



# **Die zelluläre Spaltung des Prionproteins der Maus**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
der Fakultät für Biologie  
der Universität Bielefeld

vorgelegt von  
Alice Römer  
aus Hanau

September 2000

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>2</b>
2.1	PRIONERKRANKUNGEN.....	2
2.2	DAS PRIONPROTEIN .....	6
2.2.1	<i>Die Funktion des zellulären Prionproteins.....</i>	<i>6</i>
2.2.2	<i>Die Biosynthese des zellulären Prionproteins.....</i>	<i>7</i>
2.2.3	<i>Der subzelluläre Zyklus des Prionproteins.....</i>	<i>7</i>
2.2.4	<i>Die Spaltung des Prionproteins.....</i>	<i>9</i>
<b>3</b>	<b>AUFGABENSTELLUNG.....</b>	<b>11</b>
<b>4</b>	<b>MATERIALIEN .....</b>	<b>12</b>
4.1	BAKTERIENSTÄMME.....	12
4.2	PLASMIDE.....	12
4.3	OLIGODESOXYRIBONUKLEOTIDE.....	12
4.3.1	<i>Oligodesoxyribonukleotide als Primer für Nukleotidsequenzanalysen.....</i>	<i>13</i>
4.3.2	<i>Oligodesoxyribonukleotide als Primer für Polymerasekettenreaktionen .....</i>	<i>13</i>
4.3.2.1	<i>Oligodesoxyribonukleotide für Polymerasekettenreaktionen.....</i>	<i>13</i>
4.3.2.2	<i>Oligonukleotide für gezielte Mutagenese (SOE-PCR) .....</i>	<i>14</i>
4.3.3	<i>Oligonukleotide für die direkte Klonierung .....</i>	<i>17</i>
4.4	DNA-LÄNGENSTANDARDS.....	18
4.5	PROTEIN MOLEKULARGEWICHTSTANDARDS.....	18
4.6	CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN .....	18
4.7	ENZYME UND PROTEINE .....	19
4.8	SONSTIGE MATERIALIEN UND GERÄTE.....	19
4.9	NÄHRMEDIEN.....	21
4.9.1	<i>Nährmedien für Escherichia coli.....</i>	<i>21</i>
4.9.2	<i>Nährmedien für eukaryontische Zellen.....</i>	<i>22</i>
4.10	LÖSUNGEN UND PUFFER.....	22
<b>5</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>25</b>
5.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....	25
5.1.1	<i>Behandlung von Geräten und Lösungen .....</i>	<i>25</i>
5.1.2	<i>Anzucht und Lagerung von Escherichia coli.....</i>	<i>25</i>
5.1.3	<i>Transformation von Escherichia coli .....</i>	<i>25</i>
5.1.3.1	<i>Herstellung kompetenter Escherichia coli-Zellen.....</i>	<i>25</i>
5.1.3.2	<i>Transformation kompetenter Escherichia coli-Zellen .....</i>	<i>26</i>
5.1.4	<i>Plasmidisolierung aus Escherichia coli durch alkalische Lyse (Birnboim, H. C. und Doly, J., 1979).....</i>	<i>26</i>
5.1.4.1	<i>Plasmidisolierung in analytischen Mengen .....</i>	<i>26</i>
5.1.4.2	<i>Plasmidisolierung in präparativen Mengen.....</i>	<i>27</i>

5.1.5	Reinigung von DNA .....	28
1.1.1.1	Fällung von DNA mit Ethanol.....	28
5.1.5.2	Fällung von DNA mit Isopropanol.....	28
5.1.5.3	Fällung von DNA durch Polyethylenglykol (PEG) .....	28
5.1.5.4	Extraktion von DNA mit Phenol/TE, Phenol/Chloroform oder Chloroform.....	29
5.1.5.5	Reinigung von DNA mit Hilfe von Glasmilch.....	29
5.1.6	Reinigung von DNA aus Agarosegelen.....	29
5.1.6.1	Reinigung von DNA aus Agarosegelen durch Diffusion .....	29
5.1.6.2	Reinigung von DNA aus Agarosegelen mit Hilfe von Glasmilch.....	29
5.1.7	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	30
5.1.8	Agarosegelelektrophorese.....	30
5.1.9	Enzymatische Manipulationen an DNA.....	31
5.1.9.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	31
5.1.9.2	Dephosphorylierung von DNA-Enden .....	31
5.1.9.3	Erzeugung glatter DNA-Enden.....	31
5.1.9.4	Ligation von doppelsträngiger DNA .....	32
5.1.10	Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki, R. K. et al., 1988).....	32
5.1.10.1	Polymerasekettenreaktion mit spezifischen Primern.....	32
5.1.10.2	Einführung von Mutationen durch Polymerasekettenreaktion (SOE-PCR).....	33
5.1.11	Nukleotidsequenzanalyse von DNA (Sanger, F. et al., 1977; Ansorge, W. et al., 1987) .....	34
5.1.11.1	Cycle Sequencing (Amersham).....	34
5.1.11.2	Analyse der Sequenzreaktionen.....	35
5.2	ZELLKULTUR UND ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	35
5.2.1	Kultivierung eukaryontischer Zellen .....	35
5.2.1.1	Zellpassage .....	36
5.2.1.2	Langfristige Lagerung eukaryontischer Zellen .....	36
5.2.1.3	Auftauen und Revitalisierung langfristig gelagerter Zellen.....	36
5.2.2	Stabile und transiente Transfektion eukaryontischer Zellen mit Plasmid-DNA.....	37
5.2.2.1	Calciumphosphat-vermittelte Transfektion.....	37
5.2.2.2	Superfect-vermittelte Transfektion.....	37
5.2.2.3	Effecten-vermittelte Transfektion .....	38
5.2.3	Immunfluoreszenz.....	38
5.3	PROTEINCHEMISCHE METHODEN.....	39
5.3.1	Zellyse und Präparation von Proteinextrakten.....	39
5.3.1.1	Präparation von Hirnhomogenaten .....	39
5.3.1.2	Präparation von Zellysaten.....	39
5.3.2	Proteinkonzentrationsbestimmung .....	39
5.3.3	Methanolfällung von Proteinen .....	40
5.3.4	Immunpräzipitation.....	40
5.3.5	Enzymatische Manipulationen an Proteinen.....	40
5.3.5.1	Deglykosylierung von Proteinen durch PNGaseF .....	40
5.3.5.2	Proteinase K Verdau .....	41

5.3.6	<i>Immunologischer Nachweis elektrophoretisch aufgetrennter Proteine (Western Blot)</i>	41
5.3.6.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	41
5.3.6.1.1	Anfärbung von Proteinen in SDS-PAG	41
5.3.6.2	Übertragung von Proteinen auf PVDF-Membranen	42
5.3.6.3	Immunologische Detektion durch Chemolumineszenz	42
5.3.6.4	Immunologische Detektion mit NBT/BCIP	43
<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>45</b>
6.1	ANALYSE DER ZELLULÄREN SPALTUNG DES PRIONPROTEINS IN HIRNHOMOGENATEN	45
6.1.1	<i>Detektion des N-terminalen Spaltprodukts</i>	45
6.1.2	<i>Detektion des C-terminalen Spaltprodukts</i>	47
6.1.3	<i>Überprüfung der experimentellen Bedingungen bei der Detektion der C-terminalen Spaltprodukte</i>	49
6.1.3.1	Einfluß der Postmortalzeit	49
6.1.3.2	Einfluß von Proteasen	49
6.1.3.3	Einfluß der Deglykosylierung mit PNGaseF	50
6.1.3.4	Detektion der C-terminalen Spaltprodukte mit verschiedenen Antikörpern	52
6.1.4	<i>Zusammenfassende Beurteilung der erhaltenen Ergebnisse</i>	57
6.2	ANALYSE DER ZELLULÄREN SPALTUNG DES PRIONPROTEINS IN PRP ÜBEREXPRIMIERENDEN ZELLINIEN	59
6.2.1	<i>Einführung des 13A5 Epitops in die murine PrP<sup>c</sup> Aminosäuresequenz</i>	59
6.2.2	<i>Detektion von für die Spaltung essentiellen Aminosäuren</i>	60
6.2.2.1	Konstruktion und Klonierung verschiedener Prionprotein-Mutanten	62
6.2.2.2	Überexpression der Konstrukte in N2a Zellen	63
6.2.2.3	Lokalisation der mutierten Prionproteine in der Zelle	64
6.2.2.4	Die proteolytische Spaltung der PrP Mutanten in N2a Zellen	65
6.2.2.4.1	Analyse des 18 kDa Spaltprodukts	66
6.2.2.4.2	Analyse des 20 kDa Spaltprodukts	71
6.2.2.5	Die Wirkung von Tunikamycin auf die Spaltung von PrP <sup>c</sup>	74
6.2.2.6	Proteinase K Sensitivität verschiedener PrP Mutanten in N2a Zellen	76
6.2.2.7	Überexpression der Prionprotein Mutanten in CHO Zellen	78
6.2.3	<i>Eingrenzung der für die beobachteten Phänotypen verantwortlichen Aminosäuren durch gezielte Mutagenese</i>	79
6.2.3.1	Konstruktion und Klonierung weiterer Prionprotein Mutanten	81
6.2.3.2	Überexpression der Konstrukte in N2a Zellen	81
6.2.3.3	Lokalisation der mutierten Prionproteine in der Zelle	82
6.2.3.4	Analyse der proteolytischen Spaltung der verschiedenen PrP Mutanten in N2a-Zellen	84
6.2.3.4.1	Analyse des 18 kDa Spaltprodukts	84
6.2.3.4.2	Analyse des 20 kDa Spaltprodukts	86
6.2.3.5	Analyse der Proteinase K Sensitivität	88
6.2.4	<i>Zusammenfassende Beurteilung der erhaltenen Ergebnisse</i>	88

6.3	UNTERSUCHUNGEN ZUR AUTOKATALYTISCHEN SPALTAKTIVITÄT DES PRIONPROTEINS	91
6.3.1	<i>Konstruktion und Klonierung verschiedener Prionprotein Mutanten zur Überprüfung der autokatalytischen Aktivität des Prionproteins</i>	91
6.3.2	<i>Überexpression der mutierten Prionproteine in N2a Zellen</i>	93
6.3.3	<i>Analyse der proteolytischen Spaltung der verschiedenen PrP Mutanten</i>	93
6.3.4	<i>Zusammenfassende Beurteilung der erhaltenen Ergebnisse</i>	95
6.4	UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOLOGISCHEN FUNKTION DER PROTEOLYTISCHEN SPALTUNG DES PRIONPROTEINS	96
6.4.1	<i>Einfluß der Cu<sup>2+</sup>-Bindung auf die Spaltung des Prionproteins</i>	96
6.4.1.1	Untersuchungen an mikrobiell erzeugtem murinem Prionprotein	96
6.4.1.2	Untersuchungen an Prionproteinen mit Aminosäuresequenz-veränderungen in der <i>octarepeat</i> -Region	97
6.4.2	<i>Überexpression der Spaltprodukte zur funktionellen Analyse</i>	102
6.4.2.1	Mikrobielle Erzeugung des N-terminalen Spaltprodukts	102
6.4.2.1.1	Konstruktion und Klonierung des prokaryontischen Expressionsvektors pET21dhuPrP23-112	102
6.4.2.1.2	Überexpression und Aufreinigung von huPrP23-112	103
6.4.2.2	Überexpression des C-terminalen Spaltprodukts im eukaryontischen System	105
6.4.2.2.1	Konstruktion und Klonierung des eukaryontischen Expressionsvektors pCIneomoPrPSIG111-254	105
6.4.2.2.2	Überexpression des C-terminalen Spaltprodukts in N2a Zellen	106
6.4.3	<i>Zusammenfassende Beurteilung der erhaltenen Ergebnisse</i>	107
<b>7</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>108</b>
7.1	DIE SPALTUNG DES PRIONPROTEINS IN TG81-MÄUSEN	109
7.1.1	<i>Detektion des N-terminalen Spaltprodukts</i>	109
7.1.2	<i>Detektion C-terminaler Spaltprodukte</i>	110
7.2	DIE SPALTUNG DES PRIONPROTEINS IN EUKARYONTISCHEN ZELLINIEN	112
7.2.1	<i>Die mögliche Bedeutung der Spaltung</i>	112
7.2.2	<i>Charakterisierung der Spaltstelle im zentralen Bereich des Prionproteins</i>	114
7.2.3	<i>Einflüsse der eingeführten Aminosäuresequenzveränderungen auf die N-terminal lokalisierte Spaltung des Prionproteins</i>	119
7.2.4	<i>Einflüsse der eingeführten Aminosäuresequenzveränderungen auf die Sensibilität der PrP<sup>c</sup>-Konstrukte gegenüber Proteinase K</i>	120
7.3	DER AUTOKATALYTISCHE CHARAKTER DER PROTEOLYTISCHEN SPALTUNG DES PRIONPROTEINS	122
7.4	DIE BIOLOGISCHE FUNKTION DER ZELLULÄREN SPALTUNG DES PRIONPROTEINS	124
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>126</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG</b>	<b>141</b>
9.1	DATENTABELLEN	141
9.2	SEQUENZEN	145
9.3	ABKÜRZUNGEN	146
9.4	DANKSAGUNG	148

## 1 ZUSAMMENFASSUNG

Die zelluläre Spaltung des Prionproteins (PrP<sup>c</sup>) in dessen evolutionär hochkonservierter zentraler Region ist ein Prozeß, der sowohl an der bislang nicht aufgeklärten Funktion des Prionproteins beteiligt sein als auch eine Rolle bei der Ausprägung von Prionerkrankungen spielen könnte. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, die Spaltung von PrP<sup>c</sup> und die zugehörige Spaltstelle genauer zu charakterisieren.

In Hirnhomogenaten von Mäusen waren zwei Spaltprodukte der zellulären Spaltung des Prionproteins nachweisbar. Während sich das *N*-terminale Spaltprodukt als sehr instabil erwies, war das *C*-terminale Spaltprodukt für weitergehende Analysen geeignet. Neben diesen Spaltprodukten wurde ein weiteres *N*-terminal verlängertes *C*-terminales Spaltprodukt des Prionproteins nachgewiesen und analysiert. Beide *C*-terminalen Spaltprodukte waren mit unterschiedlichen den *C*-Terminus des Proteins erkennenden Antikörpern nachweisbar, wobei sich zum Teil deutliche Differenzen der Affinität einzelner Antikörper ergaben. Eine unspezifische Proteolyse als mögliche Ursache für das Auftreten der verschiedenen Prionprotein-Fragmente wurde experimentell ausgeschlossen.

Die Charakterisierung der zentralen Spaltstelle erfolgte durch Analyse von in eukaryontischen Zelllinien überexprimierten Prionprotein-Mutanten. Die Spaltung wurde durch verschiedene Aminosäureaustausche sowie Deletionen in der hydrophoben Region des Prionproteins fast vollständig inhibiert. Desgleichen zeigten einige Mutationen im basischen Bereich negative Wirkung auf die Spaltungseffizienz. Es war jedoch nicht möglich eine Aminosäureposition zu identifizieren, die alleine die Spaltstelle determiniert. Eine der zur fast vollständigen Inhibition der zellulären Spaltung führenden Mutationen bewirkte eine erhöhte Resistenz gegenüber dem proteolytischen Abbau durch Proteinase K. Auch die zweite Spaltstelle des Prionproteins wurde durch verschiedene Aminosäuresequenzveränderungen beeinflusst. Insbesondere Mutationen in der basischen Region und ausgedehnte Deletionen zeigten hier zum Teil starke inhibitorische Wirkung. Eine zentrale Rolle bei der Aufklärung der Bedeutung der Spaltungen des Prionproteins und der Determination der Spaltstellen wird der Identifikation der in dieser Arbeit postulierten PrP-spaltenden zellulären Enzyme, der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Priase, zukommen. Eine autokatalytische Spaltaktivität des Prionproteins konnte durch Untersuchungen verschiedener Prionprotein-Mutanten nicht bestätigt werden.

Untersuchungen zur biologischen Funktion der zellulären Spaltung des Prionproteins ergaben keinen direkten Zusammenhang zwischen der Kupfer-Bindung des Proteins und der Spaltung.

## 2 EINLEITUNG

### 2.1 PRIONERKRANKUNGEN

Als Prionerkrankungen (Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE)) bezeichnet man eine Gruppe stets tödlich verlaufender übertragbarer neurodegenerativer Erkrankungen des zentralen Nervensystems. Neuropathologische Kennzeichen aller TSE-Erkrankungen sind spongiforme Veränderungen des Neuropils, starke Proliferation von Gliazellen, ausgedehnter Nervenzellverlust und zumeist Ablagerungen des Prionoproteins im Gehirn (Kretzschmar, H. A. *et al.*, 1996). Beim Menschen zeichnen sich Prionerkrankungen durch eine Jahre bis Jahrzehnte andauernde Inkubationszeit und einen nach dem Auftreten erster klinischer Symptome sehr raschen Krankheitsverlauf von zumeist nur wenigen Monaten bis zum Tod aus. Das klinische Leitsymptom menschlicher Prionerkrankungen ist eine rasch progrediente Demenz, häufig begleitet von visuellen und cerebellären Zeichen (Weber, T. *et al.*, 1994).

Zu den Prionerkrankungen des Menschen zählen die meist sporadisch, aber auch erblich oder selten iatrogen auftretende Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung (CJD) (Creutzfeldt, H. G., 1920; Jakob, A., 1921), das erbliche Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) (Gerstmann, J. *et al.*, 1936), die tödliche familiäre Schlaflosigkeit (*Fatal Familial Insomnia*, FFI) (Medori, R. *et al.*, 1992) und die durch rituellen Kannibalismus unter den Mitgliedern eines Volksstammes in Papua-Neuguinea übertragene Kuru-Erkrankung (Klatzo, I. *et al.*, 1959).

Zu den im Tierreich auftretenden Prionerkrankungen zählt die seit über 250 Jahren bekannte und gut beschriebene Traberkrankheit (Scrapie) bei Schaf und Ziege (Parry, H. B., 1983). Ferner sind auch bei Hirschen und Nerzen übertragbare spongiforme Enzephalopathien bekannt (DeArmond, S. J. und Prusiner, S. B., 1995). Auch die seit 1985 in Großbritannien epidemisch aufgetretene, durch infektiöses Futtermittel übertragene Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) beim Rind (Bradley, R., 1998) sowie die Feline Spongiforme Enzephalopathie (FSE) bei Katzen zählen zu den Prionerkrankungen (DeArmond, S. J. und Prusiner, S. B., 1995).

