprimiert den Wachstumsdefekt

Eine Membranverankerung von mPrP mittels GPI-Anker war in *S. cerevisiae* nicht nachweisbar (Abb. 7). Auch die endogene GPI-Ankersequenz des Gas1p führte nur zu einem geringen Anteil an GPI-verankertem fl-PrP (Abb. 10). Für Neuroblastomzellen wurde gezeigt, dass der C-terminale Membrananker des CD4-Proteins die Biogenese

des PrP unterstützt, sodass komplex glykosyliertes PrP-CD4 auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden kann (Taraboulos *et al.*, 1995).

Die Fusion von PrP-AV3 mit dem CD4-Anker (PrP-AV3-CD4) führte nicht zu einer posttranslationalen Modifikation von PrP-AV3-CD4 in *S. cerevisiae*, die der der N2a-Zellen entspräche. Zwar weist in Hefezellen exprimiertes PrP-AV3-CD4 einen löslichen und sehr schwach glykosylierten Anteil auf, der jedoch nicht über den des fl-PrP hinausgeht (Abb. 10, 22).

Im Gegensatz zu fl-PrP, PrP Δ GPI und PrP-AV3, deren Expression zu einem starken Wachstumsdefekt führte (Abb. 14, 21), zeigen mittels CD4-Anker in der Membran verankertes PrP-AV3-CD4-exprimierende Hefezellen normales Wachstum (Abb. 24). Die Anwesenheit von missgefaltetem PrP-AV3-CD4 hat also keinen nachteiligen Effekt auf das Wachstum.

Wie die Expression von cyto-PrP gezeigt hat, korrelierte die intrazelluläre Lokalisation von PrP im ER mit einem Wachstumsdefekt. Um die intrazelluläre Lokalisation von PrP in *S. cerevisiae* zu untersuchen, wurde Zellsat einer Renografin-Dichtegradientenzentrifugation unterzogen. Hierbei schwimmen Membranvesikel entsprechend ihrer spezifischen Dichte auf und befinden sich in unterschiedlichen Fraktionen. In früheren Studien wurde gezeigt, dass vakuoläre von ER- und Plasmamembranen getrennt werden, während cytosolische Proteine am Boden des Gradienten verbleiben (Schandel und Jenness, 1994; Wang und Chang, 1999).

Der Vergleich der intrazellulären Lokalisation ergab, dass PrP-AV3 hauptsächlich mit ER-Fraktionen assoziiert ist, während PrP-AV3-CD4 mit einem vakuolären Marker, der 100 kDa-Untereinheit der V-ATPase, komigriert. Eine vakuoläre Lokalisation zeigte auch PrP Δ 28-156, welches ebenfalls keinen Wachstumsdefekt verursacht (Abb. 31). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass PrP Δ GPI und PrP-AV3 hauptsächlich im ER lokalisiert sind. Dagegen erfolgte ein anterograder Export von PrP-AV3-CD4 und PrP Δ 28-156 in die Vakuole, was offensichtlich zu einem normalen Wachstum der Hefezellen führte (Abb. 32).

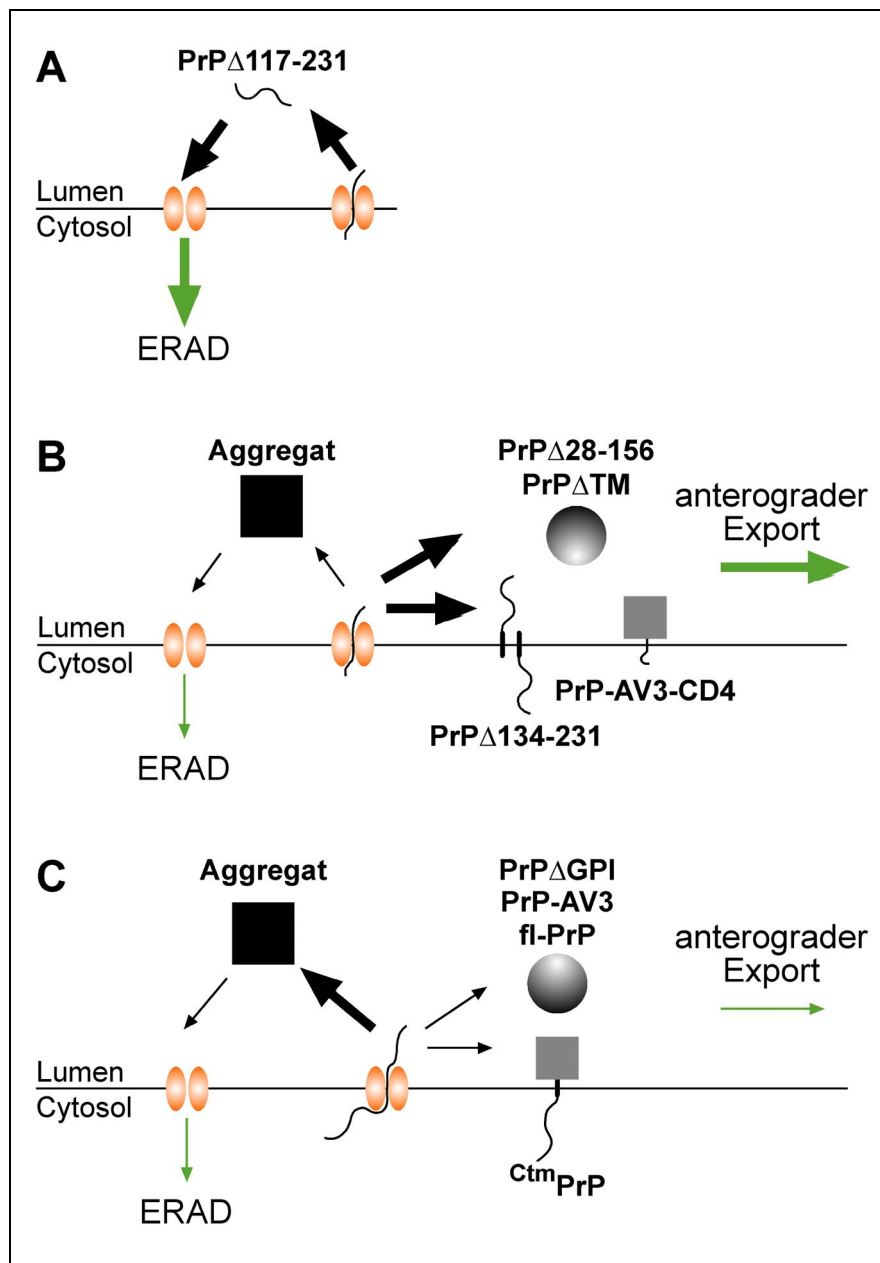


Abbildung 32. Modell des durch den fehlenden ER-Export von PrP verursachten Wachstumsdefektes. **A** Ein retrograder Export entfernt den PrP-N-Terminus ohne Transmembrandomäne ($\text{PrP}\Delta_{117-231}$) aus dem ER, wo dieser degradiert werden kann (ERAD). **B** Durch einen anterograden Export können membranverankertes PrP ($\text{PrP}\text{-AV3-CD4}$, $\text{PrP}\Delta_{134-231}$) und PrP ohne Transmembrandomäne ($\text{PrP}\Delta_{\text{TM}}$, $\text{PrP}\Delta_{28-156}$) aus dem ER entfernt werden. **C** Nicht membranverankertes PrP (fl-PrP , $\text{PrP}\Delta_{\text{GPI}}$, $\text{PrP}\text{-AV3}$) kann weder durch retrograden noch durch anterograden Export aus dem ER entfernt werden und verursacht einen Wachstumsdefekt.

Das Umleiten missgefalteter Proteine vom Golgi-Apparat in die Vakuole bzw. das Lysosom (*re-routing*) ist ein Qualitätskontrollmechanismus, der hauptsächlich für *S. cerevisiae* beschrieben wurde (Hong *et al.*, 1996; Luo und Chang, 2000). In N2a-

Zellen können durch die Zugabe von Suramin induzierte PrP-Aggregate vom Golgi-Apparat in das Lysosom transportiert und dort degradiert werden (Gilch *et al.*, 2001; Tatzelt und Winklhofer, 2001). Dieses *re-routing* scheint der in der Hefe vorherrschende Mechanismus zu sein, um gefaltete und glykosylierte PrP-Spezies wie PrP Δ 28-156 und PrP Δ TM oder missgefaltete und unglykosylierte PrP-Spezies wie PrP-AV3-CD4 zu entfernen.

Ein dritter Qualitätskontrollmechanismus konnte für N2a-Zellen nachgewiesen werden: Unabhängig von einer Membranverankerung wurde unlösliches und unglykosyliertes PrP Δ GPI nicht der lysosomalen Degradation zugeführt, sondern ins Zellkulturmedium sekretiert (Walmsley *et al.*, 2001). Dies könnte die Begründung dafür sein, dass eine transiente Expression von PrP Δ GPI in N2a-Zellen keinen messbaren Wachstumsdefekt erzeugt.

4.6. Implikationen für die Biogenese von PrP^C und die Konversion zu PrP^{Sc}

Während der Evolution hat sich ein beeindruckendes System von molekularen Chaperonen entwickelt, um die Faltung und Assemblierung neu synthetisierter sowie die Rückfaltung missgefalteter Proteine zu unterstützen (Übersicht in: Hartl, 1996; Bukau *et al.*, 2000; Ben-Zvi und Goloubinoff, 2001). Einige Qualitätskontrollmechanismen vermitteln die Degradation missgefalteter Proteine, um die Zelle vor Schäden durch Protein-Aggregate zu schützen (Übersicht in Bonifacino und Weissman, 1998; Ellgaard *et al.*, 1999; Ellgaard und Helenius, 2001). Während das ER mit Chaperonen zur Proteinfaltung ausgestattet ist, fehlt dort eine Degradationsmaschinerie. Diese Aufgabe erfüllt der ERAD-Mechanismus, der den retrograden Transport in das Cytosol und die Degradation durch das 26S-Proteasom vermittelt.