Die Infektiosität von Scrapie wurde schon früh experimentell nachgewiesen (Cuillé, J. und Chelle, P.-L., 1936), wohingegen menschliche Formen spongiformer Enzephalopathien zunächst als Erkrankungen mit vorwiegend genetischer oder neurodegenerativer Ätiologie angesehen wurden. Erst die Entdeckung des epidemischen Auftretens von Kuru lieferte Hinweise auf eine infektiöse Genese auch dieser Erkrankungen (Hadlow, W. J., 1959). Inzwischen ist die spezieübergreifende Übertragbarkeit sowohl der tierischen als auch der humanen Prionerkrankungen vielfach experimentell gezeigt (Gajdusek, D. C. *et al.*, 1966). Aus dem Auftreten einer neuen Variante der CJD-Erkrankung (nvCJD)



bei jungen Menschen (Will, R. G. *et al.*, 1996) etwa 10 Jahre nach dem Höhepunkt der BSE-Epidemie in Großbritannien resultiert die Annahme, diese könne durch Ansteckung über den Verzehr BSE-infizierten Rindfleisches aufgetreten sein. Inzwischen bestehen kaum noch Zweifel an einem Kausalzusammenhang zwischen BSE und nvCJD, da die Erreger beider Erkrankungen viele experimentell bestimmte Gemeinsamkeiten aufweisen (Collinge, J. *et al.*, 1996; Lasmézas, C. I. *et al.*, 1996; Bruce, M. E. *et al.*, 1997, Scott, M. R. *et al.*, 1999).

Die Natur des infektiösen Agens übertragbarer spongiformer Enzephalopathien war und ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen und Spekulationen. Zunächst ging man wegen der geringen Größe des Erregers (Alper, T. *et al.*, 1966) und der langen Inkubationszeiten der Erkrankung von einem langsamen Virus aus. Da die Infektiosität jedoch durch antivirale nukleinsäurezerstörende Behandlung nicht beeinflussbar war (Alper, T. *et al.*, 1967) und weder virale DNA noch eine antivirale Immunreaktion nachweisbar waren, wohingegen proteinverändernde Verfahren die Infektiosität des Erregers durchaus beeinträchtigten, vermutete man bald einen neuartigen proteinartigen Erregertyp, der zur Replikation keiner Nukleinsäuren bedarf (Griffith, J. S., 1967). Prusiner identifizierte als Hauptbestandteil des aufgereinigten infektiösen Agens ein Protein. Er führte für die Bezeichnung des infektiösen Agens den Terminus Prion (*proteinaceous infectious particle*) ein, um es von herkömmlichen Krankheitserregern zu unterscheiden (Prusiner, S. B., 1982).

Die Identifikation und weitere Analyse des Prionproteins, des Grundbausteins des Prions, ergab, daß es sich hierbei um die pathogene Isoform eines wirtskodierten, membranassoziierten Glykoproteins handelt (Oesch, B. *et al.*, 1985; Hope, J. *et al.*, 1986; Horwich, A. L. und Weissman, J. S., 1997; Prusiner, S. B. *et al.*, 1998; Prusiner, S. B., 1998). Wichtige Unterschiede zwischen der zellulären Form des Proteins ( $\text{PrP}^c$ ) und der pathogenen Isoform ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) liegen in einem veränderten  $\beta$ -Faltblatt und  $\alpha$ -Helix Anteil der Proteine (Caughey, B. W. *et al.*, 1991) und in einer vermutlich dadurch bedingten erhöhten Proteinase-Resistenz von  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ .

Bei einer spongiformen Enzephalopathie wird durch eine posttranslationale Konformationsänderung aus  $\text{PrP}^c$  die veränderte Isoform  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  gebildet. Die Prion-Hypothese postuliert, daß diese Umwandlung durch das  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  selbst katalysiert wird, welches dann in den betroffenen Zellen akkumuliert und auf noch unbekannte Weise zu den pathologischen Veränderungen im zentralen Nervensystem führt (Prusiner, S. B., 1982; Come, J. H. *et al.*, 1993; Pan, K. M. *et al.*, 1993; Cohen, F. E. *et al.*, 1994). Wie  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  auf molekularer Ebene entsteht und als entscheidende Komponente die Konformationsänderung des endogenen  $\text{PrP}^c$  bewirkt, ist nicht bekannt. Es werden zwei unterschiedliche Mechanismen diskutiert, die von unterschiedlichen thermodynamischen und kinetischen Voraussetzungen ausgehen: Während das von Prusiner aufgestellte *template-mediated-refolding*-Modell eine kooperative autokatalytische Konversion des

Prionproteins vorschlägt (Prusiner, S. B., 1991) geht Lansbury mit dem *seeding-* oder *nucleation-*Modell von einem nicht zwingend autokatalytischen Prozeß für die Umfaltung aus (Jarrett, J. T. und Lansbury, P. T., 1993). Die prinzipielle Differenz zwischen beiden Modellen besteht im sich unterscheidenden Zustand des Gleichgewichts zwischen PrP<sup>c</sup> und PrP<sup>Sc</sup> in der Zelle. Beide Theorien werden nach vergleichender kinetischer Analyse anhand biophysikalischer Kriterien für möglich gehalten (Eigen, M., 1996). Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 1 ein nach der Prion-Hypothese und in Anlehnung an das Prusiner-Modell denkbarer Mechanismus zur Entstehung von PrP<sup>Sc</sup> schematisch und stark vereinfacht dargestellt.

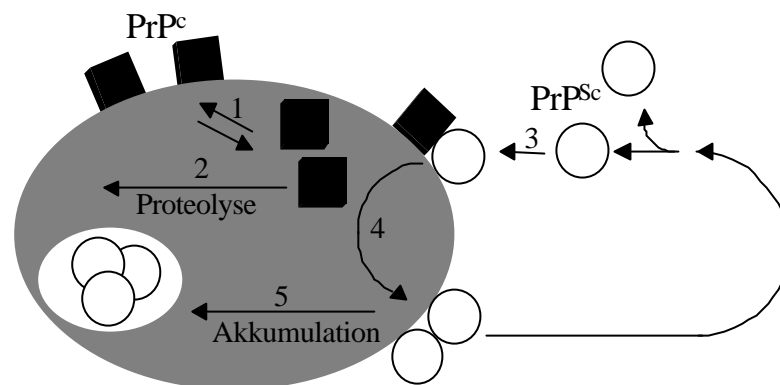


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines nach der Prion-Hypothese postulierten Mechanismus zur Entstehung von PrP<sup>Sc</sup> anhand einer PrP<sup>c</sup> exprimierenden Zelle (graue Ellipse). PrP<sup>c</sup> (schwarze Quadrate) verbleibt nach seiner Biosynthese nicht an der Zelloberfläche, sondern unterliegt einem konstitutiven zellulären Zyklus zwischen Plasmamembran und einem intrazellulären Kompartiment (1). Der normale Katabolismus des Proteins erfolgt im Verlauf dieses Zyklus durch intrazelluläre Proteolyse (2) (Vergleiche auch Absatz 2.2.3).

Nach der Prion-Hypothese und dem *template-mediated-*Modell führt der Kontakt zwischen PrP<sup>Sc</sup> (weiße Kreise) und PrP<sup>c</sup> (3) zur autokatalytischen Umwandlung von PrP<sup>c</sup> zur pathogenen Isoform des Proteins (4). Das so gebildete PrP<sup>Sc</sup> kann dann seinerseits auf gleichem Wege die Umfaltung weiterer PrP<sup>c</sup> Moleküle bewirken. Das sich auf diese Weise anreichernde PrP<sup>Sc</sup> ist zellulär nicht oder nur unzureichend abbaubar und akkumuliert innerhalb der Zelle (5).

Obwohl der Beweis für die Prion-Hypothese, die *de novo-*Synthese von Infektiosität aus synthetischem PrP im zellfreien System, bis heute nicht erbracht werden konnte, gibt es inzwischen viele experimentelle Befunde, die stark für die essentielle Bedeutung des Prionproteins bei der Entstehung und Verbreitung von übertragbaren spongiformen Enzephalopathien sprechen und die in zahlreichen Übersichtsartikeln diskutiert werden (Caughey, B. und Chesebro, B., 1997; Chesebro, B., 1998; Prusiner, S. B. *et al.*, 1998). So gibt es bis heute keinen Nachweis einer erregerspezifischen Nukleinsäure; es kann im Gegenteil sogar ausgeschlossen werden, daß der Erreger eine Nukleinsäure von mehr als 100 Basenpaaren Länge enthält (Meyer, N. *et al.*, 1991; Kellings, K. *et al.*, 1992; Kellings, K. *et al.*, 1993). Des weiteren sind PrP-*knockout-*Mäuse, deren PrP-

kodierendes Gen (*Prn-p*) homozygot inaktiviert ist (*Prn-p<sup>0/0</sup>*) resistent gegenüber Infektionen mit TSE-Erregern (Büeler, H. *et al.*, 1993), und hemizygot Mäuse (*Prn-p<sup>0/+</sup>*) zeigen eine im Vergleich zu Kontrollmäusen (*Prn-p<sup>+/+</sup>*) deutlich verlängerte Inkubationszeit nach Infektion (Büeler, H. *et al.*, 1994). Transplantationsexperimente belegen, daß die Expression des zellulären *Prn-p*-Gens sowohl für die Pathologie der Erkrankung (Brandner, S. *et al.*, 1996) als auch für die Infektionsausbreitung entlang der Nervenbahnen des ZNS (Brandner, S. *et al.*, 1996) notwendig ist. Hinweise auf eine wichtige Funktion des Prionproteins bei der Pathologie von Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien ergeben sich auch aus dem Befund, daß ein die Aminosäuren 106-126 des humanen PrP umfassendes Peptid in Zellkultur toxisch auf Wildtyp-, nicht jedoch auf *Prn-p<sup>0/0</sup>*-Mauskortikalzellen wirkt (Brown, D. R. *et al.*, 1996). Auch die Tatsache, daß 10-15 % der humanen Prionerkrankungen erblich bedingt und ausschließlich auf unterschiedliche Mutationen im menschlichen Prionprotein-Gen (*PRNP*) zurückzuführen sind (Kretzschmar, H. A., 1993), unterstreicht die Bedeutung von PrP für die Entstehung von Prionerkrankungen. Im Rahmen der Prion-Hypothese geht man davon aus, daß pathogene Mutationen in *PRNP* die Tendenz zur Konformationsänderung von PrP<sup>c</sup> zu PrP<sup>Sc</sup> erhöhen und somit mit hoher Penetranz zum Ausbruch der Erkrankung führen (Prusiner, S. B. und DeArmond, S. J., 1994). Die Beobachtung, daß auch erbliche Prionerkrankungen übertragbar sind, stützt diese Hypothese (Tateishi, J. und Kitamoto, T., 1995). Ein ähnlicher Mechanismus der spontanen Umfaltung von PrP<sup>c</sup> zu PrP<sup>Sc</sup>, wenn auch mit weitaus geringerer Wahrscheinlichkeit, wird für das normale humane Prionprotein bei sporadischen CJD-Erkrankungen, die etwa 90% aller menschlichen Prionerkrankungen ausmachen und für die sich keine Infektionsquellen ermitteln lassen, angenommen.

Inzwischen wurde die Prion-Hypothese aufgrund experimenteller Befunde die Speziesbarriere betreffend leicht modifiziert. Der Begriff Speziesbarriere umschreibt die Tatsache, daß die Übertragung einer TSE von einer Spezies auf eine andere oft nur eingeschränkt möglich ist und mit schwankenden, zum Teil erheblich verlängerten Inkubationszeiten einhergeht. Wird der Erreger dann in der neuen Spezies weiter passagiert, geschieht dies in der Regel mit konsistenten Inkubationszeiten und Läsionsmustern. Ist die Übertragung von einer Spezies auf eine andere gar nicht möglich, spricht man von einer absoluten Speziesbarriere (Bartz, J. C. *et al.*, 1994). Zunächst wurde die Speziesbarriere ausschließlich dahingehend gedeutet, daß die Interaktion zwischen PrP-Molekülen unterschiedlicher Spezies nur eingeschränkt möglich ist und somit auch die Umfaltung nur ineffizient ablaufen kann (Prusiner, S. B. *et al.*, 1990). Unterschiedliche transgene Studien legen inzwischen nahe, daß neben PrP noch ein weiterer Faktor, das sogenannte Protein X, an der Umfaltung und damit auch der Speziesbarriere beteiligt ist (Telling, G. C. *et al.*, 1994; Telling, G. C. *et al.*, 1995).

## 2.2 DAS PRIONPROTEIN

### 2.2.1 Die Funktion des zellulären Prionproteins

Obwohl der hohe Grad an Aminosäuresequenzhomologie von zumeist über 90 % unter Prionproteinen unterschiedlicher Säugetiere (Wopfner, F. *et al.*, 1999) auf eine wichtige Funktion des Proteins schließen läßt, konnte diese bislang nicht aufgeklärt werden.

Mäuse mit einem homozygot zerstörten *Prn-p*-Gen (*Prn-p*<sup>0/0</sup>) zeigen weder in ihrer Entwicklung noch in ihrem Verhalten auffällige Phänotypen (Büeler, H. *et al.*, 1992). In einigen biochemischen, morphologischen und elektrophysiologischen Studien verschiedener PrP-*knockout*-Linien wurden allerdings inzwischen geringfügige, jedoch nicht für jede Mauslinie gültige Unterschiede zwischen *Prn-p*<sup>0/0</sup>- und *Prn-p*<sup>+/+</sup>-Mäusen detektiert. Elektrophysiologische Unterschiede im Hippocampus (Collinge, J. *et al.*, 1994; Manson, J. C. *et al.*, 1995; Whittington, M. A. *et al.*, 1995; Colling, S. B. *et al.*, 1996; Colling, S. B. *et al.*, 1997), Verlust von Purkinje Zellen (Sakaguchi, S. *et al.*, 1996), Veränderungen im Schlaf-Wach-Rhythmus (Tobler, I. *et al.*, 1996) und Unterschiede in Lernfähigkeit und Gedächtnis (Nishida, N. *et al.*, 1997). Aus anderen Arbeiten gehen derartige Unterschiede zwischen *Prn-p*<sup>0/0</sup>- und *Prn-p*<sup>+/+</sup>-Mäusen nicht hervor (Büeler, H. *et al.*, 1992; Herms, J. W. *et al.*, 1995; Lledo, P. M. *et al.*, 1996), so daß sich keine klaren Rückschlüsse auf die physiologische Funktion des Prionproteins ziehen lassen.

Auch die Identifizierung potentieller Bindungspartner von PrP<sup>c</sup>, wie GFAP (Oesch, B. *et al.*, 1990), Bcl-2 (Kurschner, C. und Morgan, J. I., 1995), molekularen Chaperonen (Edenhofer, F. *et al.*, 1996), APLP1 (Yehiely, F. *et al.*, 1997), der Lamininrezeptor (Rieger, R. *et al.*, 1998) und ein nicht näher charakterisiertes Membranprotein (Martins, V. R. *et al.*, 1998), haben bislang nicht zur Aufklärung der Funktion von PrP<sup>c</sup> geführt.

Einige Daten stützen die Annahme, daß PrP<sup>c</sup> eine Rolle beim Kupfermetabolismus und dadurch bedingt im Stoffwechsel von Sauerstoffradikalen spielen könnte. So wurde die Bindung von Kupfer an aufgereinigtes PrP<sup>c</sup> nachgewiesen und die Bindungsstelle, die N-terminale Histidin-haltige *octarepeat*-Region des Proteins, lokalisiert (Hornshaw, M. P. *et al.*, 1995). Weiterhin wurde festgestellt, daß die Gehirne von *Prn-p*<sup>0/0</sup>-Mäusen weniger membrangebundenes Kupfer enthalten als die Hirne von *Prn-p*<sup>+/+</sup>-Mäusen (Brown, D. R. *et al.*, 1997) und daß kultivierte Neurone von *Prn-p*<sup>0/0</sup>-Mäusen durch eine verringerte Aktivität der kupferabhängigen Superoxiddismutase (Brown, D. R. *et al.*, 1997; Kretzschmar, H. A. *et al.*, 1997) oder durch eine erhöhte Konzentration an freiem Kupfer (Brown, D. R. *et al.*, 1998) empfindlicher auf oxidativen Streß reagieren.

### 2.2.2 Die Biosynthese des zellulären Prionproteins

Das zelluläre Prionprotein der Mammalier ist ein evolutionär stark konserviertes Glykoprotein von etwa 250 Aminosäuren. Es wird von einem in einzelner Kopie vorliegendem Gen kodiert, das den gesamten offenen Leserahmen in einem Exon trägt (Basler, K. *et al.*, 1986). Exprimiert wird PrP<sup>c</sup> im adulten Tier vorwiegend in neocorticalen und hippocampalen Neuronen, Purkinje Zellen und spinalen Motoneuronen (Kretzschmar, H. A. *et al.*, 1986; Stahl, N. *et al.*, 1987; Herms, J. *et al.*, 1999). Neben dieser starken neuronalen Expression wird PrP<sup>c</sup> im Gehirn auch in Astrozyten, Oligodendrozyten (Moser, M. *et al.*, 1995) und Mikroglia (Brown, D. R. *et al.*, 1998) und außerhalb des Gehirns in Leukozyten, Makrophagen (Cashman, N. R. *et al.*, 1990) sowie insbesondere während der Embryogenese in vielen weiteren Organen exprimiert (Manson, J. *et al.*, 1992).

Das murine PrP-Gen (*Prn-p*) kodiert ein Membranprotein, das vor der zellulären Prozessierung 254 Aminosäuren umfaßt (Westaway, D. *et al.*, 1994). Nach der Proteinsynthese am Endoplasmatischen Retikulum (ER) und der Abspaltung des 22 Aminosäuren umfassenden *N*-terminalen Signalpeptids, finden im ER unterschiedliche posttranslationale Modifikationen statt. Im Verlauf der Proteinfaltung kommt es zur Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten 178 und 213, das Protein wird über die Asparaginseitenketten 180 und 196 zum Teil *N*-glykosidisch glykosyliert (Haraguchi, T. *et al.*, 1989), und unter Abspaltung der aus 23 Aminosäuren bestehenden *C*-terminalen hydrophoben Sequenz erfolgt die Anheftung einer Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI) Gruppe an den *C*-Terminus des Proteins (Stahl, N. *et al.*, 1990). Im Golgi-Apparat erfolgt die terminale Glykosylierung und die Anheftung von Sialinsäureresten an die Kohlenhydrateinheiten und den GPI-Anker (Caughey, B. *et al.*, 1989; Stahl, N. *et al.*, 1992). Letztlich wird PrP<sup>c</sup> über die GPI-Gruppe in der äußeren Zellmembran verankert, wo es sowohl in unglykosylierter als auch in einfach oder vollständig glykosylierter Form vorliegt (Endo, T. *et al.*, 1989). In Abbildung 2 A und B (Seite 9) ist die Prozessierung von PrP<sup>c</sup> schematisch dargestellt.

### 2.2.3 Der subzelluläre Zyklus des Prionproteins

Das Prionprotein verbleibt nach seiner Synthese nicht an der Zelloberfläche, sondern unterliegt, wie aus zellbiologischen Untersuchungen von Hühner-PrP<sup>c</sup> (chPrP) überexprimierenden Zelllinien geschlossen werden kann, einem konstitutiven zellulären Zyklus zwischen Plasmamembran und einem intrazellulären Kompartiment. Hinweise darauf liefert die Beobachtung, daß die posttranslationale proteolytische Spaltung von PrP<sup>c</sup> (siehe Absatz 2.2.4) durch Brefeldin A und lysomotrophe Amine sowie durch Leupeptin und Aprotinin inhibiert wird, die Spaltung demnach intrazellulär, vermutlich innerhalb der Endosomen stattfindet (Shyng, S. L. *et al.*, 1993). Ein weiterer Hinweis ergibt sich daraus, daß fluoreszenzmarkierte anti-PrP-Antikörper von der Zelloberfläche ins

Innere der Zellen gelangen. Zudem kann die Aufnahme von chPrP ins Zellinnere sowie der erneute Transport zur Zelloberfläche durch Iodinierungs- und Biotinylierungsexperimente gezeigt werden (Lehmann, S. *et al.*, 1999; Harris, D. A., 1999). In Neuroblastomzellen beträgt die Halbwertszeit des Proteins vier bis sechs Stunden (Caughey, B. *et al.*, 1989), ein PrP<sup>c</sup>-Molekül verbleibt mit einer Halbwertszeit von etwa zwanzig Minuten an der Zelloberfläche und folgt dann wiederholt dem etwa sechzigminütigen Zyklus durch die Zelle (Taraboulos, A. *et al.*, 1992). Während jeder Passage werden ein bis fünf Prozent der Moleküle proteolytisch gespalten (Shyng, S. L. *et al.*, 1993). Das *N*-terminale Spaltprodukt wird freigesetzt und das *C*-terminale Spaltprodukt verbleibt an der Zelloberfläche und wird nur äußerst langsam wieder internalisiert (Shyng, S.-L. *et al.*, 1995).

Der Mechanismus der Aufnahme von PrP<sup>c</sup> ins Zellinnere ist noch nicht endgültig geklärt. Viele Membranproteine werden über spezielle Einfaltungen der Plasmamembran, den sogenannten *clathrin coated pits*, endozytiert (Schmid, S. L., 1997). Einige Studien sprechen dafür, daß auch das Prionprotein auf diese Weise ins Zellinnere gelangt. So wird chPrP in chPrP überexprimierenden Neuroblastomzellen durch elektronenmikroskopische Immunogoldlokalisation in diesen Organellen detektiert und bei der Aufreinigung von *coated vesicles* angereichert. Zudem ist gezeigt, daß die Zerstörung der Clathrinschicht die chPrP-Endozytose inhibiert (Shyng, S. L. *et al.*, 1994). Da PrP<sup>c</sup> als GPI-verankertes Protein ohne cytoplasmatische Domäne mit der Clathrinschicht auf der Innenseite der Plasmamembran als Signal für die Internalisierung nicht interagieren kann (Schmid, S. L., 1997), wird ein transmembraner Rezeptor für PrP<sup>c</sup> postuliert, der diese Funktion übernimmt. Aus Versuchen mit PrP-Deletionsmutanten überexprimierenden Zellen, die zeigen, daß der *N*-Terminus des Prionproteins essentiell für die Clathrin-gesteuerte Aufnahme ins Zellinnere ist, schließt man, daß dieser Bereich für die Bindung an den Rezeptor verantwortlich ist (Shyng, S.-L. *et al.*, 1995; Harris, D. A. *et al.*, 1996). Die in einer Studie beobachtete Stimulation der Endozytose durch Kupfer ist möglicherweise einer durch Kupferbindung gesteigerten Affinität von PrP<sup>c</sup> zum Rezeptor zuzuschreiben (Pauly, P. C. und Harris, D. A., 1998). Im Gegensatz zu diesen Daten stehen Untersuchungen, die dafür sprechen, daß GPI-verankerte Proteine von der Endozytose über *Clathrin Coated Pits* ausgeschlossen sind und über sogenannte Caveolae aufgenommen werden (Anderson, R. G. W., 1993; Harme, J. H. *et al.*, 1995; Vey, M. *et al.*, 1996). Allerdings sind in neuronalen Zellen keine morphologisch erkennbaren Caveolae detektierbar und eine Caveolin-Expression ist in diesen Zellen nicht nachweisbar (Shyng, S. L. *et al.*, 1994). Dennoch wird PrP<sup>c</sup> gemeinsam mit anderen GPI-verankerten Proteinen in großen Detergenz-resistenten Komplexen, die Cholesterol und Sphingolipide sowie Signalmoleküle und G-Protein-Untereinheiten enthalten, aufgereinigt, die möglicherweise biochemische Equivalente der Caveolae ohne Caveolin darstellen könnten (Chang, W.-J. *et al.*, 1994; Taraboulos, A. *et al.*, 1995; Gordinsky, A. und Harris, D. A., 1995).

### 2.2.4 Die Spaltung des Prionproteins

Innerhalb seines normalen Metabolismus unterliegt ein geringer Teil der synthetisierten PrP<sup>c</sup>-Moleküle posttranslationalen Spaltungen, deren Lokalisation im Protein in Abbildung 2 B und C durch Pfeile gekennzeichnet ist.

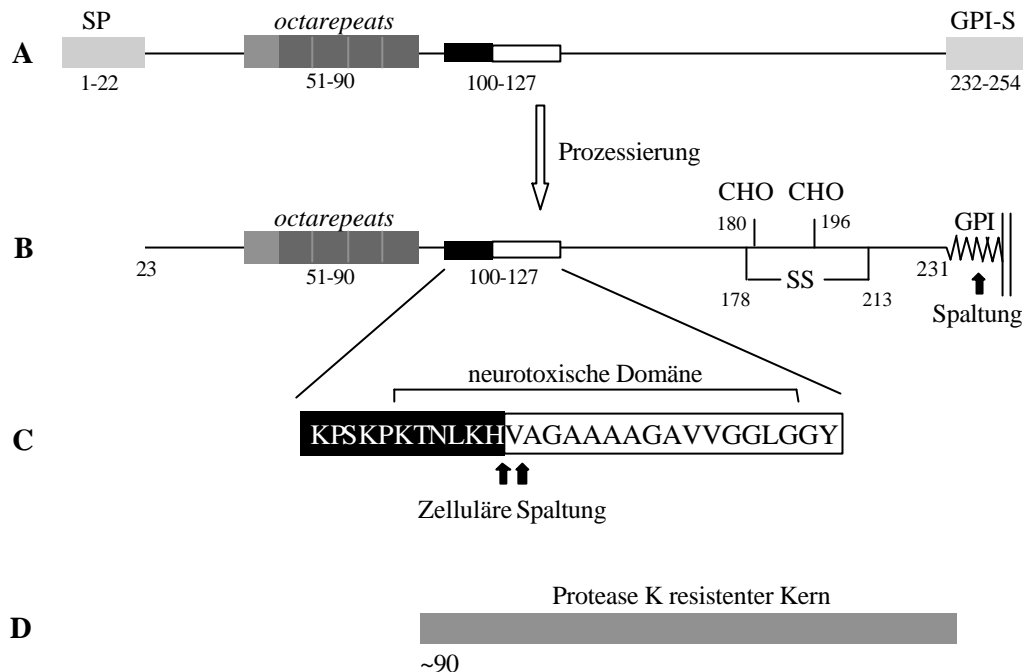


Abbildung 2: Schematische Darstellung des murinen Prionproteins vor (A) und nach der Prozessierung (B). Die zentrale Region des Proteins (AS 100-127) mit der neurotoxischen Domäne (AS 105-125) ist hervorgehoben (C). Der Proteinase-K-resistente Kern des Proteins ist als grauer Balken dargestellt (D).

Bezeichnungen: SP: Signalpeptid (AS 1-22), *octarepeats*: fünfmalige P(Q/H)GG(T/G/S)W GQ-Sequenzwiederholung (AS 51-90), GPI-S: Signalsequenz zur Anhängung des GPI-Ankers (AS 232-254), CHO: N-glykosidisch verknüpfte Glykosylierung (AS 180 und 196), SS: Disulfidbrücke zwischen den AS 172 und 213, GPI: GPI-Anker, Schwarze Box: basische Region, weiße Box: hydrophobe Region. Die unterschiedlichen Spaltstellen sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet.

Eine dieser Spaltungen findet wie in Abbildung 2 B gezeigt innerhalb des GPI-Ankers statt und löst damit das Protein von der Zellmembran ab (Borchelt, D. R. *et al.*, 1993). Die zelluläre Lokalisation dieser Spaltung ist nicht bekannt, wahrscheinlich ist jedoch, wie bei anderen GPI-verankerten Proteinen, eine an der Zelloberfläche lokalisierte Phospholipase dafür verantwortlich (Low, M. G., 1989). Unterschiedliche Untersuchungen belegen, daß nicht mehr als zehn Prozent der PrP<sup>c</sup>-Moleküle diesem Prozeß unterliegen (Caughey, B. *et al.*, 1991; Taraboulos, A. *et al.*, 1992; Chen, S. G. *et al.*, 1995). Ob die Abspaltung des Prionproteins von der Zellmembran einen katabolischen oder sekretorischen Vorgang darstellt ist nicht geklärt.

Die zweite Spaltung ist proteolytischer Natur und findet wie in Abbildung 2 C dargestellt innerhalb der zentralen Region des Prionproteins statt. Erste Hinweise auf die proteolytische Spaltung des zellulären Prionproteins resultieren aus der Anreicherung und Aufreinigung von PrP<sup>c</sup> aus Hirnen des Syrischen Hamsters (SHaPrP). Die Aufreinigung ergibt zwei sich im Molekulargewicht unterscheidende SHaPrP Formen: das 28 kDa Protein PrP-I und das 18 kDa Protein PrP-II. PrP-II ist als C-terminales Proteinfragment von PrP-I identifiziert (Pan, K. M. *et al.*, 1992). Sowohl für das PrP<sup>c</sup>-Homologon des Huhns (ChPrP) (Harris, D. A. *et al.*, 1993) als auch für das humane Prionprotein (huPrP) ist die zelluläre Spaltung inzwischen gezeigt (Chen, S. G. *et al.*, 1995; Jimenez-Huete, A. *et al.*, 1998). Die Spaltung von chPrP resultiert in zwei leicht detektierbaren Spaltprodukten, wohingegen die Spaltung von huPrP bislang ausschließlich über den Nachweis des als C1 bezeichneten C-terminale Spaltproduktes charakterisiert werden kann. Wie durch N-terminale Sequenzierung dieses C-terminalen Spaltproduktes gezeigt ist, ist die Spaltstelle des humanen PrP<sup>c</sup> am Codon 111 (Histidin) oder Codon 112 (Methionin) und somit in der evolutionär hochkonservierten zentralen Region des Proteins lokalisiert (Chen, S. G. *et al.*, 1995). Aus Abbildung 2 C ist zu entnehmen, daß die Spaltstelle N-terminal von einer Region mit basischem und C-terminal von einer Region mit stark hydrophoben Charakter flankiert wird, was für die Determination der Spaltstelle von Bedeutung sein könnte (siehe Absatz 3). Die Inhibition der Spaltung durch lysomotrophe Amine, Leupeptin und Aprotinin deutet darauf hin, daß diese in einem saurem Kompartiment innerhalb der Zelle stattfindet (Shyng, S. L. *et al.*, 1993). Gleichzeitig gibt es differierende Hinweise darauf, daß Cholesterol-reiche Domänen der Plasmamembran an diesem Prozeß beteiligt sind (Caughey, B. *et al.*, 1991; Taraboulos, A. *et al.*, 1995). Die physiologische Bedeutung der zellulären Spaltung des Prionproteins ist noch ungeklärt. Das N-terminale Spaltprodukt von etwa neun Kilodalton könnte beispielsweise einen biologisch aktiven Liganden mit Signalfunktion darstellen. Alternativ dazu könnte die Spaltung auch zur Regulation der physiologischen Funktion des Proteins dienen. Es ist auch nicht ausgeschlossen, daß die zelluläre Spaltung des Prionproteins einen frühen Schritt bei der Degradation des Proteins im Verlauf seines normalen Katabolismus darstellt. Interessanterweise zerstört die proteolytische Spaltung in der zentralen Region des Proteins den Protease-resistenten Kern von PrP<sup>S<sup>c</sup></sup>, der in Abbildung 2 D schematisch dargestellt ist. Weiterhin schließt die die Spaltstelle beinhaltende zentrale Region (AS 100-127) die sich aus den Aminosäuren 106 bis 126 des humanen PrP<sup>c</sup> zusammensetzende sogenannte neurotoxische Domäne des Prionproteins (AS 105-125) ein (siehe Absatz 2.2). Somit besteht auch die Möglichkeit, daß die Spaltung des zellulären Prionproteins eine Bedeutung für die Entstehung und Ausprägung von Prionerkrankungen haben könnte.



### 3 AUFGABENSTELLUNG

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist es, die in Kapitel 2.2.4 beschriebene zelluläre Spaltung von PrP<sup>C</sup> in der zentralen Region des Proteins und die zugehörige in Abbildung 2 C dargestellte Spaltstelle genauer zu charakterisieren.

Dazu soll neben weiteren Analysen auch die von Callebaut *et al.* (1994) aufgrund zahlreicher Aminosäuresequenzvergleiche aufgestellten Hypothese, die Spaltstelle des Prionproteins sei den Spaltstellen vieler viraler Vorläuferhüllproteine homolog und funktionell möglicherweise ähnlich, überprüft werden. Die Homologie zwischen den unterschiedlichen Spaltstellen, die in Abbildung 3 schematisch dargestellt ist, besteht in einer Akkumulation basischer Aminosäuren *N*-terminal der Spaltstellen und einer Akkumulation kleiner hydrophober Aminosäuren *C*-terminal der Spaltstellen (Callebaut, I. *et al.*, 1994).

Es soll im folgenden durch die Erzeugung und Untersuchung mutagenisierter Prionproteine analysiert werden, ob diese Aminosäuren tatsächlich für die Determination der Spaltstelle verantwortlich sind.

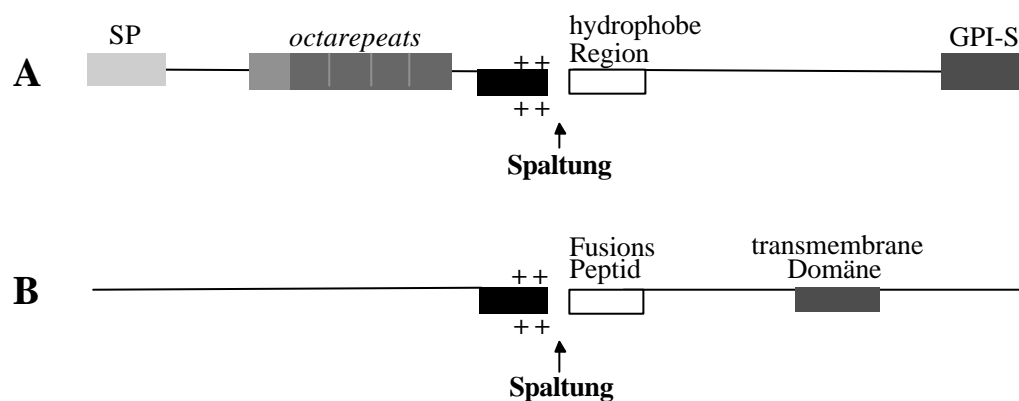


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Homologie der proteolytischen Spaltstelle des Prionproteins (A) zur Spaltstelle verschiedener viraler Vorläuferhüllproteine (B) (Callebaut, I. *et al.*, 1994).

Bezeichnungen: SP: Signalpeptid, *Octarepeats*: fünfmalige P(Q/H)GG(T/G/S)WGQ Sequenzwiederholung, GPI-S: Signalsequenz zur Anhängung des GPI-Ankers, schwarze Box: basische Region, weiße Box: hydrophobe Region, +: Anhäufung basischer Aminosäuren.

## 4 MATERIALIEN

### 4.1 BAKTERIENSTÄMME

#### *Escherichia coli*

**DH1** (Hanahan, D., 1983)

[F<sup>-</sup>, *endA1*, *hsdR17* (r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>-</sup>), *thi1*, *recA1*, *gyrA96*(Na<sup>F</sup>), *spoT1*, *rfbD1*, LAM-, *glnV44*(AS)]

**DH5a** (Hanahan, D., 1983)

[F<sup>-</sup>, *endA1*, *hsdR17* (r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>-</sup>), *supE44*, *thi1*, *recA1*, *gyrA*(Na<sup>F</sup>), *relA1*, Δ(lacZYA-argF)U169, Φ80 lacZΔM15]

**BL21(DE3)pLysS** (Studier, F. W. und Moffatt, B. A., 1986)

[F<sup>-</sup>, *ompT*, *hsdS<sub>B</sub>*(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>), *gal*, *dcm*, Δ(*srl-recA*), **306**:Tn**10**, (DE3), pLysS]

### 4.2 PLASMIDE

**PBluescript II SK(+/-)** (STRATAGENE, Heidelberg)

Klonierungsvektor (Ap<sup>r</sup>)

**pCIneo** (PROMEGA, Heidelberg)

Eukariontischer Expressionsvektor (Ap<sup>r</sup>, Neo)

**pET21d(+)** (NOVAGEN, Madison)

Prokariotischer Expressionsvektor (Ap<sup>r</sup>)

### 4.3 OLIGODESOXYRIBONUKLEOTIDE

Unmarkierte Oligodesoxyribonukleotide lieferten die Firmen **MWG BIOTECH, Ebersberg** und **GIBCO-BRL, Eggenstein**. IRD-800-markierte Oligonukleotide lieferte die Firma **MWG BIOTECH, Ebersberg**.

### **4.3.1 Oligodesoxyribonukleotide als Primer für Nukleotidsequenzanalysen**

IR\*: Infrarot-Markierung durch IRD-800 nach der Synthese.