Die in dieser Arbeit und in früheren Studien (Rogers *et al.*, 1993; Kocisko *et al.*, 1994; Walmsley *et al.*, 2001) präsentierten Ergebnisse zeigen, dass PrP ohne

Membrananker nicht korrekt gefaltet wird und aggregiert. Im Gegensatz zu vielen anderen missgefalteten Proteinen wird nur ein geringer Anteil von PrP über den ERAD-Mechanismus abgebaut (Yedidia *et al.*, 2001). Stattdessen greifen in Säugerzellen zwei andere Mechanismen der Qualitätskontrolle: Membranverankertes, missgefaltetes PrP kann über den Golgi-Apparat in das Lysosom transportiert und dort degradiert werden (Gilch *et al.*, 2001), während PrP Δ GPI sekretiert werden kann. Nur einer dieser Mechanismen konnte in *S. cerevisiae* nachgewiesen werden: Das *re-routing* des membranverankerten PrP-AV3-CD4 in die Vakuole der Zelle. Dass PrP Δ GPI zwar in Säugerzellen, nicht aber in der Hefe durch einen anterograden Export aus dem ER entfernt werden kann, weist darauf hin, dass sich während der Evolution ein weiterer Mechanismus der Qualitätskontrolle herausgebildet hat, der der Entstehung neuer Proteine und den Ansprüchen und Möglichkeiten mehrzelliger Organismen entspricht. So liegt es auf der Hand, dass die Sekretion missgefalteter Proteine für Einzeller eine Verschwendung wertvoller Ressourcen darstellt.

Dass im ER verbleibendes PrP Δ GPI das Wachstum der Hefezellen beeinträchtigt, weist auf die Sensitivität des ER gegenüber missgefalteten Proteinen hin. Ein solcher Effekt wurde schon im Zusammenhang mit anderen Proteinen beschrieben. So wird die α 1-Antitrypsin-Defizienz durch eine Aggregation missgefalteten α 1-Antitrypsins im ER von Leberzellen verursacht (Carlson *et al.*, 1989; Perlmutter, 1996). Zahlreiche andere so genannte Endokrinopathien werden durch fehlerhaften Protein-Transport bzw. -Faltung verursacht, darunter Arten von Diabetes und Wachstumsstörungen (Übersicht in: Kim und Arvan, 1998).

Der Mechanismus der mit PrP^{Sc} assoziierten Neurodegeneration ist bis heute nicht geklärt. Eine durch PrP^{Sc} ausgelöste Apoptose konnte nicht nachgewiesen werden. Einige Studien zeigen einen Einfluss von PrP^{Sc} auf zelluläre Prozesse: So ist eine Stressreaktion, die Induktion der Hitzeschockproteine, in Scrapie-infizierten N2a-Zellen gestört (Tatzelt *et al.*, 1995; Tatzelt *et al.*, 1998). In mit Prionen infizierten

Zellen und *in vitro* interferieren Chaperone mit der Propagation von PrP^{Sc} (Schirmer und Lindquist, 1997; DebBurman *et al.*, 1997; Tatzelt *et al.*, 1996). Es wurde außerdem gezeigt, dass in Mäusen durch eine Scrapie-Infektion die Bildung von Transmembranformen des PrP induziert wird (Hegde *et al.*, 1999).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass die Missfaltung von PrP im ER zum Zelltod führen kann. Das Modell bezieht neben den durch Mutationen bedingten Missfaltungen auch eine möglicherweise durch PrP^{Sc} verursachte Störung des retrograden oder anterograden Transports ein. Eine relativ erhöhte ERAD-Resistenz und damit eine fehlerhafte Qualitätskontrolle von PrP im ER könnte eine Ursache für Prionen-Krankheiten sein, die kein "klassisches" PrP^{Sc} bilden. Dazu gehören die AV3-Mutation (Hegde *et al.*, 1998a), die sich von der GSS auslösenden PrP-Mutation A117V ableitet (Mastrianni *et al.*, 1995) sowie die dem PrP Δ 146-231 entsprechende Mutation (PrP-Y145stop), die mit der Fatalen Familiären Insomnie assoziiert ist. Auch für PrP mit der Mutation D177N, welches in Patienten mit GSS oder FFI gefunden wurde, konnte in Zellkulturversuchen ein verringerter Abbau durch das 26S-Proteasom nachgewiesen werden (Ma und Lindquist, 2001).

Eine beeinträchtigte Qualitätskontrolle im ER könnte auch ein Grund für sporadische Prionen-Krankheiten sein, die immerhin ca. 90% der Fälle ausmachen. Für eine Missfaltung anfälliges PrP könnte der Degradation entgehen und so die Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} initiieren. Dies gilt vor allem für fehlerhaft glykosyliertes PrP, für das eine erhöhte Konversionsrate bestimmt wurde (Taraboulos *et al.*, 1990; Lehmann und Harris, 1997; Korth *et al.*, 2000). Letztendlich könnte eine mit einem höheren Alter der Patienten verbundene geringere Effizienz der Qualitätskontrolle sekretorischer Proteine erklären, warum sich TSEs meist erst in der 6. oder 7. Lebensdekade manifestieren.

Die Rolle der Transmembrandomäne in der Konversionsreaktion wurde durch Versuche mit transfizierten N2a-Zellen untersucht. Hier stellte sich heraus, dass PrP Δ TM nicht in PrP^{Sc} umgewandelt werden konnte und weiterhin in Bezug auf die Konversion des Wildtyp-PrP^C in PrP^{Sc} als *trans*-dominanter Inhibitor wirkte

(Hölscher *et al.*, 1998). Umstritten ist dagegen die Toxizität eines der Transmembrandomäne entsprechenden PrP-Fragmentes in Kulturen von primären Neuronen (Forloni *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1996; Haik *et al.*, 2000), die andere Forscher kontaminierenden Substanzen zugeschrieben haben (Kunz *et al.*, 1999).

4.7. Ausblick

Die heterologe Expression von PrP in *S. cerevisiae* führt nicht zu den von den Wirtszellen bekannten posttranslationalen Modifikationen der komplexen Glykosylierung und der GPI-Verankerung. Trotzdem oder gerade deshalb stellt die Hefe ein kraftvolles Mittel zur Analyse des Prion Proteins dar: Die Ausbildung eines durch die Expression von PrP verursachten Wachstumsdefektes erlaubt ein Screening nach Komponenten der Zelle, die einen Einfluss auf die Biogenese von PrP haben. Interessant wäre eine Suche nach Suppressoren des Wachstumsdefektes sowohl in Genbanken, die Hefegene überexprimieren als auch in mutagenisierten Genbanken. Am erfolgversprechendsten erscheint der Einsatz einer heterologen Bank von Mausgenen. Dass dieses System prinzipiell funktioniert, zeigt die Expression von Kollagen in *S. cerevisiae*, welches erst durch die Koexpression von α - und β -Strang erfolgreich assembliert werden konnte (Vaughn *et al.*, 1998; Toman *et al.*, 2000).

5. Literatur

(1755) Journal of the House of Commons, **27**, 87

Aigle, M. und F. Lacroute. (1975) General aspects of [URE3], a non-mitochondrial, cytoplasmically inherited mutation in yeast. *Mol Gen Genet*, **136**, 327-335.

Akowitz, A., T. Sklaviadis und L. Manuelidis. (1994) Endogenous viral complexes with long RNA cosediment with with the agent of Creutzfeldt-Jakob disease. *Nucleic Acids Res*, **22**, 1101-1107.

Alper, T., W.A. Cramp, D.A. Haig und M.C. Clarke. (1967) Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature*, **214**, 764-766.

Alpers, M. (1964) Kuru: a clinical study. *Mimeographed Manuscript, Reissued*. USDHEW, NIH, NINCDS, Bethesda, MD, USA, pp. 1-38.

Argon, Y. und B.B. Simen. (1999) GRP94, an ER chaperone with protein and peptide binding properties. *Semin Cell Dev Biol*, **10**, 495-505.

Aronoff-Spencer, E., C.S. Burns, N.I. Avdievich, G.J. Gerfen, J. Peisach, W.E. Antholine, H.L. Ball, F.E. Cohen, S.B. Prusiner und G.L. Millhauser. (2000) Identification of the Cu²⁺ binding sites in the N-terminal domain of the prion protein by EPR and CD spectroscopy. *Biochemistry*, **39**, 13760-13771.

Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith und K. Struhl. (Hrsg.) (1987-2001) *Current Protocols in Molecular Biology*. 4 Vol. John Wiley & Sons, New York, NY, USA.

Barlow, R.M. und J.C. Rennie. (1970) Transmission experiments with a scrapie-like encephalopathy of mink. *J Comp Pathol*, **80**, 75-79.

Basler, K., B. Oesch, M. Scott, D. Westaway, M. Walchli, D.F. Groth, M.P. McKinley, S.B. Prusiner und C. Weissmann. (1986) Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*, **46**, 417-428.