M13rev-800 (24mer)

IR\*-d(GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG)

M13uni-800 (23mer)

IR\*-d(AGG GTT TTC CCA GTC ACG ACG TT)

T3-800 (20mer)

IR\*-d(AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG)

T7-800 (22mer)

IR\*-d(GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C)

T7neo-800 (20mer)

IR\*-d(TAA TAC GAC TCA CTA TAG GC)

### **4.3.2 Oligodesoxyribonukleotide als Primer für Polymerasekettenreaktionen**

#### **4.3.2.1 Oligodesoxyribonukleotide für Polymerasekettenreaktionen**

M13rev (24mer)

d(GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG)

M13uni (23mer)

d(AGG GTT TTC CCA GTC ACG ACG TT)

T3 (20mer)

d(AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG)

T7 (22mer)

d(GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C)

T7neo (20mer)

d(TAA TAC GAC TCA CTA TAG GC)

#### 4.3.2.2 Oligonukleotide für gezielte Mutagenese (SOE-PCR)

13A5up (18mer)  
d(CCAAAATGCATCATGGGC)

13A5do (18mer)  
d(CCCATGATGCATTTTGGC)

AlaGly/Ileup (36mer)  
d(TAT GAT AAT TAT GAT AAT GAT TAT CAC ATG CTT GAG)

AlaGly/Iledo (36mer)  
d(ATA ATC ATT ATC ATA ATT ATC ATA GTA GTG GGG GGC)

Ala/Ileup (36mer)  
d(TAT CCC AAT TAT GAT AAT CCC TAT CAC ATG CTT GAG)

Ala/Iledo (36mer)  
d(ATA GGG ATT ATC ATA ATT GGG ATA GTA GTG GGG GGC)

Ala112/114Glyup (21mer)  
d(ACC CCC TCC CAC ATG CTT GAG)

Ala112/114Glydo (24mer)  
d(GTG GGA GGG GGT GCG GCA GCT GGG)

Ala115/116Glyup (21mer)  
d(AGC TCC CCC AGC CCC TGC CAC)

Ala115/116Glydo (21mer)  
d(GCT GGG GGA GCT GGG GCA GTA)

Ala117/119Glyup (21mer)  
d(TCC CCC ACC TGC CGC AGC CCC)

Ala117/119Glydo (24mer)  
d(GCA GGT GGG GGA GTA GTG GGG GGC)

Ala116Valup (21mer)  
d(CCC AGC CAC CGC AGC CCC TGC)

Ala116Valdo (18mer)  
d(GCG GTG GCT GGG GCA GTA)

C-Terminusup (24mer)

d(AGC CCC TGC CAC GCA GAG GCC GAC)

C-Terminusdo (24mer)

d(GTC GGC CTC TGC GTG GCA GGG GCT)

Gly/Ileup (30mer)

d(GAT AGC TGC CGC AGC GAT TGC CAC ATA CTT)

Gly/Iledo (30mer)

d(ATC GCT GCG GCA GCT ATC GCA GTA GTG GGG)

Gly105up (30mer)

d(ATG CTT GAG GTT GGT TCC TGG TTT GCT GGG)

Gly105do (30mer)

d(GGA ACC AAC CTC AAG CAT GTG GCA GGG GCT)

Gly109up (30mer)

d(ATG CCC GAG GTT GGT TTT TGG TTT GCT GGG)

Gly109do (30mer)

d(AAA ACC AAC CTC GGG CAT GTG GCA GGG GCT)

Gly110up (30mer)

d(ACC CTT GAG GTT GGT TTT TGG TTT GCT GGG)

Gly110do (30mer)

d(AAA ACC AAC CTC AAG GGT GTG GCA GGG GCT)

3Glyup (30mer)

d(ACC CCC GAG GTT GGT TCC TGG TTT GCT GGG)

3Glydo (30mer)

d(GGA ACC AAC CTC GGG GGT GTG GCA GGG GCT)

$\Delta$ AlaGlyup (24mer)

d(GCC CCC CAC TAC CAC ATG CTT GAG)

$\Delta$ AlaGlydo (24mer)

d(CTC AAG CAT GTG GTA GTG GGG GGC)

$\Delta$ *SmaI*up (19mer)

d(CCC TGC CCA GGA TAC CGG C)

$\Delta$ *SmaI*do (20mer)

d(CGG TAT CCT GGG CAG GGA AG)

$\Delta$ 105-111up (24mer)

d(AGC CCC TGC CAC TGG TTT CGT GGG)

$\Delta$ 105-111do (24mer)

d(CCC AGC AAA CCA GTG GCA GGG GCT)

$\Delta$ 111-125up (24mer)

d(CAG CAT GTA GCC ATG CTT GAG GTT)

$\Delta$ 111-125do (24mer)

d(AAC CTC AAG CAT GGC TAC ATG CTG)

$\Delta$ 105-125up (30mer)

d(CCA GCA TGT ACC CGG GTT TGC TGG GCT TGT)

$\Delta$ 105-125do (29mer)

d(CAG CAA ACC CGG GTA CAT GCT GGG GAG CG)

His177Glyup (21mer)

d(GAC GTC GCC CAC GAA GTT GTT)

His177Glydo (18mer)

d(GTG GGC GAC TGC GTC AAT)

3Ser100up (28mer)

d(TAC TTG GTG AGC TGG GAC TGT TCC ACT G)

3Ser100do (25mer)

d(CAG TCC CAG CTC ACC AAG TAC CAA C)

3Ser105up (29mer)

d(CAC AGA CGA GAG GTT GGT ACT TGG TTT GC)

3Ser105do (23mer)

d(ACC AAC CTC TCG TCT GTG GCA GG)

Tyr128Glyup (21mer)  
d(CAG CAT GCC GCC ACC AAG GCC)

Tyr128Glydo (18mer)  
d(GGC GGC ATG CTG GGG AGC)

Tyr128Pheup (21mer)  
d(CAG CAT GAA GCC ACC AAG GCC)

Tyr128Phedo (18mer)  
d(GGC TTC ATG CTG GGG AGC)

Val111Glyup (24mer)  
d(AGC CCC TGC CCC ATG CTT GAG GTT)

Val111Glydo (18mer)  
d(GGG GCA GGG GCT GCG GCA)

Val111Ileup (24mer)  
d(AGC CCC TGC GAT ATG CTT GAG GTT)

Val111Iledo (18mer)  
d(ATC GCA GGG GCT GCG GCA)

### 4.3.3 Oligonukleotide für die direkte Klonierung

Ala/Glyup (63mer)  
d(ACC AAG GCC CCC CAC TAC TCC CCC ACC TCC CCC ACC CCC TCC  
CAC ATG CTT GAG GTT GGT TTT)

Ala/Glydo (63mer)  
d(AAA ACC AAC CTC AAG CAT GTG GGA GGG GGT GGG GGA GGT GGG  
GGA GTA GTG GGG GGC CTT GGT)

Gly/Alaup (63mer)  
d(ACC AAG GCC CCC CAC TAC TGC CGC AGC TGC CGC AGC CGC TGC  
CAC ATG CTT GAG GTT GGT TTT)

Gly/Alado (63mer)  
d(AAA ACC AAC CTC AAG CAT GTG GCA GCG GCT GCG GCA GCT GCG  
GCA GTA GTG GGG GGC CTT GGT)

#### 4.4 DNA-LÄNGENSTANDARDS

**GIBCO BRL GmbH, Eggenstein:** 1 kb DNA-Leiter.

**BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim:** DNA-Längenstandard XV.

**EUROGENTEC SA, Seraing:** Biomarker Low.

#### 4.5 PROTEIN MOLEKULARGEWICHTSTANDARDS

**BIO-RAD GmbH, München:** Prestained SDS-PAGE Standard Broad Range.

#### 4.6 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN

**BIOZYM DIAGNOSTIK, Hess. Oldendorf:** Long Ranger Fertig-Acrylamid-System.

**BIO WHITTAKER, Belgien:** DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) mit 1 g/l Glukose, ohne L-Glutamin, HBSS (Hank's Balanced Salt Solution).

**BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim:** Adenosin-5'-triphosphat (ATP); BCIP, NBT.

**DIFCO, Dreieich:** Bacto-Agar; Bacto-Trypton; Hefe-Extrakt.

**FRESENIUS, Bad Homburg:** AMPUWA.

**GIBCO BRL:** Genetizin G418 Sulfat.

**PAESEL & LOREI, Hanau:** Glycin, Tris-Base.

**PERKIN ELMER, Bedford:** TROPIX *Luminescence Detection Kit*.

**PROMEGA, Mannheim:** 2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).

**QIAGEN, Hilden:** *Plasmid Midi-Kit, QIAamp Tissue Kit, QIAEX II Gel Extraction Kit, QIAquick PCR Purification Kit, Effecten, Superfect*.

**SEROMED BIOCHROM KG, Berlin:** FCS, L-Glutamin, Trypsin/EDTA (10x) 0,2 % (w/v) in PBS, ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>, Penizillin/Streptomycin (P/S).

**SIGMA CHEMIE, Deisenhofen:** Ampizillin, DTT, EDTA, Ethidiumbromid, Mineralöl, Nonidet P-40, PMSF, SDS, Tetracyclin, Tween 20.

**UNITED STATES BIOCHEMICAL, Bad Homburg::** TBE Puffer Konzentrat für Sequenziergele, UREA für Sequenziergele.

Alle sonstigen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen **FLUKA CHEMIE, Neu-Ulm, MERCK, Darmstadt, RIEDEL-DE HAËN, Seelze** und **SERVA, Heidelberg** bezogen.



#### 4.7 ENZYME UND PROTEINE

**AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, Little Chalfont:** *Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP.*

**BOEHRINGER MANNHEIM, Mannheim:** Klenow-Enzym (DNA Polymerase I *large fragment*); Restriktionsendonukleasen; Ribonuklease A (RNase A); T4 DNA-Polymerase; T4 Polynukleotid-Kinase; *DIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids.*

**DAKO, Glostrup:** Ziege anti Maus Immunglobuline, alkalische Phosphatase gekoppelt; Ziege anti Kaninchen Immunglobuline, alkalische Phosphatase gekoppelt.

**DIANOVA, Hamburg:** Ziege anti Maus Immunglobuline, alkalische Phosphatase gekoppelt.

**GIBCO BRL, Eggenstein:** Restriktionsendonukleasen.

**NEW ENGLAND BIOLABS, Bad Schwalbach:** Restriktionsendonukleasen, T7 DNA-Polymerase, PNGaseF.

**PHARMACIA, Freiburg:** Protein A Sepharose, Restriktionsendonukleasen.

**PROMEGA / BOEHRINGER INGELHEIM, Heidelberg:** Restriktionsendo-nukleasen, S1-Nuklease, T4 DNA-Ligase, *Taq* DNA Polymerase.

**SERVA, Heidelberg:** Albumin aus Rinderserum (BSA).

**SIGMA, Deisenhofen:** Poly-L-Lysin, Proteinase K.

**UNITED STATES BIOCHEMICAL, Bad Homburg:** *E. coli Single Strand Binding Protein* (SSB).

#### 4.8 SONSTIGE MATERIALIEN UND GERÄTE

**AESCLAP, Tuttlingen:** Chirurgisches Besteck.

**AIR LIQUIDE, Düsseldorf:** Stickstofftank Espace 330.

**BECKMAN, München:** Zentrifuge Avanti J-25, J2-HS Centrifuge, JA-17 Rotor, JS-13.1 Rotor.

**BENDER & HOBEIN AG, Zürich:** Vortex Genie 2.

**BIOMETRA, Göttingen:** PCR-Gerät TRIO-Thermoblock, Elektrophorese Stromversorger Power Pack P25, El. Phor. Power Pack P24, Whatman 3 MM Chromatographiepapier.

**BIO-RAD, München:** Wide Mini-Sub Cell GT, Vertikalelektrophoresekammer, Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell, Netzgerät, Power Pac 300 Power Supply.

**BRAND, Wertheim:** Zählkammer nach Neubauer.

**BRAUN, Melsungen:** Vakuum-Exsikkator.

**EPPENDORF, Hamburg:** Kühlzentrifuge Centrifuge 5402; Tischzentrifuge Centrifuge 5415 C, Kühlzentrifuge Centrifuge 5810 R, Thermoblock Thermostat 5320, Thermomixer 5436.

**DRÄGER & HEERHORST, Göttingen:** Sonifizierer, Branson B12.

**GILSON MEDICAL ELECTRONICS, Villiers-le-Bel:** Mikroliterpipetten Pipetman 10 µl, 20 µl, 200 µl und 1000 µl.

**GFL, Göttingen:** Schüttelinkubator 3032.

**GREINER, Nürtingen:** Petrischalen; Röhrchen.

**HELMA, Müllheim/Baden:** Quarzküvetten.

**HERAEUS, Osterode/Harz:** Zentrifuge Minifuge, Sterilisator Kelvitron.

**HYBAID HGS, Heidelberg:** Hybridisierungsöfen Hybaid MINI OVEN, PCR-Block Hybaid OmniGene, PCR-Block Hybaid TouchDown.

**IKA-Labortechnik, Staufen:** beheizbarer Magnetrührer IKAMAG RCT.

**INTAS, Göttingen:** UV-Transilluminator.

**KÖTTERMANN LABORTECHNIK:** Wasserbad; Schüttelwasserbad, Destille.

**LIEBHERR:** Liebherr comfort Kühl- und Gefrierschränke.

**MEMMERT, Schwalbach:** Brutschrank.

**MILLIPORE, Eschhorn:** Immobilon-P Membran.

**MWG BIOTECH, Ebersberg:** Li-COR DNA Sequencer, Horizontal-elektrophoresekammer, Mini-Sub Cell GT.

**NALGENE, Hereford:** Isopropanoltank, Cryo Freezing Container.

**NUNC, Wiesbaden-Biebrich:** Sterilbank Microflow, *Biological Safety Cabinet*; Brutschrank Cellstar, Einfrierröhrchen (2,0 ml) für Zellen, sterile Gewebekulturflaschen, -schalen und -platten.

**OLYMPUS, Japan :** Auflicht Fluoreszent Mikroskop IX50, Spiegelreflexkamera SC35 Type 12.

**PHARMACIA, Freiburg:** Elektrophorese-Stromversorger Power Supply EPS600, Semi dry Transfereinheit, Spektralphotometer Ultrospec 3000.

**POLAROID, Hertfordshire:** Elektronische Sofortbildkamera Kamerasystem MP 4+, Polaroidfilm Typ 667, Iso3000/36.

**RAYTEST, Straubenhardt:** Meßkammer und CCD-Kamera; Computerprogramme Pcbas2.09 und Diana.

**SARSTEDT, Braunschweig:** Petrischalen (10 cm Ø), Pipettenspitzen, sterile Pipetten 2,5 ml; 5 ml; 10 ml; 25 ml, Reaktionsgefäße 0,5; 1,5; 2,0 ml, Zellkratzer (*Policeman*), Zentrifugiergefäße 15 und 50 ml.

**SARTORIUS, Göttingen:** Feinwaage Sartorius analytic, Laborwaage Sartorius.

**SCHLEICHER und SCHÜLL, Dassel:** 0,2 µm und 0,45 µm Membranfilter.

**SCHOTT, Mainz:** Glaswaren.

**SCHÜTT, Göttingen:** pH-Elektrode CG825, Autoklav Bioclav, Autoklav KSG113, Schüttler Heidolph duomax 1030.

**ZEISS, Oberkochen:** Mikroskop Axioskop mit Durchlicht- und Auflichtfluoreszenz (Filtersätze: 487902 und 487909) und Kameraaufsatz; Okulare: Vergrößerung 10x, Sehfeldzahl 20; Objektive: Plan-Neofluar 63x/1.25 Oil, 440480; Plan Neofluar 100x/1.25 Oil, 440460; Acroplan 20x/440845.

## 4.9 NÄHRMEDIEN

### 4.9.1 Nährmedien für *Escherichia coli*

**LB-Medium:** 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 1 % (w/v) Bacto-Trypton, 1 % (w/v) NaCl.

**SOB-Medium:** 0,5 % Hefe-Extrakt, 2,5 mM KCl, 0,05 % NaCl, 2 % Bacto-Trypton, nach dem Autoklavieren mit MgCl<sub>2</sub> und MgSO<sub>4</sub> (Endkonzentration je 10 mM) komplettiert.

**SOC-Medium:** SOB-Medium, nach dem Autoklavieren mit Glukose (Endkonzentration 20 mM) komplettiert.

**TB-Medium:** 1,2 % (w/v) Bacto-Trypton, 2,4 % (w/v) Hefe-Extrakt, 0,4 % (v/v) Glycerin, nach dem Autoklavieren mit steriler Kalium-Phosphat-Lösung (Endkonzentration 17 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 72 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) komplettiert.

Zur Sterilisation wurden die Nährmedien (sofern nicht anders angegeben) 20 min bei 120 °C autoklaviert. Feste Medien enthielten 1,8 % (w/v) Bacto-Agar.

Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren je nach Bedarf zugesetzt: 100 mg/l Ampizillin, 25 mg/l Chloramphenicol, (aus 1000fach konzentrierten Stammlösungen).

Zum Nachweis von β-Galaktosidase-Aktivität auf Indikatorplatten wurde dem SOC-Agar nach dem Autoklavieren Isopropyl-β-D-Thio-Galaktopyranosid (IPTG) (Endkonzentration 1 mM) und 5-Bromo-4Chlor-3Indolyl-β-D-Thio-Galakto-

pyranosid (X-gal) (Endkonzentration 0,004 %) aus entsprechenden Stammlösungen zugegeben.

#### 4.9.2 Nährmedien für eukaryontische Zellen

**DMEM Medium:** 1 g/l Glukose, komplettiert mit 10 % fetalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penizillin, 0,1 mg/ml Streptomycin

Zur Selektion wurden nach Bedarf Genetizin (G418) bis zu einer Endkonzentration von 200-400 µg/ml zugesetzt.

#### 4.10 LÖSUNGEN UND PUFFER

**Alkalische Phosphatase Puffer :** 100 mM Tris-HCl, pH 9,5; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM NaCl.

**Ampizillin-Stammlösung:** 100 mg/ml Ampizillin (Na-Salz) in Wasser; sterilfiltriert.

**APS-Stammlösung:** 10 % Ammoniumperoxodisulfat (APS) in Wasser, frisch angesetzt.

**ATP-Stammlösung:** 200 mM Adenosintriphosphat (ATP).

**Blocking-Puffer:** 0,2 % (w/v) I-Block (Boehringer Ingelheim), 0,1 % (v/v) Tween-20 in PBS-Puffer.

**BCIP-Stammlösung:** 50 mg/ml 5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl-Phosphat (BCIP) in 100 % Dimethylformamid.

**Chemolumineszenz Assaypuffer:** 200 mM Tris-HCl, pH 9,8 10 mM MgCl<sub>2</sub> in Wasser; Lagerung bei 4 °C.

**CIP-Puffer:** 50 mM Tris-HCl; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM ZnCl<sub>2</sub>.

**Coomassie-Farblösung:** 500 mg/l Coomassie Brilliant Blue; 40 % Methanol (v/v); 10 % Eisessig (v/v) in Wasser.

**Detektionspuffer (10x):** 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 mM Tris-HCl, pH 9,5.

**Denaturierungspuffer (10x):** 5 % SDS, 10 % β-Mercaptoethanol.

**dNTP-Stammlösung :** je 25 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP.

**Entfärber-Lösung:** 5 % Methanol, 7,5 % Essigsäure in Wasser.

**Ethidiumbromid-Lösung:** 1 mg/ml Ethidiumbromid in H<sub>2</sub>O.

**G7 Puffer (10x):** 0,5 M Natriumphosphat, pH 7,5.

**HBS-Puffer:** 280 mM NaCl; 10 mM KCl, 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O; 12 mM Dextrose; 50mM HEPES, pH 7,05.

**HNTG-Puffer:** 20 mM HEPES; pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1 % (v/v) Triton-X 100; 10 % (v/v) Glycerol; Lagerung bei 4 °C, dunkel.

**IPTG-Stammlösung:** 1 M Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid (IPTG) in Wasser, sterilfiltriert.

**KGB-Puffer (10x):** 1 M Kaliumglutamat; 250 mM Tris-Acetat, pH 7.5; 100 mM Magnesiumacetat; 500 mg/ml Rinderserumalbumin; 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol.

**Ligase-Puffer:** 50 mM Tris-HCl, pH 7,8; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 20 mM DTT; 1 mM ATP.

**Lysispuffer:** 0,5 % (w/v) Desoxycholsäure; 0,5 % (w/v) Nonidet P-40 in 1x PBS-Puffer.

**Mini I-Lösung:** 50 mM Glukose; 10 mM EDTA; 25 mM Tris-HCl, pH 8.0.

**Mini II-Lösung:** 0,2 M NaOH; 1 % SDS.

**Mini III-Lösung:** 7 M Ammoniumacetat.

**NBT-Stammlösung:** 75 mg/ml 4-Nitrotetrazoliumchloridblau (NBT) in 70 % (v/v) Dimethylformamid.

**Nil-Rot Stammlösung:** 0,4 mg/ml Nil-Rot in DMSO.

**P1-Puffer:** 50 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA, pH 8,0; 100  $\mu$ g/ml RNaseA.

**P2-Puffer:** 200 mM NaOH; 1 % SDS.

**P3-Puffer:** 2,55 M Kaliumacetat, pH 4,8.

**PBS-Puffer:** 0,68 mM NaCl; 0,58 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,17 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

**Phenol/Chloroform:** 25 Vol. Phenol/TE; 24 Vol. Chloroform; 1 Vol. Isoamylalkohol.

**Phenol/TE:** Phenol *p. A.* mit TE-Puffer saturiert; 0.1 % (w/v) 8-Hydroxychinolin.

**PMSF-Stammlösung:** 100 mM PMSF in Isopropanol.

**Proteinase K-Puffer:** 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 1 % SDS.

**Proteinase K-Stammlösung:** 20 mg/ml Proteinase K in Wasser.

**QBT-Puffer (Quiagen):** 750 mM NaCl; 50 mM MOPS; 15 % Ethanol; pH 7,0; 0.15 % Triton X-100.

**QC-Puffer (Quiagen):** 1 M NaCl; 50 mM MOPS; 15% Ethanol; pH 7,0.

**QF-Puffer (Quiagen):** 1.25 M NaCl; 50 mM MOPS; 15% Ethanol; pH 8,2.

**RNaseA-Stammlösung:** 100 mg/ml RNaseA in Wasser.

**SDS-PAGE Laufpuffer:** 250 mM Tris-HCl, pH 8,3; 192 mM Glycin; 0,1% SDS in Wasser.

**SDS-PAGE Probenpuffer (2x):** 125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 20 % (v/v) Glycerin; 4 % (w/v) SDS; 0,02 % (w/v) Bromphenolblau; 200 mM DTT.

**Sucrosefarbmarker:** 60 % Sucrose; 0,05 % Bromphenolblau; 0,05 % Xylencyanol FF in TAE-Puffer.

**TAE-Puffer:** 40 mM Tris-Acetat; 5 mM Na-Acetat; 1 mM EDTA, pH 7,4.

**TB-Puffer:** 10 mM PIPES; 55 mM  $MnCl_2$ ; 15 mM  $CaCl_2$ ; 250 mM KCl; pH 6,7 mit KOH eingestellt.

**TBE-Puffer:** 89 mM Tris-Base; 89 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA.

**TBS-Puffer:** 20 mM Tris-Base, pH 7,6 mit HCl; 137 mM NaCl in Wasser.

**TE-Puffer:** 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA, pH 8,0.

**Transferpuffer:** 25 mM Tris-HCl, pH 8,3; 192 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol.

Alle Puffer und Lösungen wurden soweit nicht anders angegeben mit demineralisiertem und destilliertem Wasser angesetzt.

## 5 METHODEN

Alle Arbeitstechniken wurden sofern nicht anders angegeben nach Sambrook *et al.* durchgeführt (Sambrook, J. *et al.*, 1989).

### 5.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

#### 5.1.1 Behandlung von Geräten und Lösungen

Hitzestabile Geräte und Lösungen wurden zur Inaktivierung von Nukleasen autoklaviert (20 min, 121 °C). Nicht hitzestabile Geräte wurden mit 70 % (v/v) Alkohol gespült und anschließend getrocknet; hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert.

#### 5.1.2 Anzucht und Lagerung von *Escherichia coli*

*E. coli*-Stämme wurden bei 37 °C in LB-Medium angezogen, welches bei plasmidtragenden Bakterien mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt wurde. Um eine gute Luftzufuhr zu gewährleisten, wurden Kulturen bis zu 5 ml Volumen in Kulturröhrchen geschüttelt. Kulturen im größeren Maßstab, 20 ml bis 1 l, wurden in Kolben entsprechender Größe (5x Kulturvolumen) bei bis zu 260 Upm in einem Schüttelinkubator geschüttelt.

Das Wachstum der Zellen wurde durch Trübungsmessung in einem Spektrophotometer (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, Freiburg) bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD<sub>600</sub>) gegen Medium verfolgt. Zur Messung wurde die Suspension so verdünnt, daß die Extinktion einen Wert von 0,3 nicht überschritt.

Zur dauerhaften Lagerung von Bakterienstämmen dienen Glycerinkulturen, wobei Übernachtskulturen des entsprechenden Stammes mit sterilem Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 50 % (v/v) verdünnt und bei -20 °C gelagert wurden. Alternativ dazu wurden Bakterienstämme in 7 % (v/v) DMSO langfristig bei -70 °C gelagert.

#### 5.1.3 Transformation von *Escherichia coli*

##### 5.1.3.1 Herstellung kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Zur Präparation der kompetenten Zellen (Inoue, H. *et al.*, 1990) wurden 250 ml SOB-Medium in einem 2 l Kolben mit Zellen des entsprechenden Stammes (DH1, DH5 $\alpha$ ) angeimpft und über Nacht bei 18 °C und 250 Upm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.6 angezogen. Die Kultur wurde 10 min auf Eis abgekühlt, durch Zentrifugation (1500 g, 10 min, 4 °C) geerntet und die sedimentierten Zellen in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde 10 min auf Eis inkubiert, erneut

geerntet, das Pellet in 20 ml TB-Puffer aufgenommen und DMSO (Endkonzentration 7 %) zugesetzt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden 200 µl Aliquots der Zellsuspension in vorgekühlten Eppendorf-Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

Um die von den Autoren beschriebene Transformationsrate von 1 bis  $3 \times 10^9$  Transformanten pro µg DNA annähernd zu erzielen, war die Durchführung sämtlicher Präparationsschritte bei 4 °C notwendig.

Waren weniger hohe Transformationsraten erforderlich, wurden gefrierkompetente Zellen nach Nishimura *et al.* hergestellt (Nishimura, A. *et al.*, 1990). Die Zellen wurden in 50 ml Medium A (LB-Medium ergänzt durch 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,2 % (w/v) Glukose) bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,4-0,6 angezogen. Die Kultur wurde für 10 min auf Eis abgekühlt, die Zellen abzentrifugiert (1500 g, 10 min, 4 °C) und vorsichtig in 0,5 ml 'Medium A' resuspendiert. Nach Zugabe von 2,5 ml Medium B (LB-Medium ergänzt durch 12 mM MgSO<sub>4</sub>, 36 % (v/v) Glycerin und 12 % (w/v) PEG 6000; sterilfiltriert) und vorsichtigem Durchmischen wurden die kompetenten Zellen in Aliquots zu 0,1 ml aufgeteilt und bei -70 °C gelagert.

### **5.1.3.2 Transformation kompetenter *Escherichia coli*-Zellen**

Zur Transformation wurden die kompetenten Zellen langsam auf Eis aufgetaut und die zu transformierende DNA in möglichst geringem Volumen zugesetzt. Nach 15-30 min Inkubation auf Eis erfolgte der Hitzeshock für 45 s bei 42 °C. Nach dem Abkühlen auf Eis für 1 min wurde 1 ml SOC- oder LB-Medium zugegeben, zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend in Aliquots auf Selektivagar ausplattiert. Transformanten konnten nach Inkubation über Nacht bei 37 °C detektiert werden.

### **5.1.4 Plasmidisolierung aus *Escherichia coli* durch alkalische Lyse (Birnboim, H. C. und Doly, J., 1979)**

#### **5.1.4.1 Plasmidisolierung in analytischen Mengen**

Die Mini-Präparation von DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen-SDS-Lyse. Die das entsprechende Plasmid tragenden Zellen wurden über Nacht bei 37 °C in 3 ml Selektivmedium inkubiert. Die Zellen aus 1,5 ml dieser Kultur wurden durch Zentrifugation (10000 g, 1 min, 4 °C) geerntet, in 100 µl Mini I-Lösung komplettiert mit 100 µg/ml RNaseA resuspendiert, zur anschließenden Lyse mit 200 µl frisch angesetzter Mini II-Lösung versetzt, vorsichtig gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Fällung von SDS, Membranbestandteilen, Proteinen und chromosomaler DNA wurden anschließend 150 µl eiskalte Mini III-Lösung zugesetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (10000 g, 5 min, 4 °C) wurde der Überstand zur Entfernung der



restlichen Proteine mit Phenol/Chloroform extrahiert (Absatz 5.1.5.4) und anschließend mit Ethanol gefällt (Absatz 5.1.5.1). Das gewaschene und getrocknete Pellet wurde in 50 µl TE-Puffer oder Wasser aufgenommen.

Alternativ wurde eine vereinfachte Form der alkalischen Lyse zur Präparation geringer Mengen an Plasmid DNA durchgeführt (Gouill, C. *et al.*, 1994). Die das entsprechende Plasmid tragenden Zellen wurden über Nacht bei 37 °C in 1 ml Selektivmedium inkubiert, die Zellen durch Zentrifugation (10000 g, 1 min, 4°C) geerntet, in 100 µl Mini I-Lösung komplettiert mit 100 µg/ml RNaseA resuspendiert, zur anschließenden Lyse mit 200 µl frisch angesetzter Mini II-Lösung und 200 µl Chloroform versetzt, vorsichtig gemischt und für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 150 µl eiskalte Mini III-Lösung zugesetzt und für 2-3 s gevortext. Nach Überführung der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß erfolgte die Fällung der DNA mit Ethanol (Absatz 5.1.5.1). Das gewaschene und getrocknete Pellet wurde in 50 µl TE-Puffer oder Wasser aufgenommen.

#### **5.1.4.2 Plasmidisolierung in präparativen Mengen**

Die präparative Reinigung von Plasmid-DNA aus 50-100 ml *E. coli*-Kultur erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen SDS-Lyse, die anschließende Reinigung der DNA über Anionenaustauschchromatographie (Quiagen Plasmid Kit; Midi-Präparation). Die das entsprechende Plasmid tragenden Zellen wurden über Nacht bei 37 °C in 50 bis 100 ml Selektivmedium angezogen, durch Zentrifugation (3500 g, 10 min, 20 °C) geerntet, in 4 ml P1-Puffer komplettiert mit 100 µg/ml RNase DNase frei resuspendiert, zur anschließenden Lyse mit 4 ml P2-Puffer versetzt, vorsichtig gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Fällung von SDS, Membranbestandteilen, Proteinen und chromosomaler DNA wurden anschließend 4 ml eiskalter P3-Puffer zugesetzt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden partikuläre Zellbestandteile durch Zentrifugation (20000 g, 4 °C, 30 min) sedimentiert und aus dem klaren Überstand die DNA mittels Anionenaustauschchromatographie gereinigt. Hierzu wurde der Anionenaustauscher (Q-Sepharose) einer "Quiagen-tip 100" Säule mit 3 ml QBT-Puffer äquilibriert und anschließend der Überstand auf die Säule gegeben. Nach Waschen mit 2 x 5 ml QC-Puffer wurde die DNA mit 5 ml QF-Puffer eluiert und durch Zugabe von 3.5 ml Isopropanol gefällt (Absatz 5.1.5.2). Die gewaschene und getrocknete DNA wurde in 100 bis 200 µl TE-Puffer oder Wasser gelöst. Die Präparation größerer DNA Mengen erfolgte nach dem gleichem Prinzip mit erhöhten Mengen an *E. coli*-Kultur und verwendeten Puffern und Lösungen (Quiagen Plasmid Kit; Mega-Präparation).

## 5.1.5 Reinigung von DNA

### 5.1.5.1 Fällung von DNA mit Ethanol

Die Ethanolfällung dient der Konzentrierung von DNA und der Entfernung von Proteinen, Salzen und freien Nukleotiden. Dabei wird die Konzentration monovalenter Kationen erhöht, was die negative Ladung der DNA neutralisiert und dadurch bei Lösungsmittelentzug durch Ethanol die DNA-Fällung ermöglicht.

Die DNA wurde mit 1/10 Vol. 7 M Ammoniumacetat-Lösung und 3 Vol. Ethanol *p.A.* zwischen 5 und 30 min auf Eis gefällt und dann kalt abzentrifugiert (20000 g, 4 °C, 15 min). Das Pellet wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und 10 min unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das DNA-Pellet im Exsikator oder an der Luft getrocknet. Danach wurde die DNA im gewünschten Volumen TE-Puffer aufgenommen.

Sollten Ammoniumacetat-Rückstände vermieden werden, erfolgte die Ethanolfällung mit 1/8 Vol. 4 M Lithiumchlorid-Lösung und 3.5 Vol. Ethanol für 30 min bei -20 °C. Das weitere Vorgehen entsprach der Ethanolfällung mit Ammoniumacetat.

### 5.1.5.2 Fällung von DNA mit Isopropanol

Das Prinzip der DNA-Fällung mit Isopropanol entspricht dem der Fällung mit Ethanol. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, daß weniger Salze ausgefällt werden und daß die Fällung in einem geringeren Gesamtvolumen möglich ist .

Die DNA wurde mit 1/4 Vol. 7 M Ammoniumacetat-Lösung und 1 Vol. Isopropanol für 15 min bei RT gefällt und dann abzentrifugiert (20000 g, 15 min, RT). Das Pellet wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und zentrifugiert (20000 g, 4 °C, 10 min). Der Überstand wurde vollständig entfernt und das DNA-Pellet im Exsikator oder an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die DNA in der gewünschten Menge TE-Puffer aufgenommen.

### 5.1.5.3 Fällung von DNA durch Polyethylenglykol (PEG)

Die Fällung von DNA durch PEG erfolgte durch Zugabe von 6,5 % (w/v) PEG 8000 und NaCl (1 M Endkonzentration) für 1 h auf Eis. Nach Zentrifugation (20000 g, 4 °C, 15 min) wurde das Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und 10 min unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das DNA-Pellet im Exsikator oder an der Luft getrocknet. Danach wurde die DNA im gewünschten Volumen TE-Puffer aufgenommen.

#### **5.1.5.4 Extraktion von DNA mit Phenol/TE, Phenol/Chloroform oder Chloroform**

Die Extraktion von DNA mit Phenol/TE oder Phenol/Chloroform dient der Entfernung von Proteinen aus DNA-Lösungen. Durch anschließende Chloroformextraktion werden Phenolreste entfernt.

Die DNA-Lösung wurde mit 1 Vol. Phenol/TE, Phenol/Chloroform oder Chloroform versetzt und gut gemischt. Zur Beschleunigung der Phasentrennung wurde der Ansatz zentrifugiert (20000 g, RT, 3 min) und anschließend die wäßrige Oberphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

#### **5.1.5.5 Reinigung von DNA mit Hilfe von Glasmilch**

Zur Umpufferung von DNA-Lösungen wurde die DNA durch Adsorption an Glasmilch (QiaEx Gel Extraction Kit) gereinigt. Nach Zugabe von 3 Vol. Puffer QX1 sowie 10-30 µl Glasmilchsuspension wurde zur Bindung der DNA für 10 min bei 50 °C inkubiert. Die Glasmilch mit der daran adsorbierten DNA wurde durch Zentrifugation bei 10000 g für 30 s sedimentiert, der Überstand verworfen und das Pellet einmal mit 500 µl Puffer QX1 und zweimal mit je 500 µl Puffer PE gewaschen, indem die Glasmilchpartikel im jeweiligen Puffer resuspendiert und anschließend wieder pelletiert wurden. Nach dem letzten Waschschritt wurden alle Pufferreste entfernt und das Pellet 10-15 min an der Luft getrocknet. Zur Elution der DNA wurde die Glasmilch in 20-50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen, 5 min bei RT oder 50 °C inkubiert, 30 s bei 10000 g zentrifugiert und der DNA-haltige Überstand in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

#### **5.1.6 Reinigung von DNA aus Agarosegelen**

##### **5.1.6.1 Reinigung von DNA aus Agarosegelen durch Diffusion**

Nach der Agarosegelelektrophorese (Absatz 5.1.8) wurde das die DNA enthaltende Agarosestück aus dem Gel ausgeschnitten und in 200 µl Wasser für 2 bis 24 h bei RT oder 37 °C inkubiert. Auf diese Weise diffundierten kleine DNA-Fragmente (< 1 kb) aus dem Gel in die umgebende Flüssigkeit. Die genauen Bedingungen der DNA-Elution aus dem Gel waren abhängig von der Größe des zu eluierenden DNA-Fragmentes. Dauer und Temperatur stiegen mit der Länge der DNA an.