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

Ben-Zvi, A.P. und P. Goloubinoff. (2001) Review: Mechanisms of Disaggregation and Refolding of Stable Protein Aggregates by Molecular Chaperones. *J Struct Biol*, **135**, 84-93.

Bendheim, P.E., H.R. Brown, R.D. Rudelli, L.J. Scala, N.L. Goller, G.Y. Wen, R.J. Kascsak, N.R. Cashman und D.C. Bolton. (1992) Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology*, **42**, 149-156.

Bernoulli, C., J. Siegfried, G. Baumgartner, F. Regli, T. Rabinowicz, D.C. Gajdusek und C.J.J. Gibbs. (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**, 307-343.
- Besnoit, C. und C. Morel. (1898) Note sur les lésions nerveuses de la tremblante du mouton. *Rev Vét*, **23**, 397-400.
- Blond-Elguindi, S., S.E. Cwirla, W.J. Dower, R.J. Lipshutz, S.R. Sprang, J.F. Sambrook und M.J. Gething. (1993) Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP. *Cell*, **75**, 717-728.
- Bolton, D.C., M.P. McKinley und S.B. Prusiner. (1982) Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science*, **218**, 1309-1311.
- Bonifacino, J.S. und A.M. Weissman. (1998) Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **14**, 19-57.
- Borchelt, D.R., A. Taraboulos und S.B. Prusiner. (1992) Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J Biol Chem*, **267**, 16188-16199.
- Bordallo, J., R.K. Plemper, A. Finger und D.H. Wolf. (1998) Der3p/Hrd1p is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded luminal and integral membrane proteins. *Mol Biol Cell*, **9**, 209-222.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Brown, D.R. (2000) Altered toxicity of the prion protein peptide PrP106-126 carrying the Ala(117)-->Val mutation. *Biochem J*, **346**, 785-791.
- Brown, D.R., K. Qin, J.W. Herms, A. Madlung, J. Manson, R. Strome, P.E. Fraser, T. Kruck, A. von Bohlen, W. Schulz-Schaeffer, A. Giese, D. Westaway und H. Kretzschmar. (1997a) The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature*, **390**, 684-687.
- Brown, D.R., B. Schmidt und H.A. Kretzschmar. (1996) Role of microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature*, **380**, 345-347.
- Brown, D.R., W.J. Schulz-Schaeffer, B. Schmidt und H.A. Kretzschmar. (1997b) Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol*, **146**, 104-112.
- Brown, P., D.C. Gajdusek, C.J.J. Gibbs und D.M. Asher. (1985) Potential epidemic of Creutzfeldt-Jakob disease from human growth hormone therapy. *N Engl J Med*, **313**, 728-731.
- Brown, P., R.G. Will, R. Bradley, D.M. Asher und L. Detwiler. (2001) Bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease: background, evolution, and current concerns. *Emerg Infect Dis*, **7**, 6-16.
- Bruce, M.E., R.G. Will, J.W. Ironside, I. McConnell, D. Drummond, A. Suttie, L. McCardle, A. Chree, J. Hope, C. Birkett, S. Cousens, H. Fraser und C.J. Bostock.

- (1997) Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, **389**, 498-501.
- Büeler, H., A. Aguzzi, A. Sailer, R.-A. Greiner, P. Autenried, M. Aguet und C. Weissmann. (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*, **73**, 1339-1347.
- Büeler, H., M. Fischer, Y. Lang, H. Bluethmann, H.P. Lipp, S.J. DeArmond, S.B. Prusiner, M. Aguet und C. Weissmann. (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*, **356**, 577-582.
- Bukau, B., E. Deuerling, C. Pfund und E.A. Craig. (2000) Getting Newly Synthesized Proteins into Shape. *Cell*, **101**, 119-122.
- Butler, D.A., M.R.D. Scott, J.M. Bockman, D.R. Borchelt, A. Taraboulos, K.K. Hsiao, D.T. Kingsbury und S.B. Prusiner. (1988) Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins. *J Virol*, **62**, 1558-1564.
- Capellari, S., S.I. Zaidi, C.B. Urig, G. Perry, M.A. Smith und R.B. Petersen. (1999) Prion protein glycosylation is sensitive to redox change. *J Biol Chem*, **274**, 34846-34850.
- Carlson, J.A., B.B. Rogers, R.N. Sifers, M.J. Finegold, S.M. Clift, F.J. DeMayo, D.W. Bullock und S.L. Woo. (1989) Accumulation of PiZ alpha 1-antitrypsin causes liver damage in transgenic mice. *J Clin Invest*, **83**, 1183-1190.
- Cashman, N.R., R. Loertscher, J. Nalbantoglu, I. Shaw, R.J. Kascsak, D.C. Bolton und P.E. Bendheim. (1990) Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell*, **61**, 185-192.
- Caughey, B. und R.E. Race. (1992) Potent inhibition of scrapie-associated PrP accumulation by congo red. *J Neurochem*, **59**, 768-771.
- Caughey, B., R.E. Race, D. Ernst, M.J. Buchmeier und B. Chesebro. (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.W., A. Dong, K.S. Bhat, D. Ernst, S.F. Hayes und W.S. Caughey. (1991) Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry*, **30**, 7672-7680.
- Chandler, R.L. (1961) Encephalopathy in mice produced with scrapie brain material. *Lancet*, **i**, 1378-1379.
- Chandler, R.L. und B.A. Turfrey. (1972) Inoculation of voles, Chinese hamsters, gerbils and guinea-pigs with scrapie brain material. *Res Vet Sci*, **13**, 219-224.
- Chapman, R.E. und P. Walter. (1997) Translational attenuation mediated by an mRNA intron. *Curr Biol*, **7**, 850-859.

- Chau, V., J.W. Tobias, A. Bachmair, D. Marriott, D.J. Ecker, D.K. Gonda und A. Varshavsky. (1989) A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science*, **243**, 1576-1583.
- Chernoff, Y.O., I.L. Derkach und S.G. Inge-Vechtomov. (1993) Multicopy SUP35 gene induces de-novo appearance of psi-like factors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, **24**, 268-270.
- Chesebro, B., R. Race, K. Wehrly, J. Nishio, M. Bloom, D. Lechner, S. Bergstrom, K. Robbins, L. Mayer und J.M. Keith. (1985) Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature*, **315**, 331-333.
- Chien, P. und J.S. Weissman. (2001) Conformational diversity in a yeast prion dictates its seeding specificity. *Nature*, **410**, 223-227.
- Collinge, J. (2001) Prion Diseases of Humans and Animals: Their Causes and Molecular Basis. *Annu Rev Neurosci*, **24**, 519-550.
- Collinge, J., M.A. Whittington, K.C. Sidle, C.J. Smith, M.S. Palmer, A.R. Clarke und J.G. Jefferys. (1994) Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature*, **370**, 295-297.
- Collins, S., C.A. McLean und C.L. Masters. (2001) Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia, and kuru: a review of these less common human transmissible spongiform encephalopathies. *J Clin Neurosci*, **8**, 387-397.
- Conzelmann, A., H. Riezman, C. Desponds und C. Bron. (1988) A major 125-kd membrane glycoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is attached to the lipid bilayer through an inositol-containing phospholipid. *EMBO J*, **7**, 2233-2240.
- Cox, B.S. (1965) Ψ , a cytoplasmic suppressor of super-suppressor in yeast. *Heredity*, **20**, 505-521.
- Cox, B.S., M.F. Tuite und C.S. McLaughlin. (1988) The psi factor of yeast: a problem in inheritance. *Yeast*, **4**, 159-178.
- Cox, J.S., C.E. Shamu und P. Walter. (1993) Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell*, **73**, 1197-1206.
- Cox, J.S. und P. Walter. (1996) A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell*, **87**, 391-404.
- Craig, E.A., B.D. Gambill und R.J. Nelson. (1993) Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol Rev*, **57**, 402-414.
- Creutzfeldt, H.G. (1920) Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z Gesamte Neurol Psychatrie*, **57**, 1-18.
- Cuillé, J. und P.-L. Chelle. (1936) La maladie dite "tremblante" du mouton: est-elle inoculable? *Compte Rend Acad Sci*, **203**, 1552.

- de Virgilio, C., N. Burckert, J.M. Neuhaus, T. Boller und A. Wiemken. (1993) CNE1, a *Saccharomyces cerevisiae* homologue of the genes encoding mammalian calnexin and calreticulin. *Yeast*, **9**, 185-188.
- DeBurman, S.K., G.J. Raymond, B. Caughey und S. Lindquist. (1997) Chaperone-supervised conversion of prion protein to its protease-resistant form. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 13938-13943.
- Deshaies, R.J. (1999) SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 435-467.
- Dickinson, A.G., G.B. Young, J.T. Stamp und C.C. Renwick. (1965) An analysis of natural scrapie in Suffolk sheep. *Heredity*, **20**, 485-503.
- Dlouhy, S.R., K. Hsiao, M.R. Farlow, T. Foroud, P.M. Conneally, P. Johnson, S.B. Prusiner, M.E. Hodes und B. Ghetti. (1992) Linkage of the Indiana kindred of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease to the prion protein gene. *Nat Genet*, **1**, 64-67.
- Donne, D.G., J.H. Viles, D. Groth, I. Mehlhorn, T.L. James, F.E. Cohen, S.B. Prusiner, P.E. Wright und H.J. Dyson. (1997) Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 13452-13457.
- Dorner, A.J., L.C. Wasley, P. Raney, S. Haugejorden, M. Green und R.J. Kaufman. (1990) The stress response in Chinese hamster ovary cells. Regulation of ERp72 and protein disulfide isomerase expression and secretion. *J Biol Chem*, **265**, 22029-22034.
- Duffy, P., J. Wolf, G. Collins, A.G. DeVoe, B. Streeten und D. Cowen. (1974) Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med*, **290**, 692-693.
- Duksin, D. und W.C. Mahoney. (1982) Relationship of the structure and biological activity of the natural homologues of tunicamycin. *J Biol Chem*, **257**, 3105-3109.
- Edskes, H.K., V.T. Gray und R.B. Wickner. (1999) The [URE3] prion is an aggregated form of Ure2p that can be cured by overexpression of Ure2p fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 1498-1503.
- Ellgaard, L. und A. Helenius. (2001) ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 431-437.
- Ellgaard, L., M. Molinari und A. Helenius. (1999) Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science*, **286**, 1882-1888.
- Ellis, R.J. (1990) The molecular chaperone concept. *Semin Cell Biol*, **1**, 1-9.
- Finley, D., A. Ciechanover und A. Varshavsky. (1984) Thermolability of ubiquitin-activating enzyme from the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell*, **37**, 43-55.