##### **5.1.6.2 Reinigung von DNA aus Agarosegelen mit Hilfe von Glasmilch**

Einzelne Fragmente aus Spaltungen mit Restriktionsenzymen (Absatz 5.1.9.1) konnten nach Auftrennung des Fragmentgemisches im Agarosegel (Absatz 5.1.8) durch Adsorption an Glasmilch (QiaEx Gel Extraction Kit) isoliert werden. Die

entsprechende Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten, in ein 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 3 Vol. Puffer QX1 und 10-30 µl Glasmilchsuspension durch Inkubation bei 50 °C für 10 min aufgelöst. Die Glasmilch mit der daran adsorbierten DNA wurde durch Zentrifugation bei 10000 g für 30 s sedimentiert, der Überstand verworfen und das Pellet einmal mit 500 µl Puffer QX1 und zweimal mit je 500 µl Puffer PE gewaschen, indem die Glasmilchpartikel im jeweiligen Puffer resuspendiert und anschließend wieder pelletiert wurden. Nach dem letzten Waschschriff wurden alle Pufferreste entfernt und das Pellet 10-15 min an der Luft getrocknet. Zur Elution der DNA wurde die Glasmilch in 20-50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen, 5 min bei RT oder 50 °C inkubiert, 30 s bei 10000 g zentrifugiert und der DNA-haltige Überstand in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Bei Bedarf wurde der Elutionsvorgang wiederholt, um die Ausbeute zu verbessern.

### 5.1.7 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Konzentration in Lösungen wurde photometrisch in einem Spektralphotometer durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Aus der Absorption einer entsprechend verdünnten DNA-Lösung bei 260 nm läßt sich nach dem Lambert-Beerschen Gesetz deren DNA-Konzentration bestimmen. Gemessen wurde gegen Wasser in einer Quarzküvette (Schichtdicke = 1 cm). Zur Berechnung der DNA-Konzentration gilt:

$$1 \text{ OD}_{260} \text{ entspricht } 50 \text{ } \mu\text{g/ml ds DNA}$$

Die Reinheit einer DNA-Lösung kann photometrisch durch eine zusätzliche OD-Bestimmung bei 280 nm überprüft werden. In proteinfreien Proben sollte gelten:

$$\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} \text{ gleich } 2$$

Eine Abschätzung der DNA-Konzentration konnte auch nach gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA (Absatz 5.1.8) über ihre Fluoreszenzintensität unter UV-Licht im Vergleich zum Längenstandard bekannter Konzentration erfolgen.

### 5.1.8 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA wurde in Agarosegelen unterschiedlicher Dimension und Konzentration (0.7 % bis 2 % (w/v) Agarose in TBE-Puffer) durchgeführt. Kurze DNA-Fragmente wurden in hochprozentigen und lange DNA-Fragmente in niederprozentigen Gelen aufgetrennt. Die Agarose wurde im Puffer bis zur vollständigen Lösung aufgeköcht und zur späteren Visualisierung der DNA wurden 0.5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Anschließend wurde das Gel in eine Gelschale gegossen und mit einem Kamm versehen. Nach dem Erstarren wurden die Proben mit mindestens 1/5 Vol. Sucrose-Farbmarker versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Die Elektrophorese wurde bei einer Feldstärke von 5 bis

10 V/cm in TBE Laufpuffer durchgeführt. Die aufgetrennten DNA-Fragmente waren als Banden im UV-Licht (302 nm) sichtbar.

## 5.1.9 Enzymatische Manipulationen an DNA

### 5.1.9.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen unter den vom jeweiligen Hersteller des Enzyms empfohlenen Temperatur- und Pufferbedingungen gespalten. Alternativ dazu wurde häufig auch KGB-Puffer verwendet, in dem fast alle Restriktionsenzyme unter den empfohlenen Konzentrationen maximale Aktivität aufwiesen (Sambrook, J. *et al.*, 1989). Nachteil der Verwendung von KGB-Puffer war die Notwendigkeit einer Fällung (Absatz 5.1.5) vor Gelelektrophoresen.

Für Spaltungen wurde die DNA mit dem gewünschten Restriktionsenzym in einem Volumen von 20 bis 100 µl für 1-12 h bei entsprechender Temperatur inkubiert. In den meisten Fällen wurden eine Enzymmenge von 1U Restriktionsenzym pro µg DNA verwendet. Bei analytischen Spaltungen wurden in der Regel 3 U Restriktionsenzym pro µg DNA in die Reaktion eingesetzt. Bei Partialspaltungen wurde die Inkubationsdauer auf wenige Minuten verkürzt.

Waren bei einer Spaltung mit zwei oder drei Enzymen die Pufferbedingungen nicht kompatibel, so wurde zunächst mit einem Restriktionsenzym gespalten, die DNA über Glasmilch gereinigt (Absatz 5.1.5.5) und anschließend mit dem zweiten Restriktionsenzym gespalten.

### 5.1.9.2 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um eine Religation von mit nur einem Restriktionsenzym oder *blunt end* gespaltenen Vektoren bei der Klonierung zu vermeiden, wurde der Reaktionsansatz nach der Spaltung mit 10 µl 10 x CIP-Puffer versetzt und mit Wasser auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 10 U Alkalischer Phosphatase pro µg DNA wurde der Ansatz 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Isolierung und Aufreinigung der dephosphorylierten DNA-Fragmente erfolgte über Agarosegelelektrophorese (Absatz 5.1.8) und Reinigung über Glasmilch (Absatz 5.1.6.2).

### 5.1.9.3 Erzeugung glatter DNA-Enden

Die Enden von *blunt end* zu klonierenden DNA-Fragmenten wurden in Fill-in Puffer in Gegenwart von jeweils 25 µM dNTPs mit 2U T4 DNA-Polymerase pro µg DNA durch 30 min Inkubation bei 37 °C aufgefüllt bzw. abgebaut. Alternativ dazu wurden 5'-Überhänge mit 6,5 U DNA-Polymerase I aus *E. coli* (Klenow Fragment) in Klenow Reaktionspuffer in Gegenwart von je 1 mM dNTPs pro µg DNA durch 15 min Inkubation bei 37°C aufgefüllt. Der Abbau von 3'-

Überhängen erfolgte alternativ zur Behandlung mit T4 DNA-Polymerase mit S1-Nuklease in S1-Reaktionspuffer. Pro  $\mu\text{g}$  DNA wurden 1 U Enzym eingesetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach jeder der Methoden erfolgte eine sofortige Phenol-Chloroform-Extraktion (Absatz 5.1.5.4) und anschließende Fällung mit Ethanol (Absatz 5.1.5.1).

#### **5.1.9.4 Ligation von doppelsträngiger DNA**

Bei der Ligation von zwei DNA-Fragmenten zu einem zirkulären Produkt wurde das DNA-Insert-Fragment in einem 3 bis 5 fachen molaren Überschuß zum Vektorfragment eingesetzt, wobei die Gesamtkonzentration an DNA 5-10  $\mu\text{g/ml}$  betrug. Die Ligation erfolgte in T4 DNA-Ligase-Puffer mit 2 U T4 DNA-Ligase für 1 h bei 37 °C oder über Nacht bei 15 °C in einem Gesamtvolumen von 15 bis 30  $\mu\text{l}$ . Der Ligationsansatz konnte direkt zur Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen eingesetzt werden (Absatz 5.1.3.2).

#### **5.1.10 Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki, R. K. et al., 1988)**

Die PCR ist eine *in vitro* Methode zur enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA-Segmente. Sie ermöglicht die selektive Vervielfachung eines spezifischen DNA-Fragments auch aus einer komplexen DNA heraus. Die Reaktion basiert auf der Anlagerung (Annealing) und Verlängerung (Extension) zweier Oligonukleotid-Primer, die entgegengesetzt die Zielregion in einer Duplex-DNA flankieren. Die Reaktion besteht aus aufeinanderfolgenden Amplifikationszyklen, die jeweils durch drei Phasen unterschiedlicher Temperatur charakterisiert sind. In der ersten Phase, der Denaturierungsphase, wird die Doppelstrang-DNA durch Erhitzen in Einzelstrang-DNA überführt. Durch das anschließende Absenken der Temperatur in der Annealing-Phase kommt es zur spezifischen Hybridisierung der Oligonukleotid-Primer an die komplementären Zielregion der denaturierten DNA-Matrize. In der Extensions-Phase werden die Primer durch eine thermostabile DNA-Polymerase bei hoher Temperatur komplementär zur Matrize verlängert. In den aufeinanderfolgenden Amplifikationszyklen kommt es zur Akkumulation der durch die beiden Primer flankierten DNA-Sequenz.

##### **5.1.10.1 Polymerasekettenreaktion mit spezifischen Primern**

Die PCR-Bedingungen wurden je nach Länge der zu amplifizierenden Sequenz und Länge und G/C-Gehalt der jeweiligen spezifischen Primer individuell angepaßt. Die Reaktionen wurden meist in 100  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen durchgeführt und enthielten folgende Komponenten: 1 bis 10 ng linearisierte Plasmid-DNA (bei Verwendung chromosomaler DNA bis zu 1  $\mu\text{g}$ ), 20 bis 100 pmol eines jeden Primers, 250  $\mu\text{M}$  jedes dNTPs, 10  $\mu\text{l}$  *Taq* DNA-Polymerase-Puffer (10x), 1 bis 2 mM Magnesiumchlorid und 1 U *Taq* DNA-Polymerase. Zudem wurden in einigen Fällen weitere Komponenten wie 4 % Glycerin, 1,7 % DMSO, 1  $\mu\text{g}$  *E*.

*coli* SSB (Varadaraj, K. und Skinner, D. M., 1994) oder 50 mM Tetramethylammoniumacetat zugesetzt, um die Ergebnisse zu optimieren.

Die Länge und Temperatur der einzelnen Schritte eines Zyklus sowie die Anzahl der Zyklen wurde durch die Wahl der Matrize, die Basenzusammensetzung und Länge der Primer und durch die Länge der zu amplifizierenden Sequenz bestimmt: Nach Denaturierung für 5 min bei 95 °C erfolgte die Zugabe der *Taq* Polymerase bei 85 °C und der Zyklus wurde gestartet (*hot start* PCR). Die Denaturierung erfolgte in der Regel für 30 bis 60 s bei 95 °C, das Primer-Annealing für 30 bis 60 s bei der unten beschriebenen für das verwendete Primerpaar charakteristischen Temperatur und die Elongation für 1 min/kb bei 72 °C; es wurden jeweils 15 bis 35 Zyklen durchgeführt.

Die Schmelztemperatur eines Oligonukleotides berechnete sich wie oben beschrieben (Absatz 5.1.11.1).

Die optimale Annealing-Temperatur für eine Polymerasekettenreaktion erhielt man durch Ermittlung des Mittelwertes für beide Primer und Subtraktion von 3°C vom erhaltenen Wert:

$$T_A^{\text{PCR}}[\text{°C}] = T_{m1} + T_{m2} / 2 - 3 [\text{°C}]$$

#### **5.1.10.2 Einführung von Mutationen durch Polymerasekettenreaktion (SOE-PCR)**

Die PCR eignet sich auch zur gezielten Einführung von Mutationen in bekannte DNA Abschnitte durch rekombinante PCR Techniken wie die SOE-PCR (*splicing by overlap extension*). Bei dieser Technik werden zum einen sogenannte äußere PCR Primer eingesetzt die entgegengesetzt die Zielregion in einer Duplex-DNA flankieren und zusätzlich sogenannte überlappende innere Primer, die die einzuführende Mutation tragen. Das Prinzip der Mutagenese durch SOE-PCR ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt. Zunächst wird in zwei getrennten Reaktionen die 3' und die 5' Hälfte der Zielsequenz mit je einem inneren und einem äußeren Primer wie oben beschrieben amplifiziert. Zur Berechnung der Annealing-Temperatur mußten jeweilige Fehlpaarungen beachtet werden. Nach Entfernung der Primer durch Aufreinigung der PCR-Produkte über Agarosegelelektrophorese (Absatz 5.1.6.2) wurden jeweils etwa 50 ng der 3' und 5' PCR-Produkte gemischt und einer PCR-Reaktion mit den äußeren Primern unterworfen (SOE-PCR). Bei der auf die Denaturierung folgenden Renaturierung während der Annealing Phase kommt es über deren komplementäre Regionen zur Hybridisierung der beiden unterschiedlichen PCR-Produkte miteinander. Die 3' Enden werden dann während der Elongation verlängert, so daß die mutagenisierte Zielsequenz als Produkt entsteht. Diese mutagenisierte Zielsequenz wird dann ausgehend von den beiden äußeren Primern in den folgenden PCR-Zyklen amplifiziert.

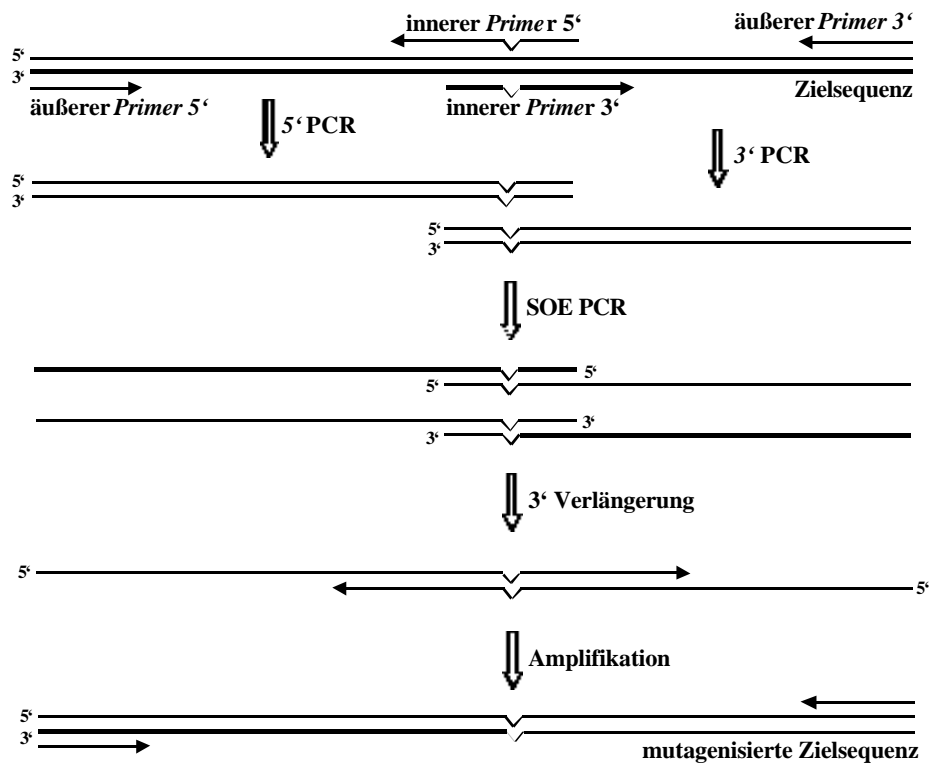


Abbildung 4: Schematische Darstellung der gezielten Mutagenese über SOE-PCR.

Nach Amplifikation der 3' und 5' Region der Zielsequenz mit inneren Mutagenese Primern und äußeren Primern in zwei unabhängigen Reaktionen und der Aufreinigung der Produkte erfolgt die SOE PCR. Hierbei werden die beiden PCR Produkte über ihre homologen Bereiche miteinander verknüpft, die 3' Enden verlängert und die entstehende mutagenisierte Zielsequenz durch die äußeren Primer amplifiziert.

### 5.1.11 Nukleotidsequenzanalyse von DNA (Sanger, F. et al., 1977; Ansorge, W. et al., 1987)

#### 5.1.11.1 Cycle Sequencing (Amersham)

Bei dieser Variante der enzymatischen Sanger-Sequenzierung wurde eine hitzestabile Polymerase verwendet, um die eingesetzte DNA-Matrize in wiederholten Zyklen von Denaturierung, Primerannealing und Elongation mehrfach zu nutzen. Die Vorteile dieser Methode waren die geringe erforderliche Menge an der DNA-Matrize sowie die Verhinderung von Sekundärstrukturen durch die hohen Temperaturen und damit die Vermeidung von dadurch bedingten unspezifischen Kettenabbrüchen.

Für eine Sequenzierung wurden 150 bis 600 fmol linearisierte Matrizen-DNA 2 pmol IRD-800-markierter Primer und 1 µl DMSO eingesetzt und mit demineralisiertem Wasser auf 25 µl aufgefüllt. Je 6 µl dieses Ansatzes wurden auf die in PCR-Reaktionsgefäßen vorgelegten 2 µl Terminationsmische (G, A, T, C) verteilt. Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt gewählt: 2 min 95 °C Denaturierung, dann 30 Zyklen 15 s 95 °C Denaturierung, 30 s Annealing bei der



unten beschriebenen Primer-spezifischen Temperatur und 1 min Elongation bei 72 °C. Nach der Reaktion wurden je 8 µl LI-COR-Farbmarker zugesetzt, denaturiert und ein Aliquot auf das Sequenziergel aufgetragen.

Die Schmelztemperatur eines Oligonukleotides, meist im Bereich von 40 bis 60 °C, berechnete sich nach einer Formel, die sowohl den GC-Gehalt als auch die Länge der Oligonukleotide berücksichtigt:

$$T_m[^\circ\text{C}] = 69.3 + 0.41 \times [\% \text{ GC-Gehalt}] - 650/\text{Länge des Oligonukleotids } [^\circ\text{C}]$$

Die Annealing-Temperatur für das *Cycle Sequencing* erhielt man durch Ermittlung des Mittelwertes für beide Primer und Addition von 3 °C zum erhaltenen Wert:

$$T_{\text{ACS}}[^\circ\text{C}] = (T_{m1} + T_{m2} / 2) + 3 [^\circ\text{C}]$$

### 5.1.11.2 Analyse der Sequenzreaktionen

Die für die Analyse der Sequenzreaktionen auf dem LI-COR-DNA-Sequencer benötigten LI-COR-Sequenzgele (Dimension: 660 x 180 x 0.25 mm) enthielten 4,3 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1). Zur Herstellung der Gele wurden 4,3 ml Long Ranger Acrylamidlösung, 5 ml 10xTBE, 0,5 ml DMSO, 25 µl TEMED, 32 ml Wasser und 21 g Harnstoff bis zur vollständigen Lösung gemischt und sterilfiltriert. Anschließend wurden 250 µl einer 10 %igen APS-Lösung zugesetzt und das Gel sofort gegossen. LI-COR Sequenzgele mit kürzerer Trennstrecke (Dimension 410 x 180 x 0,25 mm) enthielten 6% (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1). Als Laufpuffer diente 0,8 x TBE-Puffer. Nach Auftrag der Sequenzreaktionen erfolgte die Elektrophorese unter folgenden Bedingungen: 2000 V, 37 mA, 50 W, 45 °C Geltemperatur, Motorgeschwindigkeit des Lasers: 3-4.

Die während des Laufs aufgezeichneten Fluoreszenz-Signale wurden mit Hilfe des im LI-COR System enthaltenen Programms Base ImagIR Version 2.30 ausgewertet.

## 5.2 ZELLKULTUR UND ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

### 5.2.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Eukaryontische Zellen wurden in wassergesättigter Atmosphäre bei 10 % CO<sub>2</sub> und 37 °C in DMEM 1 g/l Glukose Medium komplettiert mit 10 % fetalem Kälberserum und 2 mM L-Glutamin in Anwesenheit von 100 U/ml Penizillin und 0,1 mg/ml Streptomycin kultiviert. Die Anzucht erfolgte in Schalen oder Flaschen verschiedener Größe mit entsprechenden Mengen an Medium. Ein Mediumwechsel war in Abhängigkeit von der Zelldichte alle zwei bis vier Tage notwendig. Alle Medien und Lösungen wurden vor Verwendung auf 37 °C

vorgewärmt und sämtliche Arbeiten mit sterilem Plastikmaterial unter der Sterilbank durchgeführt.

### **5.2.1.1 Zellpassage**

Bei Erreichen einer gewissen Zelldichte wurden die Zellen zum weiteren Wachstum im Verhältnis 1:5 bis 1:12 in neue Kulturgefäße überführt. Dazu wurde das Medium gründlich entfernt, die Zellen ein- bis zweimal mit HBSS Puffer gewaschen und dann durch Abklopfen von der Plastikoberfläche gelöst. Anschließend wurden die Zellen in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt, zentrifugiert (200 g, 20 °C, 10 min), das Zellpellet in einer entsprechenden Menge Medium aufgenommen und die Zellen in der gewünschten Dichte ausgesät. Alternativ erfolgte die Zellpassage mit Hilfe der Protease Trypsin. Hierzu wurde das Medium gründlich entfernt und die Zellen in Abhängigkeit von der Zelldichte und dem Zelltyp in einem empirisch ermittelten Volumen Trypsin/EDTA für bis zu 5 min bei 37 °C inkubiert. Das durch die Trypsin verursachte Abrunden und somit Ablösen der Zellen wurde sowohl mikroskopisch als auch makroskopisch kontrolliert. Die Proteaseaktivität wurde durch Zugabe von serumhaltigem Medium beendet, die Zellen vereinzelt und die Zellen in der gewünschten Dichte ausgesät. Bei Bedarf wurde die Zellzahl pro Mililiter durch Auszählen der Zellen im Hämozytometer bestimmt.

### **5.2.1.2 Langfristige Lagerung eukaryontischer Zellen**

Zur langfristigen Lagerung der Zellen wurden diese schonend in Anwesenheit von DMSO eingefroren. Dazu wurden die Zellen in eine 75 cm<sup>2</sup>-Gewebekulturflasche passagiert und beim Erreichen einer 60-90 %igen Konfluenz in ein Zentrifugenröhrchen überführt, pelletiert (200 g, 15 min, 4 °C), in 0,5 ml eiskaltem Medium 1 (80 % DMEM, 20 % FCS) resuspendiert, in mit 0,5 ml Medium 2 (60 % DMEM, 20 % FCS, 20 % DMSO) gefüllte Einfrierröhrchen transferiert und gemischt. Die Röhrchen wurden in einem auf 4 °C vorgekühlten Isopropanoltank langsam auf -70 °C (-1 °C/min) abgekühlt und anschließend in Stickstoff gelagert.

### **5.2.1.3 Auftauen und Revitalisierung langfristig gelagerter Zellen**

Das Einfrierröhrchen wurde nach der Entnahme aus dem Stickstofftank bis zum fast vollständigen Auftauen der Zellen bei 37 °C inkubiert, die Zellsuspension steril in 10 ml Wachstumsmedium überführt und die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 200 g, 4 °C) pelletiert. Nach Aufnahme in komplettiertem DMEM wurden die Zellen in eine Kulturflasche überführt und kultiviert.

## **5.2.2 Stabile und transiente Transfektion eukaryontischer Zellen mit Plasmid-DNA**

Die für alle Transfektionen verwendete Plasmid-DNA wurde durch alkalische Lyse im präparativen Maßstab gewonnen (Absatz 5.1.4.2). Die in Schalen kultivierten zu transfizierenden Zellen befanden sich in der exponentiellen Wachstumsphase mit einer Konfluenz von 20-40 % bei transienter und 50-80 % bei stabiler Transfektion.

### **5.2.2.1 Calciumphosphat-vermittelte Transfektion**

Nach Passage einer entsprechenden Menge an Zellen in eine 60 mm Gewebekulturschale und Wachstum für einen Tag wurden die Zellen mehrfach mit HBSS Puffer gewaschen und anschließend für 2 - 4 h in 3 ml frischem DMEM kultiviert. 20 µg Plasmid-DNA wurden in 220 µl 0,1x TE-Puffer und 250 µl 2x HBS aufgenommen. Zu dieser Mischung wurden 30 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub> langsam zugegeben und der Ansatz für 20-30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Calciumphosphat-DNA-Lösung vorsichtig zum Wachstumsmedium zugegeben.

Für die transiente Transfektion wurden die Zellen für 48 h bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> kultiviert, anschließend lysiert und die Lysate bis zur Weiterverarbeitung bei -70 °C gelagert. Bei stabiler Transfektion erfolgte nach 24 h die Selektion antibiotikaresistenter Zellen mit Selektivmedium (DMEM mit 400 µg/ml G418) welches dann etwa 6 - 8 Wochen als Kulturmedium verwendet wurde. Nach dem Absterben der nicht transfizierten Zellen wurde die Antibiotikakonzentration im Kulturmedium auf 200 µg/ml gesenkt. Die transfizierten Zellen wurden dann als antibiotikaresistente polyklonale Zelllinien gehalten und für die entsprechenden Analysen verwandt.

### **5.2.2.2 Superfect-vermittelte Transfektion**

Nach Passage einer entsprechenden Menge an Zellen in eine 60 mm Gewebekulturschale und Wachstum für einen Tag bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> wurde die Plasmid-DNA-Lösung für die Transformation der Zellen vorbereitet. Dazu wurden 2 µg Plasmid-DNA mit einer minimalen Konzentration von 0,1 µg/ml mit DMEM ohne Serum und Antibiotika zu einem Volumen von 150 µl versetzt, bei transienter Transfektion 30 µl Superfect Transfektionsreagenz bei stabiler Transfektion 20 µl Superfect Transfektionsreagenz zugegeben, vermischt und der Ansatz für 5 - 10 min zur Komplexbildung bei RT inkubiert. Während dieser Inkubation wurde das Kulturmedium von den Zellen entfernt und diese einmal mit 4 ml HBSS gewaschen. Die Plasmid-DNA-Lösung wurde mit 1 ml komplettem DMEM versetzt, gemischt und auf die Zellen gegeben.

Die anschließende Kultur und Selektion der Zellen erfolgte wie oben (Absatz 5.2.2.1).

### 5.2.2.3 Effecten-vermittelte Transfektion

Nach Passage einer entsprechenden Menge an Zellen in eine 60 mm Gewebekulturschale und Wachstum für einen Tag bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> wurde die Plasmid-DNA-Lösung für die Transformation der Zellen vorbereitet. Dazu wurde 1 µg Plasmid-DNA mit einer minimalen Konzentration von 0,1 µg/ml mit EC Puffer zu einem Volumen von 150 µl versetzt, 8 µl Enhancer zugegeben und die Lösung gemischt. Der Ansatz wurde für 2 - 5 min bei RT inkubiert, kurz zentrifugiert, 25 µl Effecten zugesetzt, gemischt und für weitere 5-10 min bei RT inkubiert. Während dieser Inkubation wurde das Kulturmedium von den Zellen entfernt, diese einmal mit 4 ml HBSS gewaschen und mit 4 ml frischem komplettem DMEM überschichtet. Die Plasmid-DNA-Lösung wurde dann mit 1 ml komplettem DMEM versetzt, gemischt und auf die Zellen gegeben.

Die anschließende Kultur und Selektion der Zellen erfolgte wie oben (Absatz 5.2.2.1).

### 5.2.3 Immunfluoreszenz

Für die Untersuchung eukaryontischer Zellen mittels Immunfluoreszenz wurden die Zellen in 24-Well-Platten bis zu einer Konfluenz von 80-90 % kultiviert, das Medium entfernt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Zur Fixierung wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd in PBS überschichtet und 15 min bei RT inkubiert. War eine Permeabilisierung der Zellmembran erwünscht wurde anschließend nach zweimaligem Waschen mit PBS für 2 min bei RT mit 0,2 % Triton X-100 inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit PBS erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungen durch Überschichtung mit 2 % BSA in PBS für 30 min bei RT. Anschließend wurde der entsprechend in PBS-Puffer verdünnte Primärantikörper (AK 3B5: 1:3; AK 13A5: 1:75) auf die Zellen gegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit PBS-Puffer erfolgte die 15-30 min Inkubation mit dem 1:200 verdünnten Sekundärantikörper TRITC-Ziege anti-Maus bei RT und in Dunkelheit. Anschließend wurden die Zellen viermal mit PBS gewaschen und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Ergebnisse wurden photographisch festgehalten.

### **5.3 PROTEINCHEMISCHE METHODEN**

#### **5.3.1 Zellyse und Präparation von Proteinextrakten**

##### **5.3.1.1 Präparation von Hirnhomogenaten**

Zur Gewinnung von Hirngewebe aus Mäusen wurde das Gehirn vorsichtig aus dem kurz zuvor durch Genickbruch getöteten Tier präpariert, die beiden Hemisphären getrennt und entweder direkt weiterverarbeitet oder in sterilen 15 ml Röhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

In einem Homogenisator wurde das Gewebe mit 9 Vol. Lysispuffer versetzt und mit Hilfe des Homogenisator Kolbens zu einer gleichmäßigen Suspension zerkleinert. Anschließend wurde die Suspension zur Zerstörung chromosomaler DNA 15 s bei voller Leistung sonifiziert. Nach Zentrifugation (10000 g, 4 °C, 5 min) wurde der proteinhaltige Überstand abgenommen und aliquotiert. Ein Aliquot wurde zur Proteinkonzentrationsbestimmung entnommen und der Rest bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

##### **5.3.1.2 Präparation von Zellysaten**

Zur Gewinnung von Proteinextrakten aus Zellkulturen wurden die Zellen zunächst zwei- bis dreimal mit PBS gewaschen. Bei Anzucht in Zellkulturschalen wurde der Puffer entfernt, die Schalen auf Eis gestellt und mit 100-500 µl Zellysispuffer überschichtet. Die Zugabe von Proteaseinhibitoren wie PMSF erfolgte in Abhängigkeit von der Weiterverarbeitung der Lysate. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die lysierten Zellen mit Hilfe eines Zellschabers gesammelt und in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß transferiert, kurz gemischt und 15 s bei maximaler Leistung sonifiziert. Nach Zentrifugation (2 min, 20000 g, 4 °C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, ein Aliquot wurde zur Proteinkonzentrationsbestimmung entnommen und der Rest bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert. Bei Anzucht in Zellkulturflaschen wurden die Zellen nach dem Waschen mit PBS vom Boden der Flasche abgespült, in ein Zentrifugenröhrchen transferiert und abzentrifugiert (15 min, 200 g, 4 °C). Das Zellpellet wurde dann mit 300-1000 µl Zellysispuffer versetzt, gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach der Lyse wurde wie oben beschrieben verfahren (Absatz 5.3.1.1).

#### **5.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung**

Die Proteinkonzentration in Rohlysaten wurde photometrisch in einem Spektralphotometer in Quarzküvetten durch Messung der Absorption bei 280 nm

bestimmt. Eine  $OD_{280nm}$  von 1,0 entspricht einer Konzentration von 1 mg/ml (Harlow, E. und Lane, D., 1988).

### 5.3.3 Methanolfällung von Proteinen

Die Methanolfällung diente der Aufkonzentrierung sowie dem Umpuffern von Proteinhomogenaten. Das Homogenat wurde mit 4 Vol. eiskaltem Methanol versetzt und die Proteine für eine Stunde bei  $-70\text{ °C}$  bzw. über Nacht bei  $-20\text{ °C}$  und anschließende Zentrifugation (20000 g,  $4\text{ °C}$ , 5 min) gefällt. Der Überstand wurde verworfen und das Proteinpellet für 10-30 Minute bei  $30\text{ °C}$  getrocknet. Anschließend erfolgte die Aufnahme der Proteine im gewünschten Volumen Zellysispuffer.

### 5.3.4 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation dient zur Anreicherung eines bestimmten Proteins aus Proteingemischen. 100  $\mu\text{l}$  Zell- oder Hirnhomogenat wurden mit 200  $\mu\text{l}$  HNTG Puffer, 20  $\mu\text{l}$  Protein A Sepharose oder Agarose (1:1 in Wasser) und einer vom Antikörper abhängigen Menge an Antikörper oder Antiserum versetzt (1A8 1:100, 3B5 1:1) und mindestens 4 h bei  $4\text{ °C}$  in Bewegung inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (20000 g,  $4\text{ °C}$ , 2 min) wurde das Pellet fünfmal mit je 1 ml HNTG Puffer gewaschen und dann in einem geeigneten Volumen 2x SDS-PAGE-Probenpuffer aufgenommen. Immunpräzipitationen aus dem Zellkulturüberstand wurden auf ähnliche Weise durchgeführt. 1 ml Zellkulturüberstand wurde mit HEPES pH 7,5 zu einer Endkonzentration von 20 mM versetzt, 20  $\mu\text{l}$  Protein A Sepharose oder Agarose (1:1 in Wasser) und eine entsprechende Menge des jeweiligen Antikörpers wurden zugegeben. Dann wurde wie oben beschrieben weiterverfahren.

### 5.3.5 Enzymatische Manipulationen an Proteinen

#### 5.3.5.1 Deglykosylierung von Proteinen durch PNGaseF

Zur Entfernung von über *N*-glykosidische Bindungen verknüpften Zuckerbausteinen wurden die Proteine in Zellysaten oder Hirnhomogenaten einer Spaltung mit *N*-Glykosidase F (PNGaseF) unterworfen. Dazu wurde Lysat oder Homogenat das 100  $\mu\text{g}$  Protein enthielt mit Lysispuffer auf ein Volumen von 18  $\mu\text{l}$  aufgefüllt, mit 2  $\mu\text{l}$  10x Denaturierungspuffer versetzt und für 10 min bei  $95\text{ °C}$  inkubiert. Nach Abkühlung auf Eis und kurzer Zentrifugation (10000 g,  $4\text{ °C}$ , 2 s) erfolgte die Zugabe von 2,5  $\mu\text{l}$  10x G7 Puffer und 2,5  $\mu\text{l}$  10 % NP-40 und schließlich von 500 U PNGaseF. Die Reaktion erfolgte durch Inkubation für 2-16 h bei  $37\text{ °C}$ . Die Proben wurden anschließend im *Western Blot* (Absatz 5.3.6) analysiert.

### 5.3.5.2 Proteinase K Verdau

Zur Analyse der Proteinase K Sensitivität verschiedener Prionprotein Konstrukte wurden Zellysate der entsprechenden polyklonalen Linien einem milden Proteinase K Verdau unterworfen. Dazu wurde Lysat oder Homogenat das 100 µg Protein enthielt mit 3,3 µg/ml Proteinase K versetzt, für 10 min bei 37 °C inkubiert, die Reaktion durch Zugabe von PMSF zu einer Endkonzentration von 2 mM abgestoppt und der Ansatz sofort mit 2x SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden anschließend im *Western Blot* (Absatz 5.3.6) analysiert.

### 5.3.6 Immunologischer Nachweis elektrophoretisch aufgetrennter Proteine (*Western Blot*)

#### 5.3.6.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung denaturierter Proteine dienten diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gele (Laemmli, U. K., 1970), die aus einem 5 %igen Sammelgel und aus einem 15 %igen Trenngel bestanden.

Zunächst wurden das Trenngel, bestehend aus 3,8 ml 40 %iger Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37,5:1), 2,6 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 50 µl 10 % SDS, 10 µl TEMED, 3,8 ml Wasser und 50 µl 10 % APS in die nach Herstelleranweisung vorbereitete Gelgießeinheit gegossen und zur Erzeugung einer geraden Abschlußkante mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel, bestehend aus 0,5 ml 40 %iger Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37,5:1), 0,88 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8; 18 µl 10 % SDS, 10 µl TEMED, 2,6 ml Wasser und 20 µl 10 % APS gegossen und der Kamm eingesetzt.

Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben vor dem Auftragen mit 2x SDS-PAGE-Probenpuffer gemischt und 5- 10 min bei 95 °C inkubiert. Die Elektrophorese in 1x Laufpuffer erfolgte bei einer Stromstärke von 20 mA pro Gel für 60-90 min.

#### 5.3.6.1.1 Anfärbung von Proteinen in SDS-PAG

Die Anfärbung von Proteinen erfolgte durch Coomassie Brilliant Blue R250. Dazu wurde das Gel mindestens 15 min in Coomassie-Farblösung gefärbt und anschließend mehrmals in Entfärb-Lösung entfärbt bis die Proteinbanden gut zu erkennen waren.

Alternativ erfolgte die Färbung mit Nil-Rot. Dazu wurde die Gelelektrophorese in Laufpuffer mit halber SDS-Konzentration durchgeführt, da SDS die Anfärbung

mit Nil-Rot beeinträchtigt. Das Gel wurde mehrfach in Wasser gewaschen, dann in aus einer Stammlösung mit frisch angesetzter wässriger Nil-Rot-Lösung (Endkonzentration 2 µg/ml) unter Schütteln 5 min bei RT inkubiert und anschließend mehrfach mit Wasser gewaschen. Die aufgetrennten Proteine wurden als Banden im UV-Licht (302 nm) sichtbar.

### 5.3.6.2 Übertragung von Proteinen auf PVDF-Membranen

Die Immobilisierung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf PVDF-Membranen erfolgte durch Elektroelution im *Semi-dry*-Verfahren (Towbin, H. *et al.*, 1979; Towbin, H. und Gordon, J., 1984).

Zunächst wurde die Immobilon-P Membran in 100 % Methanol, dann in 70 % Methanol getränkt und anschließend kurz in Transferpuffer äquilibriert. Danach wurden vier mit Transferpuffer getränkte Lagen Whatman 3MM Chromatographiepapier, die Membran, das Gel sowie weitere vier Lagen transferpuffergetränktes Whatman-Papier luftblasenfrei übereinandergelegt, der gesamte Stapel mit der Membran zur Anode zwischen den Elektrodenplatten der *Semi-dry* Transfereinheit plaziert und der Transfer für 30-60 min bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Geloberfläche durchgeführt.