- Fischer, M., T. Rüllicke, A. Raeber, A. Sailer, M. Moser, B. Oesch, S. Brandner, A. Aguzzi und C. Weissmann. (1996) Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J.*, **15**, 1255-1264.
- Forloni, G., N. Angeretti, R. Chiesa, E. Monzani, M. Salmona, O. Bugiani und F. Tagliavini. (1993) Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature*, **362**, 543-546.
- Friedlander, R., E. Jarosch, J. Urban, C. Volkwein und T. Sommer. (2000) A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*, **2**, 379-384.
- Fujiki, Y., A.L. Hubbard, S. Fowler und P.B. Lazarow. (1982) Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, **93**, 97-102.
- Gabizon, R., H. Rosenmann, Z. Meiner, I. Kahana, E. Kahana, Y. Shugart, J. Ott und S.B. Prusiner. (1993) Mutation and polymorphism of the prion protein gene in Libyan Jews with Creutzfeldt-Jakob disease (CJD). *Am J Hum Genet*, **53**, 828-835.
- Gajdusek, D.C., C.J.J. Gibbs und M. Alpers. (1966) Experimental transmission of a kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature*, **209**, 794-796.
- Gajdusek, D.C. und V. Zigas. (1957) Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea: epidemic occurrence of "kuru" in the native population. *N Engl J Med*, **257**, 974-978.
- Gari, E., L. Piedrafita, M. Aldea und E. Herrero. (1997) A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **13**, 837-848.
- Gavel, Y. und G. von Heijne. (1990) Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Prot Eng*, **3**, 433-442.
- Gerstmann, J., E. Strüssler und I. Scheinker. (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., S. Blond-Elguindi, J. Buchner, A. Fourie, G. Knarr, S. Modrow, L. Nanu, M. Segal und J. Sambrook. (1995) Binding sites for Hsp70 molecular chaperones in natural proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **60**, 417-428.
- Gething, M.J. und J. Sambrook. (1992) Protein folding in the cell. *Nature*, **355**, 33-45.
- Gibbs, C.J.J., D.C. Gajdusek, D.M. Asher, M.P. Alpers, E. Beck und P.M. Daniel. (1968) Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science*, **161**, 388-389.
- Gilch, S., K.F. Winklhofer, M.H. Groschup, M. Nunziante, R. Lucassen, C. Spielhauer, W. Muranyi, D. Riesner, J. Tatzelt und H.M. Schatzl. (2001) Intracellular re-routing of prion protein prevents propagation of PrP(Sc) and delays onset of prion disease. *EMBO J*, **20**, 3957-3966.

- Glick, B.S. (1995) Can Hsp70 proteins act as force-generating motors? *Cell*, **80**, 11-14.
- Gordon, W.S. (1946) Advances in veterinary research. *Vet Res*, **58**, 516-520.
- Görlich, D., E. Hartmann, S. Prehn und T.A. Rapoport. (1992) A protein of the endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation. *Nature*, **357**, 47-52.
- Görlich, D. und T.A. Rapoport. (1993) Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell*, **75**, 615-630.
- Griffith, J.S. (1967) Self-replication and scrapie. *Nature*, **215**, 1043-1044.
- Gu, Y., H. Fujioka, R.S. Mishra, R. Li und N. Singh. (2002) Prion peptide 106-126 modulates the aggregation of cellular prion protein and induces the synthesis of potentially neurotoxic transmembrane PrP. *J Biol Chem*, **277**, 2275-2286.
- Hadlow, W.J. (1959) Scrapie and kuru. *Lancet*, **ii**, 289-290.
- Haïk, S., J.M. Peyrin, L. Lins, M.Y. Rosseneu, R. Brasseur, J.P. Langeveld, F. Tagliavini, J.P. Deslys, C. Lasmézas und D. Dormont. (2000) Neurotoxicity of the Putative Transmembrane Domain of the Prion Protein. *Neurobiol Dis*, **7**, 644-656.
- Hampton, R.Y. und H. Bhakta. (1997) Ubiquitin-mediated regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 12944-12948.
- Hampton, R.Y. und J. Rine. (1994) Regulated degradation of HMG-CoA reductase, an integral membrane protein of the endoplasmic reticulum, in yeast. *J Cell Biol*, **125**, 299-312.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation on *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Hanson, R.P., R.J. Eckroade, R.F. Marsh, G.M. Zu Rhein, C.L. Kanitz und D.P. Gustafson. (1971) Susceptibility of mink to sheep scrapie. *Science*, **172**, 859-861.
- Harmey, J.H., D. Doyle, V. Brown und M.S. Rogers. (1995) The cellular isoform of the prion protein, PrP^c, is associated with caveolae in mouse neuroblastoma (N2a) cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **210**, 753-759.
- Hartl, F.U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, **381**, 571-579.
- Hartsough, G.R. und D. Burger. (1965) Encephalopathy of mink. I. Epizootiologic and clinical observations. *J Infect Dis*, **115**, 387-392.
- Hebert, D.N., B. Foellmer und A. Helenius. (1996) Calnexin and Calreticulin promote folding, delay oligomerization and suppress degradation of influenza hemagglutinin in microsomes. *EMBO J*, **15**, 2961-2968.

- Hegde, R.S., J.A. Mastrianni, M.R. Scott, K.A. DeFea, P. Tremblay, M. Torchia, S.J. DeArmond, S.B. Prusiner und V.R. Lingappa. (1998a) A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science*, **279**, 827-834.
- Hegde, R.S., P. Tremblay, D. Groth, S.J. DeArmond, S.B. Prusiner und V.R. Lingappa. (1999) Transmissible and genetic prion diseases share a common pathway of neurodegeneration. *Nature*, **402**, 822-826.
- Hegde, R.S., S. Voigt und V.R. Lingappa. (1998b) Regulation of protein topology by trans-acting factors at the endoplasmic reticulum. *Mol Cell*, **2**, 85-91.
- Heller, U., K.F. Winklhofer, J. Heske, A. Reintjes und J. Tatzelt. (2002) Export from the endoplasmic reticulum prevents cytotoxic effects of misfolded prion protein. *eingereicht*.
- Hellman, R., M. Vanhove, A. Lejeune, F.J. Stevens und L.M. Hendershot. (1999) The in vivo association of BiP with newly synthesized proteins is dependent on the rate and stability of folding and not simply on the presence of sequences that can bind to BiP. *J Cell Biol*, **144**, 21-30.
- Higuchi, R. (1990) Recombinant PCR. In Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky und T.J. White (eds.), *PCR protocols*. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 177-183.
- Hölscher, C., H. Delius und A. Bürkle. (1998) Overexpression of nonconvertible PrP^c delta114-121 in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells leads to trans-dominant inhibition of wild-type PrP(Sc) accumulation. *J Virol*, **72**, 1153-1159.
- Hong, E., A.R. Davidson und C.A. Kaiser. (1996) A pathway for targeting soluble misfolded proteins to the yeast vacuole. *J Cell Biol*, **135**, 623-633.
- Hope, J., L.J. Reekie, N. Hunter, G. Multhaup, K. Beyreuther, H. White, A.C. Scott, M.J. Stack, M. Dawson und G.A. Wells. (1988) Fibrils from brains of cows with new cattle disease contain scrapie-associated protein. *Nature*, **336**, 390-392.
- Hsiao, K., H.F. Baker, T.J. Crow, M. Poulter, F. Owen, J.D. Terwilliger, D. Westaway, J. Ott und S.B. Prusiner. (1989) Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Sträussler syndrome. *Nature*, **338**, 342-345.
- Hurtley, S.M. und A. Helenius. (1989) Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Biol*, **5**, 277-307.
- Jackson, G.S., L.L. Hosszu, A. Power, A.F. Hill, J. Kenney, H. Saibil, C.J. Craven, J.P. Waltho, A.R. Clarke und J. Collinge. (1999) Reversible conversion of monomeric human prion protein between native and fibrillogenic conformations. *Science*, **283**, 1935-1937.
- Jakob, A. (1921) Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen Befunde (spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Z Gesamte Neurol Psychiatrie*, **64**, 147-228.

Jakob, C.A., P. Burda, J. Roth und M. Aebi. (1998) Degradation of misfolded endoplasmic reticulum glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by a specific oligosaccharide structure. *J Cell Biol*, **142**, 1223-1233.

James, T.L., H. Liu, N.B. Ulyanov, S. Farr-Jones, H. Zhang, D.G. Donne, K. Kaneko, D. Groth, I. Mehlhorn, S.B. Prusiner und F.E. Cohen. (1997) Solution structure of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 10086-10091.

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, S. Pind, D.B. Williams, A.L. Goldberg und J.R. Riordan. (1995) Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell*, **83**, 129-135.

Jentsch, S. (1992) The Ubiquitin-Conjugation System. *Annu Rev Genet*, **26**, 179-207.

Jentsch, S., J.P. McGrath und A. Varshavsky. (1987) The yeast DNA repair gene RAD6 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Nature*, **329**, 131-134.

Jin, T., Y. Gu, G. Zanusso, M. Sy, A. Kumar, M. Cohen, P. Gambetti und N. Singh. (2000) The chaperone protein BiP binds to a mutant prion protein and mediates its degradation by the proteasome. *J Biol Chem*, **275**, 38699-38704.

Johnson, J.L. und E.A. Craig. (1997) Protein folding in vivo: unraveling complex pathways. *Cell*, **90**, 201-204.

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

Kalz-Fuller, B., E. Bieberich und E. Bause. (1995) Cloning and expression of glucosidase I from human hippocampus. *Eur J Biochem*, **231**, 344-351.

Kane, P.M., M.C. Kuehn, I. Howald-Stevenson und T.H. Stevens. (1992) Assembly and targeting of peripheral and integral membrane subunits of the yeast vacuolar H(+)-ATPase. *J Biol Chem*, **267**, 447-454.

Kawahara, T., H. Yanagi, T. Yura und K. Mori. (1997) Endoplasmic reticulum stress-induced mRNA splicing permits synthesis of transcription factor Hac1p/Ern4p that activates the unfolded protein response. *Mol Biol Cell*, **8**, 1845-1862.

Kawahara, T., H. Yanagi, T. Yura und K. Mori. (1998) Unconventional splicing of HAC1/ERN4 mRNA required for the unfolded protein response. Sequence-specific and non-sequential cleavage of the splice sites. *J Biol Chem*, **273**, 1802-1807.

Kim, P.S. und P. Arvan. (1998) Endocrinopathies in the family of endoplasmic reticulum (ER) storage diseases: disorders of protein trafficking and the role of ER molecular chaperones. *Endocr Rev*, **19**, 173-202.

- Kim, S.J., R. Rahbar und R.S. Hegde. (2001) Combinatorial control of prion protein biogenesis by the signal sequence and transmembrane domain. *J Biol Chem*, **276**, 26132-26140.
- Kimberlin, R.H. und C.A. Walker. (1977) Characteristics of a Short Incubation Model of Scrapie in the Golden Hamster. *J gen Virol*, **34**, 295-304.
- Klatzo, I., D.C. Gajdusek und V. Zigas. (1959) Pathology of kuru. *Lab Invest*, **8**, 799-847.
- Klausner, R.D. und R. Sitia. (1990) Protein degradation in the endoplasmic reticulum. *Cell*, **62**, 611-614.
- Klebe, R.J. und F.H. Ruddle. (1969) Neuroblastoma: Cell culture analysis of a differentiating stem cell system. *J Cell Biol*, **43**, 69a.
- Knop, M., A. Finger, T. Braun, K. Hellmuth und D.H. Wolf. (1996) Der1, a novel protein specifically required for endoplasmic reticulum degradation in yeast. *EMBO J*, **15**, 753-763.
- Knop, M., K. Siegers, G. Pereira, W. Zachariae, B. Winsor, K. Nasmyth und E. Schiebel. (1999) Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast*, **15**, 963-972.
- Kocisko, D.A., J.H. Come, S.A. Priola, B. Chesebro, G.J. Raymond, P.T. Lansbury, Jr. und B. Caughey. (1994) Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature*, **370**, 471-474.
- Kohno, K., K. Normington, J. Sambrook, M.J. Gething und K. Mori. (1993) The promoter region of the yeast KAR2 (BiP) gene contains a regulatory domain that responds to the presence of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol*, **13**, 877-890.
- Kornfeld, R. und S. Kornfeld. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem*, **54**, 631-664.
- Korth, C., K. Kaneko und S.B. Prusiner. (2000) Expression of unglycosylated mutated prion protein facilitates PrP(Sc) formation in neuroblastoma cells infected with different prion strains. *J Gen Virol*, **81**, 2555-2563.
- Kozutsumi, Y., M. Segal, K. Normington, M.J. Gething und J. Sambrook. (1988) The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature*, **332**, 462-464.
- Kunz, B., E. Sandmeier und P. Christen. (1999) Neurotoxicity of prion peptide 106-126 not confirmed. *FEBS Lett*, **458**, 65-68.
- Lacroute, F. (1971) Non-Mendelian mutation allowing ureidosuccinic acid uptake in yeast. *J Bacteriol*, **106**, 519-522.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. *Nature*, **227**, 680-685.

- 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.
- Lee, I.Y., D. Westaway, A.F. Smit, K. Wang, J. Seto, L. Chen, C. Acharya, M. Ankener, D. Baskin, C. Cooper, H. Yao, S.B. Prusiner und L.E. Hood. (1998) Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species. *Genome Res*, **8**, 1022-1037.
- 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**, 21479-21487.
- 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*. Christian Friedrich Günthern, Berlin und Glogau, pp. 344-360.
- Li, A., S. Sakaguchi, R. Atarashi, B.C. Roy, R. Nakaoke, K. Arima, N. Okimura, J. Kopacek und K. Shigematsu. (2000) Identification of a novel gene encoding a PrP-like protein expressed as chimeric transcripts fused to PrP exon 1/2 in ataxic mouse line with a disrupted PrP gene. *Cell Mol Neurobiol*, **20**, 553-567.
- 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**, 9526-9534.
- Littman, D.R. und S.N. Gettner. (1987) Unusual intron in the immunoglobulin domain of the newly isolated murine CD4 (L3T4) gene. *Nature*, **325**, 453-455.
- Liu, C.U., M. Schröder und R.J. Kaufman. (2000) Ligand-independent Dimerization Activates the Stress Response Kinases IRE1 and PERK in the Lumen of the Endoplasmic Reticulum. *J Biol Chem*, **275**, 24881-24885.
- Lopez, C.D., C.S. Yost, S.B. Prusiner, R.M. Myers und V.R. Lingappa. (1990) Unusual topogenic sequence directs prion protein biogenesis. *Science*, **248**, 226-229.
- Lopez, G.F., R. Zahn, R. Riek und K. Wüthrich. (2000) NMR structure of the bovine prion protein. *Proc Nat Acad Sci U S A*, **97**, 8334-8339.
- Lugaresi, E., R. Medori, P. Montagna, A. Baruzzi, P. Cortelli, A. Lugaresi, P. Tinuper, M. Zucconi und P. Gambetti. (1986) Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N Engl J Med*, **315**, 997-1003.
- Luo, W. und A. Chang. (2000) An endosome-to-plasma membrane pathway involved in trafficking of a mutant plasma membrane ATPase in yeast. *Mol Biol Cell*, **11**, 579-592.
- Ma, J. und S. Lindquist. (2001) Wild-type PrP and a mutant associated with prion disease are subject to retrograde transport and proteasome degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 14955-14960.

- Ma, J.Y. und S. Lindquist. (1999) De novo generation of a PrP^{Sc}-like conformation in living cells. *Nat Cell Biol*, **1**, 358-361.
- Maley, F., R.B. Trimble, A.L. Tarentino und T.H. Plummer, Jr. (1989) Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Anal Biochem*, **180**, 195-204.
- Mastrianni, J.A., M.T. Curtis, J.C. Oberholtzer, M.M. Da Costa, S. DeArmond, S.B. Prusiner und J.Y. Garbern. (1995) Prion disease (PrP-A117V) presenting with ataxia instead of dementia. *Neurology*, **45**, 2042-2050.
- Matlack, K.E., B. Misselwitz, K. Plath und T.A. Rapoport. (1999) BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell*, **97**, 553-564.
- 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**, 291-298.
- McKay, D.B. (1993) Structure and mechanism of 70-kDa heat-shock-related proteins. *Adv Protein Chem*, **44**, 67-98.
- McMillan, D.R., M.J. Gething und J. Sambrook. (1994) The cellular response to unfolded proteins: intercompartmental signaling. *Curr Opin Biotechnol*, **5**, 540-545.
- Medori, R., H.-J. Tritschler, A. LeBlanc, F. Villare, V. Manetto, H.Y. Chen, R. Xue, S. Leal, P. Montagna, P. Cortelli, P. Tinuper, P. Avoni, M. Mochi, A. Baruzzi, J.J. Hauw, J. Ott, E. Lugaresi, L. Autilio-Gambetti und P. Gambetti. (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.
- Mewes, H.W., K. Albermann, M. Bahr, D. Frishman, A. Gleissner, J. Hani, K. Heumann, K. Kleine, A. Maierl, S.G. Oliver, F. Pfeiffer und A. Zollner. (1997) Overview of the yeast genome. *Nature*, **387**, 7-65.
- Moore, R.C., I.Y. Lee, G.L. Silverman, P.M. Harrison, R. Strome, C. Heinrich, A. Karunaratne, S.H. Pasternak, M.A. Chishti, Y. Liang, P. Mastrangelo, K. Wang, A.F.A. Smit, S. Katamine, G.A. Carlson, F.E. Cohen, S.B. Prusiner, D.W. Melton, P. Tremblay, L.E. Hood und D. Westaway. (1999) Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein Doppel. *J Mol Biol*, **292**, 797-817.
- Mori, K., W. Ma, M.J. Gething und J. Sambrook. (1993) A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. *Cell*, **74**, 743-756.
- Mori, K., A. Sant, K. Kohno, K. Normington, M.J. Gething und J.F. Sambrook. (1992) A 22 bp cis-acting element is necessary and sufficient for the induction of the yeast KAR2 (BiP) gene by unfolded proteins. *EMBO J*, **11**, 2583-2593.

- Mouillet-Richard, S., M. Ermonval, C. Chebassier, J.L. Laplanche, S. Lehmann, J.M. Launay und O. Kellermann. (2000) Signal Transduction Through Prion Protein. *Science*, **289**, 1925-1928.
- Nakai, K. (2000) Protein sorting signals and prediction of subcellular localization. *Adv Protein Chem*, **54**, 277-344.
- Newnam, G.P., R.D. Wegrzyn, S.L. Lindquist und Y.O. Chernoff. (1999) Antagonistic interactions between yeast chaperones Hsp104 and Hsp70 in prion curing. *Mol Cell Biol*, **19**, 1325-1333.
- Ng, D.T., J.D. Brown und P. Walter. (1996) Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol*, **134**, 269-278.
- Ng, D.T., E.D. Spear und P. Walter. (2000) The unfolded protein response regulates multiple aspects of secretory and membrane protein biogenesis and endoplasmic reticulum quality control. *J Cell Biol*, **150**, 77-88.
- Nikawa, J., M. Akiyoshi, S. Hirata und T. Fukuda. (1996) *Saccharomyces cerevisiae* IRE2/HAC1 is involved in IRE1-mediated KAR2 expression. *Nucleic Acids Res*, **24**, 4222-4226.
- Normington, K., K. Kohno, Y. Kozutsumi, M.J. Gething und J. Sambrook. (1989) *S. cerevisiae* encodes an essential protein homologous in sequence and function to mammalian BiP. *Cell*, **57**, 1223-1236.
- Nuoffer, C., P. Jenö, A. Conzelmann und H. Riezman. (1991) Determinants for glycosphospholipid anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* GAS1 protein to the plasma membrane. *Mol Cell Biol*, **11**, 27-37.
- Oesch, B., D. Westaway, M. Wälchli, M.P. McKinley, S.B.H. Kent, R. Aebersold, R.A. Barry, P. Tempst, D.B. Teplow, L.E. Hood, S.B. Prusiner und C. Weissmann. (1985) A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*, **40**, 735-746.
- Okamura, K., Y. Kimata, H. Higashio, A. Tsuru und K. Kohno. (2000) Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast. *Biochem Biophys Res Commun*, **279**, 445-450.
- Ozel, M. und H. Diringier. (1994) Small virus-like structure in fraction from scrapie hamster brain. *Lancet*, **343**, 894-895.
- Pan, K.-M., M. Baldwin, J. Nguyen, M. Gasset, A. Serban, D. Groth, I. Mehlhorn, Z. Huang, R.J. Fletterick, F.E. Cohen und S.B. Prusiner. (1993) Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 10962-10966.
- Parlati, F., M. Dominguez, J.J. Bergeron und D.Y. Thomas. (1995) *Saccharomyces cerevisiae* CNE1 encodes an endoplasmic reticulum (ER) membrane protein with sequence similarity to calnexin and calreticulin and functions as a constituent of the ER quality control apparatus. *J Biol Chem*, **270**, 244-253.

- Parry, H.B. (1962) Scrapie: a transmissible and hereditary disease of sheep. *Heredity*, **17**, 75-105.
- Pattison, I.H. (1965) Experiments with scrapie with special reference to the nature of the agent and the pathology of the disease. In Gajdusek, D.C., C.J.J. Gibbs und M.P. Alpers (eds.), *Slow, latent and temperate virus infections, NINDB Monograph 2*. U.S. Government Printing, Washington, DC, USA, pp. 249-257.
- Pattison, I.H. und G.C. Millson. (1961) Experimental transmission of scrapie to goats and sheep by the oral route. *J Comp Pathol*, **71**, 171-176.
- Paushkin, S.V., V.V. Kushnirov, V.N. Smirnov und M.D. Ter-Avanesyan. (1996) Propagation of the yeast prion-like [psi⁺] determinant is mediated by oligomerization of the SUP35-encoded polypeptide chain release factor. *EMBO J*, **15**, 3127-3134.
- Pearson, G.R., T.J. Gruffydd-Jones, J.M. Wyatt, J. Hope, A. Chong, A.C. Scott, M. Dawson und G.A. Wells. (1991) Feline spongiform encephalopathy. *Vet Rec*, **128**, 532.
- Perlmutter, D.H. (1996) Alpha-1-antitrypsin deficiency: biochemistry and clinical manifestations. *Ann Med*, **28**, 385-394.
- Petersen, R.B., M. Tabaton, L. Berg, B. Schrank, R.M. Torack, S. Leal, J. Julien, C. Vital, B. Deleplanque und W.W. Pendlebury. (1992) Analysis of the prion protein gene in thalamic dementia. *Neurology*, **42**, 1859-1863.
- Plempner, R.K., S. Bohmler, J. Bordallo, T. Sommer und D.H. Wolf. (1997) Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature*, **388**, 891-895.
- Post, K., M. Pitschke, O. Schafer, H. Wille, T.R. Appel, D. Kirsch, I. Mehlhorn, H. Serban, S.B. Prusiner und D. Riesner. (1998) Rapid acquisition of beta-sheet structure in the prion protein prior to multimer formation. *Biol Chem*, **379**, 1307-1317.
- Poulter, M., H.F. Baker, C.D. Frith, M. Leach, R. Lofthouse, R.M. Ridley, T. Shah, F. Owen, J. Collinge und J. Brown. (1992) Inherited prion disease with 144 base pair gene insertion. 1. Genealogical and molecular studies. *Brain*, **115**, 675-685.
- Priola, S.A., A. Raines und W.S. Caughey. (2000) Porphyrin and phtalocyanine antiscrapie compounds. *Science*, **287**, 1503-1506.
- 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., M.P. McKinley, K.A. Bowman, D.C. Bolton, P.E. Bendheim, D.F. Groth und G.G. Glenner. (1983) Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell*, **35**, 349-358.

- Prusiner, S.B., M.P. McKinley, D.F. Groth, K.A. Bowman, N.I. Mock, S.P. Cochran und F.R. Masiarz. (1981) Scrapie agent contains a hydrophobic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 6675-6679.
- Prusiner, S.B., M.R. Scott, S.J. DeArmond und F.E. Cohen. (1998) Prion protein biology. *Cell*, **93**, 337-348.
- Raeber, A.J., D.R. Borchelt, M. Scott und S.B. Prusiner. (1992) Attempts to convert the cellular prion protein into the scrapie isoform in cell-free systems. *J Virol*, **66**, 6155-6163.
- Riek, R., S. Hornemann, G. Wider, M. Billeter, R. Glockshuber und K. Wüthrich. (1996) NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). *Nature*, **382**, 180-182.
- Riek, R., S. Hornemann, G. Wider, R. Glockshuber und K. Wüthrich. (1997) NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett*, **413**, 282-288.
- Robbins, P.W., R.B. Trimble, D.F. Wirth, C. Hering, F. Maley, G.F. Maley, R. Das, B.W. Gibson, N. Royal und K. Biemann. (1984) Primary structure of the Streptomyces enzyme endo-beta-N-acetylglucosaminidase H. *J Biol Chem*, **259**, 7577-7583.
- Rogers, M., F. Yehiely, M. Scott und S.B. Prusiner. (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.
- Rose, M.D., L.M. Misra und J.P. Vogel. (1989) KAR2, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene. *Cell*, **57**, 1211-1221.
- Rossi, D., A. Cozzio, M.A. Klein, T. Rüllicke, A. Aguzzi und C. Weissmann. (2001) Onset of ataxia and Purkinje cell loss in PrP null mice inversely correlated with Dpl level in brain. *EMBO J*, **20**, 694-702.
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis und H.A. Erlich. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- Sakaguchi, S., S. Katamine, N. Nishida, R. Moriuchi, K. Shigematsu, T. Sugimoto, A. Nakatani, Y. Kataoka, T. Houtani, S. Shirabe, H. Okada, S. Hasegawa, T. Miyamoto und T. Noda. (1996) Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature*, **380**, 528-531.
- Sanger, F., S. Nicklen und A.R. Coulson. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Santoso, A., P. Chien, L.Z. Osherovich und J.S. Weissman. (2000) Molecular basis of a yeast prion species barrier. *Cell*, **100**, 277-288.

- Schandel, K.A. und D.D. Jenness. (1994) Direct evidence for ligand-induced internalization of the yeast alpha-factor pheromone receptor. *Mol Cell Biol*, **14**, 7245-7255.
- Schiestl, R.H. und R.D. Gietz. (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet*, **16**, 339-346.
- Schirmer, E.C. und S. Lindquist. (1997) Interactions of the chaperone Hsp104 with yeast Sup35 and mammalian PrP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 13932-13937.
- Schlesinger, D.H., G. Goldstein und H.D. Niall. (1975) The complete amino acid sequence of ubiquitin, an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells. *Biochemistry*, **14**, 2214-2218.
- Schneider, H.C., J. Berthold, M.F. Bauer, K. Dietmeier, B. Guiard, M. Brunner und W. Neupert. (1994) Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import. *Nature*, **371**, 768-774.
- Scott, M.R., R. Will, J. Ironside, H.O. Nguyen, P. Tremblay, S.J. DeArmond und S.B. Prusiner. (1999) Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 15137-15142.
- Serban, D., A. Taraboulos, S.J. DeArmond und S.B. Prusiner. (1990) Rapid detection of Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie prion proteins. *Neurology*, **40**, 110-117.
- Seufert, W., J.P. McGrath und S. Jentsch. (1990) UBC1 encodes a novel member of an essential subfamily of yeast ubiquitin-conjugating enzymes involved in protein degradation. *EMBO J*, **9**, 4535-4541.
- Shamu, C.E., J.S. Cox und P. Walter. (1994) The unfolded-protein-response pathway in yeast. *Trends Cell Biol*, **4**, 56-60.
- Shamu, C.E. und P. Walter. (1996) Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *EMBO J*, **15**, 3028-3039.
- Sidrauski, C. und P. Walter. (1997) The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell*, **90**, 1031-1039.
- Sikorski, R.S. und P. Hieter. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **122**, 19-27.
- Silverman, G.L., K. Qin, R.C. Moore, Y. Yang, P. Mastrangelo, P. Tremblay, S.B. Prusiner, F.E. Cohen und D. Westaway. (2000) Doppel is an N-glycosylated, glycosylphosphatidylinositol-anchored protein. Expression in testis and ectopic production in the brains of Prnp(0/0) mice predisposed to Purkinje cell loss. *J Biol Chem*, **275**, 26834-26841.

- Simon, S.M., C.S. Peskin und G.F. Oster. (1992) What drives the translocation of proteins? *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 3770-3774.
- Simonic, T., S. Duga, B. Strumbo, R. Asselta, F. Ceciliani und S. Ronchi. (2000) cDNA cloning of turtle prion protein. *FEBS Lett*, **469**, 33-38.
- Sommer, T. und S. Jentsch. (1993) A protein translocation defect linked to ubiquitin conjugation at the endoplasmic reticulum. *Nature*, **365**, 176-179.
- Sousa, M.C., M.A. Ferrero-Garcia und A.J. Parodi. (1992) Recognition of the oligosaccharide and protein moieties of glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase. *Biochemistry*, **31**, 97-105.
- Stahl, N., M.A. Baldwin, R. Hecker, K.M. Pan, A.L. Burlingame und S.B. Prusiner. (1992) Glycosylinositol phospholipid anchors of the scrapie and cellular prion proteins contain sialic acid. *Biochemistry*, **31**, 5043-5053.
- Stahl, N., M.A. Baldwin, D.B. Teplow, L. Hood, B.W. Gibson, A.L. Burlingame und S.B. Prusiner. (1993) Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry*, **32**, 1991-2002.
- Stahl, N., D.R. Borchelt, K. Hsiao und S.B. Prusiner. (1987) Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell*, **51**, 229-240.
- Stimson, E., J. Hope, A. Chong und A.L. Burlingame. (1999) Site-specific characterization of the N-linked glycans of murine prion protein by high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and exoglycosidase digestions. *Biochemistry*, **38**, 4885-4895.
- Stöckel, J. und F.U. Hartl. (2001) Chaperonin-mediated de novo Generation of Prion Protein Aggregates. *J Mol Biol*, **313**, 861-872.
- Stöckel, J., J. Safar, A.C. Wallace, F.E. Cohen und S.B. Prusiner. (1998) Prion protein selectively binds copper(II) ions. *Biochemistry*, **37**, 7185-7193.
- Stronge, V.S., Y. Saito, Y. Ihara und D.B. Williams. (2001) Relationship between calnexin and BiP in suppressing aggregation and promoting refolding of protein and glycoprotein substrates. *J Biol Chem*, **276**, 39779-39787.
- Struck, D.K. und W.J. Lennarz. (1980) In Lennarz, W.J. (ed.) *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans*. Plenum Press, New York, NY, USA, pp. 35-83.
- Strumbo, B., S. Ronchi, L.C. Bolis und T. Simonic. (2001) Molecular cloning of the cDNA coding for *Xenopus laevis* prion protein. *FEBS Lett*, **508**, 170-174.
- Suh, K., J.E. Bergmann und C.A. Gabel. (1989) Selective retention of monoglucosylated high mannose oligosaccharides by a class of mutant vesicular stomatitis virus G proteins. *J Cell Biol*, **108**, 811-819.
- Supattapone, S., H.-O.B. Nguyen, F.E. Cohen, S.B. Prusiner und M.R. Scott. (1999) Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 14529-14534.

- Taraboulos, A., M. Rogers, D.R. Borchelt, M.P. McKinley, M. Scott, D. Serban und S.B. Prusiner. (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**, 8262-8266.
- Taraboulos, A., M. Scott, A. Semenov, D. Avrahami, L. Laszlo und S.B. Prusiner. (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 und W.J. Welch. (1996) Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein. *EMBO J.*, **15**, 6363-6373.
- Tatzelt, J., R. Voellmy und W.J. Welch. (1998) Abnormalities in stress proteins in prion diseases. *Cell Mol Neurobio*, **18**, 721-729.
- Tatzelt, J. und K.F. Winklhofer. (2001) Inhibition of scrapie prion propagation. *Gene Funct Dis*, **2**, 108-112.
- Tatzelt, J., J.R. Zuo, R. Voellmy, M. Scott, U. Hartl, S.B. Prusiner und W.J. Welch. (1995) Scrapie prions selectively modify the stress response in neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 2944-2948.
- Ter-Avanesyan, M.D., A.R. Dagkesamanskaya, V.V. Kushnirov und V.N. Smirnov. (1994) The SUP35 omnipotent suppressor gene is involved in the maintenance of the non-Mendelian determinant [psi+] in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **137**, 671-676.
- Ter-Avanesyan, M.D., V.V. Kushnirov, A.R. Dagkesamanskaya, S.A. Didichenko, Y.O. Chernoff, S.G. Inge-Vechtomov und V.N. Smirnov. (1993) Deletion analysis of the SUP35 gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* reveals two non-overlapping functional regions in the encoded protein. *Mol Microbiol*, **7**, 683-692.
- Tobler, I., S.E. Gaus, T. Deboer, P. Achermann, M. Fischer, T. Rulicke, M. Moser, B. Oesch, P.A. McBride und J.C. Manson. (1996) Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature*, **380**, 639-642.
- Toman, P.D., G. Chisholm, H. McMullin, L.M. Giere, D.R. Olsen, R.J. Kovach, S.D. Leigh, B.E. Fong, R. Chang, G.A. Daniels, R.A. Berg und R.A. Hitzeman. (2000) Production of recombinant human type I procollagen trimers using a four-gene expression system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **275**, 23303-23309.
- Tourvieille, B., S.D. Gorman, E.H. Field, T. Hunkapiller und J.R. Parnes. (1986) Isolation and sequence of L3T4 complementary DNA clones: expression in T cells and brain. *Science*, **234**, 610-614.
- Towbin, H., T. Staehelin und J. Gordon. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350-4354.

Travers, K.J., C.K. Patil, L. Wodicka, D.J. Lockhart, J.S. Weissman und P. Walter. (2000) Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*, **101**, 249-258.

Trombetta, E.S. und A.J. Parodi. (1992) Purification to apparent homogeneity and partial characterization of rat liver UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase. *J Biol Chem*, **267**, 9236-9240.

Trombetta, E.S., J.F. Simons und A. Helenius. (1996) Endoplasmic reticulum glucosidase II is composed of a catalytic subunit, conserved from yeast to mammals, and a tightly bound noncatalytic HDEL-containing subunit. *J Biol Chem*, **271**, 27509-27516.

Tsubuki, S., H. Kawasaki, Y. Saito, N. Miyashita, M. Inomata und S. Kawashima. (1993) Purification and characterization of a Z-Leu-Leu-Leu-MCA degrading protease expected to regulate neurite formation: a novel catalytic activity in proteasome. *Biochem Biophys Res Commun*, **196**, 1195-1201.

Vashist, S., W. Kim, W.J. Belden, E.D. Spear, C. Barlowe und D.T. Ng. (2001) Distinct retrieval and retention mechanisms are required for the quality control of endoplasmic reticulum protein folding. *J Cell Biol*, **155**, 355-368.

Vassal, A., A. Boulet, E. Decoster und G. Faye. (1992) QRI8, a novel ubiquitin-conjugating enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, **1132**, 211-213.

Vaughn, P.R., M. Galanis, K.M. Richards, T.A. Tebb, J.A. Ramshaw und J.A. Werkmeister. (1998) Production of recombinant hydroxylated human type III collagen fragment in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Cell Biol*, **17**, 511-518.

Vey, M., S. Pilkuhn, H. Wille, R. Nixon, S.J. DeArmond, E.J. Smart, R.G. Anderson, A. Taraboulos und S.B. Prusiner. (1996) Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 14945-14949.

Viles, J.H., F.E. Cohen, S.B. Prusiner, D.B. Goodin, P.E. Wright und H.J. Dyson. (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.

Voigt, S., B. Jungnickel, E. Hartmann und T.A. Rapoport. (1996) Signal sequence-dependent function of the TRAM protein during early phases of protein transport across the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol*, **134**, 25-35.

Waggoner, D.J., B. Drisaldi, T.B. Bartnikas, R.L. Casareno, J.R. Prohaska, J.D. Gitlin und D.A. Harris. (2000) Brain copper content and cuproenzyme activity do not vary with prion protein expression level. *J Biol Chem*, **275**, 7455-7458.

Walmsley, A.R., F. Zeng und N.M. Hooper. (2001) Membrane topology influences N-glycosylation of the prion protein. *EMBO J*, **20**, 703-712.

Wang, Q. und A. Chang. (1999) Eps1, a novel PDI-related protein involved in ER quality control in yeast. *EMBO J*, **18**, 5972-5982.

- Wells, G.A.H., A.C. Scott, C.T. Johnson, R.F. Gunning, R.D. Hancock, M. Jeffrey, M. Dawson und R. Bradley. (1987) A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec*, **121**, 419-420.
- Wickner, R.B. (1994) [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae* [see comments]. *Science*, **264**, 566-569.
- Wiertz, E.J., D. Tortorella, M. Bogyo, J. Yu, W. Mothes, T.R. Jones, T.A. Rapoport und H.L. Ploegh. (1996) Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature*, **384**, 432-438.
- Wildegger, G., S. Liemann und R. Glockshuber. (1999) Extremely rapid folding of the C-terminal domain of the prion protein without kinetic intermediates. *Nat Struct Biol*, **6**, 550-553.
- Will, R.G., J.W. Ironside, M. Zeidler, S.N. Cousens, K. Estibeiro, A. Alperovitch, S. Poser, M. Pocchiari, A. Hofman und P.G. Smith. (1996) A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet*, **347**, 921-925.
- Williams, E.S. und S. Young. (1980) Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J Wildl Dis*, **16**, 89-98.
- Winklhofer, K.F. und J. Tatzelt. (2000) Cationic lipopolyamines induce degradation of PrP^{Sc} in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells. *Biol Chem*, **381**, 463-469.
- Wopfner, F., G. Weidenhöfer, R. Schneider, A. von Brunn, S. Gilch, T.F. Schwarz, T. Werner und H.M. Schätzl. (1999) Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J Mol Biol*, **289**, 1163-1178.
- Wuestehube, L.J. und R.W. Schekman. (1992) Reconstitution of transport from endoplasmic reticulum to Golgi complex using endoplasmic reticulum-enriched membrane fraction from yeast. *Methods Enzymol*, **219**, 124-136.
- Yaffe, M.P. und G. Schatz. (1984) Two nuclear mutations that block mitochondrial protein import in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 4819-4823.
- Yedidia, Y., L. Horonchik, S. Tzaban, A. Yanai und A. Taraboulos. (2001) Proteasomes and ubiquitin are involved in the turnover of the wild-type prion protein. *EMBO J*, **20**, 5383-5391.
- Yost, C.S., C.D. Lopez, S.B. Prusiner, R.M. Myers und V.R. Lingappa. (1990) Non-hydrophobic extracytoplasmic determinant of stop transfer in the prion protein. *Nature*, **343**, 669-672.
- Zahn, R., A. Liu, T. Luhrs, R. Riek, C. von Schroetter, G.F. Lopez, M. Billeter, L. Calzolari, G. Wider und K. Wüthrich. (2000) NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Nat Acad Sci U S A*, **97**, 145-150.
- Zanusso, G., R.B. Petersen, T. Jin, Y. Jing, R. Kanoush, S. Ferrari, P. Gambetti und N. Singh. (1999) Proteasomal degradation and N-terminal protease resistance of the codon 145 mutant prion protein. *J Biol Chem*, **274**, 23396-23404.

Zeidler, M., E.C. Johnstone, R.W.K. Bamber, C.M. Dickens, C.J. Fisher, A.F. Francis, R. Goldbeck, R. Higgo, E.C. Johnson-Sabine, G.J. Lodge, P. McGarry, S. Mitchell, L. Tarlo, M. Turner, P. Ryley und R.G. Will. (1997a) New variant Creutzfeldt-Jakob disease: psychiatric features. *Lancet*, **350**, 908-910.

Zeidler, M., G.E. Stewart, C.R. Barraclough, D.E. Bateman, D. Bates, D.J. Burn, A.C. Colchester, W. Durward, N.A. Fletcher, S.A. Hawkins, J.M. Mackenzie und R.G. Will. (1997b) New variant Creutzfeldt-Jakob-disease: neurological features and diagnostic tests. *Lancet*, **350**, 903-907.

Zhou, M. und R. Schekman. (1999) The engagement of Sec61p in the ER dislocation process. *Mol Cell*, **4**, 925-934.

Zlotnik, I. und J.C. Rennie. (1965) Experimental transmission of mouse passaged scrapie to goats, sheep, rats and hamsters. *J Comp Pathol*, **75**, 147-157.

6. Zusammenfassung

Transmissible Spongiforme Enzephalopathien sind durch die pathogene Isoform (PrP^{Sc}) des zellulären Prion Proteins (PrP^C) charakterisiert. Der genaue Mechanismus der Konversion des mehrheitlich α -helikalen und in milden Detergenzien löslichen PrP^C in das β -Faltblatt-reiche und unlösliche PrP^{Sc} ist ungeklärt. In dieser Arbeit wurde die Biogenese des PrP der Maus in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* untersucht. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- Die Signalsequenzen des Maus-PrP sind in der Hefe nicht funktionell. Die apparente Größe des Proteins von 29 kDa im SDS-Gel spricht dafür, dass weder die ER-Signalsequenz noch die GPI-Ankersequenz prozessiert wurden.
- Ein Austausch der Maus-Signalsequenzen durch Sequenzen des endogenen, GPI-verankerten Zelloberflächenproteins Gas1p führt zu einer effizienten Expression und dem ER-Import von PrP in *S. cerevisiae*. Auch die Prozessierung der endogenen GPI-Ankersequenz ist sehr schwach ausgeprägt.
- In der Hefe exprimiertes PrP hat Eigenschaften von PrP^{Sc}, die Unlöslichkeit in milden Detergenzien sowie eine limitierte Resistenz gegenüber der Proteinase K. Auch gegenüber endogenen Proteasen zeigt PrP eine hohe Resistenz.
- Die Expression von PrP führt zu einem reversiblen Wachstumsdefekt, der von der ER-Lokalisation abhängig ist.
- Es konnte festgestellt werden, dass die Deletion der potenziellen Transmembrandomäne des PrP sowohl die Faltung fördert als auch den Wachstumsdefekt aufhebt.
- Durch die Membranverankerung des PrP mittels eines C-terminalen Transmembranankers des CD4-Proteins konnte der Wachstumsdefekt supprimiert werden, ohne dass die Faltung des Proteins wesentlich verbessert worden wäre.
- Der Nachweis der intrazellulären Lokalisation führte zu dem Modell, nachdem ein anhaltender ER-Aufenthalt von PrP den Wachstumsdefekt auslöst. Sowohl die

Deletion der potenziellen Transmembrandomäne als auch die Membranverankerung führten zu einem effizienten anterograden Export von PrP in die Vakuole der Hefe.

- Der unstrukturierte N-Terminus des PrP wird sowohl in Hefe- als auch in N2a-Zellen durch den ERAD-Mechanismus abgebaut. Der Abbau wird unterbunden, sobald der N-Terminus um die potenzielle Transmembrandomäne erweitert wird.
- Obwohl aggregiertes PrP im ER vorliegt, wird die Unfolded Protein Response nicht aktiviert.

Die Ergebnisse zeigen, dass die potenzielle Transmembrandomäne ein Schlüsselement in der Faltung und Qualitätskontrolle von PrP darstellt. Die wachstumshemmende Wirkung von ER-ständigem PrP zeigt die Sensitivität dieses Kompartiments gegenüber Proteinaggregaten und gibt Hinweise auf eine Rolle der Qualitätskontrolle bei der Entstehung von Prionen-Krankheiten.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt:

Prof. Elke Pratje und Dr. Jörg Tatzelt für die Betreuung dieser Arbeit, Diskussionen und Unterstützung.

Prof. F. Ulrich Hartl für seine Unterstützung, Diskussionen, kritischen Fragen und Ideen.

Prof. Stanley B. Prusiner, Prof. Randy Schekman, Prof. Stefan Jentsch, Dr. Katja Siegers, Dr. Hermann Schätzl, Dr. R. Barz und Dr. Matt Tector für die Überlassung von Hefestämmen, Antiseren und Plasmiden.

Dr. Konstanze F. Winklhofer, Anja Reintjes, Johanna Heske, Astrid Pilz, Daniel Klunker und allen anderen Mitarbeitern der Abteilung von Prof. F. Ulrich Hartl für die kollegiale Unterstützung.

Anja Reintjes für ihre technische Assistenz.

Jörg Mages für das Korrekturlesen.

Meinen Eltern für ihre Unterstützung sowie Christina Weber und allen anderen Freunden für ihre seelisch-moralische Unterstützung.

Lebenslauf

Name: Ulrich Heller

Geburtstag: 16.06.1970

Geburtsort: Greifswald

1976-1984 Karl-Marx-Oberschule, Berlin

1984-1990 Ziehenschule, Frankfurt am Main, Abschluss mit Abitur

1990-1991 Zivildienst beim Arbeiter-Samariter-Bund in Frankfurt am Main

1991-1995 Diplom-Studium der Biologie an der Universität Gießen

1994 Vordiplom

1995-1997 Fortsetzung des Studiums an Universität Hamburg

Hauptfach: Molekularbiologie

Nebenfächer: Mikrobiologie und Biochemie

Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Elke Pratje

Thema: Funktionsanalyse mitochondrialer Proteine der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

1998-2002 Anfertigung der Dissertation unter Betreuung von Prof. Elke Pratje und Dr. Jörg Tatzelt am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried

Thema: Die Analyse des Prion Proteins der Maus in *Saccharomyces cerevisiae*: Fehlfaltung und Zelltod