### 5.3.6.3 Immunologische Detektion durch Chemolumineszenz

Nach dem Transfer wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch Inkubation in Blocking-Puffer für 1 h bei RT in Bewegung oder über Nacht bei 4 °C abgesättigt. Anschließend erfolgte die spezifische Bindung des in Blocking-Puffer verdünnten Primärantikörpers für 1 h bei RT. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit Blocking-Puffer für je 5-10 min wurde 1 h mit dem an den Primärantikörper bindenden, Alkalische Phosphatase gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert, erneut zweimal für je 5-10 min gewaschen und die Membran schließlich zweimal für je 2 min in Detektionspuffer äquilibriert. Anschließend wurden die Membranen vollständig mit dem Chemilumineszenz-Substrat CDP-Star benetzt und luftblasenfrei zwischen zwei Plastikfolien plaziert. Die bei der Umsetzung des Chemilumineszenz-Substrats durch die Alkalische Phosphatase entstehenden Lichtsignale wurden entweder auf Röntgenfilmen dokumentiert oder direkt mittels eines CCD-Kamera-Systems detektiert und in digitalen Bilddateien aufgezeichnet. Nach der Detektion der Lichtsignale wurde eine Quantifizierung der Intensitäten einzelner Banden mit Hilfe des Programms TINA 2.09 durchgeführt.

Die für immunologische Detektionen in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 1 aufgeführt.



Tabelle 1: In *Western Blot*-Analysen verwendete Antikörper.

<i>Anti-PrP-Antikörper</i>	<i>Spezifikation</i>	<i>Verdünnung im Western Blot</i>	<i>Herkunft/ Referenz</i>
<b>3B5</b>	Maus-monoklonal Hybridoma Kulturüberstand	1:50	(Krasemann, S. <i>et al.</i> , 1996)
<b>6H4</b>	Maus-monoklonal Aszites	1:2000	Prionics AG, Basel, Schweiz
<b>13A5</b>	Maus-monoklonal Aszites	1:2000	(Barry, R. A. und Prusiner, S. B., 1986)
<b>1A8</b>	Kaninchen-polyklonal Antiserum	1:10000	(Jeffrey, M. <i>et al.</i> , 1996)
<b>Kan72</b>	Kaninchen-polyklonal Antiserum	1:2000	(Hölscher, C. <i>et al.</i> , 1998)
<b>3F4</b>	Maus-monoklonal Aszites	1:10000	(Kascsak, R. J. <i>et al.</i> , 1987)
<b>7G5</b>	Maus-monoklonal Aszites	1:200	(Kascsak, R. J. <i>et al.</i> , 1997)
<i>Sekundär-Antikörper</i>	<i>Spezifikation</i>	<i>Verdünnung im Western blot</i>	<i>Herkunft/ Referenz</i>
<b>Ziege- anti-Maus AP</b>	Affinitätsgereinigtes Serum, Alkalische Phosphatase gekoppelt	1:1000	Dako Diagnostika GmbH, Hamburg  Dianova Immun- diagnostik, Hamburg
<b>Ziege- anti- Kaninche n AP</b>	Affinitätsgereinigtes Serum, Alkalische Phosphatase gekoppelt	1:1000	Dako Diagnostika GmbH, Hamburg

#### 5.3.6.4 Immunologische Detektion mit NBT/BCIP

Die Abdeckung unspezifischer Bindungen sowie die Antikörperinkubationen und die Waschschritte wurden wie oben beschrieben durchgeführt (Absatz 5.3.6.3).

Die Membran wurde zweimal für je 2 min in Alkalische Phosphatase Puffer äquilibriert. Anschließend erfolgte die Visualisierung der Antikörper-Signale direkt auf der Membran durch ein in einer Alkalische Phosphatase-Reaktion

gebildetes Farbpräzipitat. Dazu wurden die Membranen mit Färbelösung (45 µl NBT-Lösung und 35 µl BCIP-Lösung in 10 ml Alkalische Phosphatase Puffer) überschichtet und ohne Bewegung im Dunkeln inkubiert, bis die spezifischen Signale die gewünschte Intensität erreicht hatten.

## 6 ERGEBNISSE

### 6.1 ANALYSE DER ZELLULÄREN SPALTUNG DES PRIONPROTEINS IN HIRNHOMOGENATEN

Ausgehend von den veröffentlichten Analysen an Hirnhomogenaten verschiedener Spezies (Pan, K. M. *et al.*, 1992; Harris, D. A. *et al.*, 1993; Chen, S. G. *et al.*, 1995) wurde zunächst versucht, die proteolytischen Spaltung von PrP<sup>c</sup> durch immunologische Detektion des Prionproteins und seiner Spaltprodukte in Hirnhomogenaten nachzuweisen. Für diese Untersuchungen wurden als Ausgangsmaterial Hirnhomogenate von Hamstern sowie verschiedenen Mauslinien verwandt. Wegen der guten Verfügbarkeit spezifischer *N*- und *C*-terminaler Antikörper gegen Hamster PrP<sup>c</sup> (HaPrP) wurde die Mehrzahl der folgenden Untersuchungen mit Hirnhomogenaten der HaPrP überexprimierenden transgenen Mauslinie tg81 durchgeführt, die eine zwei- bis vierfache Überexpression des Hamster Prionproteins (Scott, M. *et al.*, 1993), und aufgrund der Verwendung des HaPrP-Promotors ein im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nahezu identisches Expressionsmuster zeigt (Scott, M. *et al.*, 1989).

#### 6.1.1 Detektion des *N*-terminalen Spaltprodukts

Das durch proteolytische Spaltung des Hamster Prionproteins in dessen zentraler Region entstehende *N*-terminale Spaltprodukt sollte die Aminosäuren 23 bis 111 oder 112 umfassen (Vergleiche Abbildung 2, Seite 9) und wie aus der Aminosäuresequenz ermittelt werden konnte ein Molekulargewicht von etwa 9 kDa aufweisen. Der Nachweis dieses Spaltprodukts sollte durch Auftrennung der Proteine aus tg81 Hirnhomogenaten im SDS-PAGE und anschließende immunologische Detektion mit den *N*-terminalen Anteil des Prionproteins erkennenden Antikörpern erfolgen. In Abbildung 11 (Seite 53) sind die Epitope der im folgenden verwendeten *N*-terminalen Antikörper 3B5 und Kan72 schematisch dargestellt.

Da es sich bei PrP<sup>c</sup> um ein Glykoprotein handelt, das *in vivo* sowohl in unglykosylierter als auch in ein- und zweifach glykosylierter Form vorliegt, wurden, wie exemplarisch in Abbildung 5 gezeigt, im *Western Blot* drei Banden unterschiedlichen Molekulargewichts detektiert. Dieses für PrP<sup>c</sup> charakteristische Bandenmuster, mit der stärksten Bande bei etwa 35 kDa für die doppelt glykosylierte Form des Proteins, einer Bande bei etwa 30 kDa für die einfach glykosylierte Form und der schwächsten Bande bei etwa 28 kDa für unglykosyliertes PrP<sup>c</sup>, zeigte sich bei allen Analysen mit den Antikörpern 3B5 und Kan72 (Spuren 1 bis 3). Der geforderte Nachweis des *N*-terminalen Spaltprodukts hingegen war nur bei etwa 10 % der Analysen mit dem Antikörper 3B5 möglich. In diesen Fällen wurde eine schwache Bande bei etwa 9 kDa aufgezeichnet

(Spur 1). In der Mehrzahl der Untersuchungen wurde das Spaltprodukt jedoch unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen nicht nachgewiesen (Spur 2). Bei Verwendung des Antiserums Kan72 war die Detektion des *N*-terminalen Spaltprodukts in keinem Fall möglich (Spur 3).

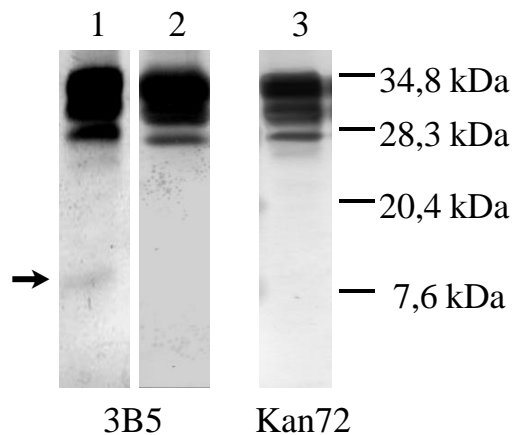


Abbildung 5: Immunologischer Nachweis des Prionproteins in tg81 Hirnhomogenaten mit gegen den *N*-Terminus gerichteten Antikörpern.

Die Auftrennung erfolgte auf einem 15%igen SDS-PAG. Aufgetragen wurden jeweils 100 µg Gesamtprotein. Detektiert wurde mit dem Primärantikörper 3B5 oder dem Primärantiserum Kan72 und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-AP oder Ziege-anti-Kaninchen AP über Reaktion mit NBT/BCIP.

Spuren: 1 und 2: tg81 Hirnhomogenat detektiert mit 3B5; 3: tg81 Hirnhomogenat detektiert mit Kan72.

Die Molekulargewichte von Markerproteinen sind auf der rechten Seite angegeben. Der Pfeil auf der linken Seite markiert das *N*-terminale Spaltprodukt bei etwa 9 kDa.

Eine denkbare Erklärung für diese Beobachtungen wäre, daß der abgespaltene *N*-Terminus des Prionproteins verhältnismäßig instabil und einem raschen proteolytischen Abbau schon vor oder während der Präparation der Hirnhomogenate unterlegen war.

Um diese These zu überprüfen, wurde ein im bakteriellen System erzeugtes Fragment des murinen PrP<sup>c</sup> *N*-Terminus (Aminosäuren 23 bis 98) (Brown, D. R. *et al.*, 1997) zusammen mit PrP<sup>0/0</sup>-Hirnhomogenaten inkubiert und anschließend mittels SDS-PAGE auf seine Stabilität hin untersucht. Als Kontrolle diente bakteriell erzeugtes murines PrP<sup>c</sup> voller Länge (Aminosäuren 23 bis 231) (Hornemann, S. *et al.*, 1997). Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind aus Abbildung 6 zu entnehmen. Das *N*-terminale PrP-Fragment moPrP23-98 war nach Inkubation für 15 Minuten bei 37 °C in Lyse-Puffer im SDS-PAG als deutliche Bande bei 7,5 kDa erkennbar (Spur 1). Nach Inkubation mit PrP<sup>0/0</sup>-Hirnhomogenat unter gleichen Inkubationsbedingungen war das Protein nicht mehr nachweisbar (Spur 2). Der starke Hintergrund in diesem Ansatz resultierte aus den Proteinen des zugesetzten PrP<sup>0/0</sup>-Hirnhomogenats (Spur 5). Die Kontrolle moPrP32-231, die nach Inkubation in Lyse-Puffer als Bande bei etwa 28 kDa detektierbar war (Spur 6), war auch nach Inkubation mit PrP<sup>0/0</sup>-Hirnhomogenat stabil und als deutliche Bande im Gel sichtbar (Spur 4). Vergleichbare Ergebnisse ergaben sich bei der immunologischen Detektion der Proteine im *Western Blot* (Daten nicht gezeigt).

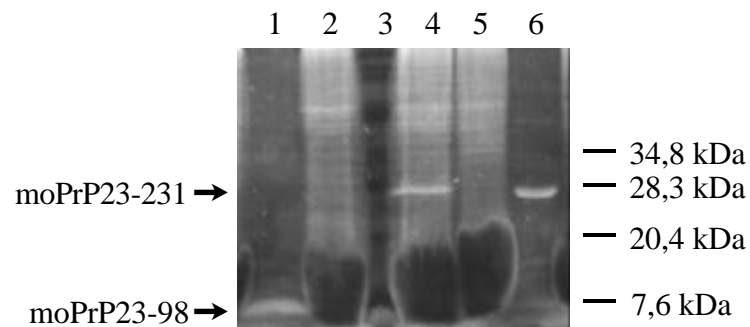


Abbildung 6: Elektrophoretische Analyse der Stabilität von bakteriell erzeugtem moPrP23-231 und moPrP23-98 in PrP<sup>0/0</sup> Hirnhomogenat auf einem 15 %igen SDS-PAG.

Die Detektion erfolgte durch Färbung mit Nil-Rot.

Spuren: 1: 10 µg moPrP23-98 in Lyse-Puffer nach 15 min Inkubation bei 37 °C; 2: 10 µg moPrP23-98 in PrP<sup>0/0</sup> Hirnhomogenat (100 µg Gesamtprotein) nach 15 min Inkubation bei 37 °C; 3: Molekulargewichtsstandard; 4: 10 µg moPrP23-231 in PrP<sup>0/0</sup> Hirnhomogenat (100µg Gesamtprotein) nach 15 min Inkubation bei 37 °C; 5: PrP<sup>0/0</sup> Hirnhomogenat (100µg Gesamtprotein) nach 15 min Inkubation bei 37 °C; 6: 10 µg moPrP23-231 in Lyse-Puffer nach 15 min Inkubation bei 37 °C. Die Molekulargewichte von Markerproteinen sind auf der rechten Seite angegeben.

Pfeile markieren die bakteriell erzeugten Proteine moPrP23-231 und moPrP23-98.

Diese Untersuchungen lieferten deutliche Hinweise auf die zuvor postulierte Instabilität der *N*-terminalen Domäne des Prionproteins. Das wahrscheinlich wenig oder nicht strukturierte Protein-Fragment (Riek, R. *et al.*, 1997) ist möglicherweise schon *in vivo* einem raschen proteolytischen Abbau unterlegen, da weder die Postmortalzeit der Tiere vor Präparation der Hirnhomogenate noch die Anwesenheit des Protease-Inhibitors PMSF während der Präparation einen Einfluß auf die Detektierbarkeit des *N*-terminalen Spaltprodukts hatten (Daten nicht gezeigt).

Da auch in den bereits genannten Publikationen zur proteolytischen Spaltung des Prionproteins der Säugetiere ausschließlich das *C*-terminale Spaltprodukt nachgewiesen worden war (Pan, K. M. *et al.*, 1992; Chen, S. G. *et al.*, 1995; Jimenez-Huete, A. *et al.*, 1998) sollte dieses Spaltprodukt im folgenden einer genaueren Analyse unterzogen werden.

### 6.1.2 Detektion des *C*-terminalen Spaltprodukts

Das durch die proteolytische Spaltung des Hamster Prionproteins entstehende *C*-terminale Spaltprodukt sollte die Aminosäuren 111 oder 112 bis 231 umfassen (Vergleiche Abbildung 2, Seite 9) und wie aus dessen Aminosäuresequenz ermittelt werden konnte ein Molekulargewicht von etwa 18 kDa aufweisen. Der Nachweis dieses Proteinfragments erfolgte durch Auftrennung der Proteine aus

tg81 Hirnhomogenaten im SDS-PAG und immunologische Detektion mit verschiedenen den C-terminalen Bereich des Prionproteins erkennenden Antikörpern. In Abbildung 11 (Seite 53) sind die Epitope der zum Nachweis des C-terminalen Spaltprodukts verwendeten Antikörper 13A5, 6H4 und 7G5 sowie des Antiserums 1A8 schematisch dargestellt.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte wie in Abbildung 7 gezeigt vor und nach enzymatischer Abspaltung der Zuckerketten durch Reaktion mit dem Enzym *N*-Glykosidase F (PNGaseF). Vor der Deglykosylierung (Spur 1) zeigte sich das für PrP<sup>c</sup> charakteristische Bandenmuster zwischen 28 und 35 kDa. Ein C-terminales Spaltprodukt des erwarteten Molekulargewichts war nicht nachweisbar. Nach der Deglykosylierung der Proteine (Spur 2) erschien unglykosyliertes PrP<sup>c</sup> im *Western Blot* als eine starke Bande bei etwa 28 kDa. Gleichzeitig wurden C-terminale Spaltprodukte des Proteins nachweisbar: Das postulierte Spaltprodukt von etwa 18 kDa, das dem bereits beschriebenen PrP<sup>II</sup> oder C1 entsprach (Pan, K. M. *et al.*, 1992; Chen, S. G. *et al.*, 1995), und ein weiteres, bislang nicht näher charakterisiertes N-terminal verlängertes Spaltprodukt von etwa 20 kDa, das auch in Untersuchungen einer anderen Gruppe schon detektiert worden war (Jimenez-Huete, A. *et al.*, 1998).

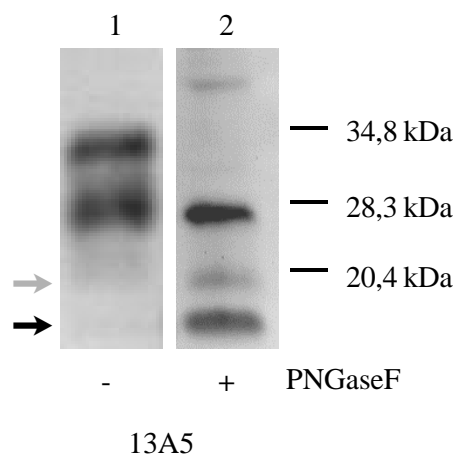


Abbildung 7: Immunologischer Nachweis des Hamster Prionproteins aus tg81 Hirnhomogenaten vor und nach PNGaseF-Behandlung.

Die Auftrennung erfolgte auf einem 15%igen SDS-PAG. Aufgetragen wurden jeweils 100 µg Gesamtprotein. Gezeigt ist der Nachweis vor (-) und nach (+) der Abspaltung *N*-glykosydischer Glykosylierungen durch PNGaseF. Die Detektion erfolgte mit dem Primärantikörper 13A5 und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-AP über die Aufzeichnung von Chemolumineszenz-signalen.

Spuren: 1: tg81 Hirnhomogenat 2: tg81 Hirnhomogenat nach Deglykosylierung mit PNGaseF. Die Molekulargewichte von Markerproteinen sind auf der rechten Seite angegeben.

Die Pfeile markieren die C-terminalen Spaltprodukte bei etwa 18 kDa (schwarz) und 20 kDa (grau).

### 6.1.3 Überprüfung der experimentellen Bedingungen bei der Detektion der C-terminalen Spaltprodukte

Die Tatsache, daß die beiden C-terminalen Spaltprodukte von 18 und 20 kDa erst nach der Deglykosylierung detektierbar waren und die zu erwartenden N-terminalen Spaltprodukte mit einem Molekulargewicht von etwa 9 und 7 kDa im *Western Blot* nur schwer oder nicht nachweisbar waren, könnte auf eine artifizielle Natur der Spaltprodukte hinweisen. Um experimentell bedingte Artefakte auszuschließen oder gegebenenfalls aufzuzeigen, wurden verschiedene Untersuchungen zur Herstellung und Weiterverarbeitung von Hirnhomogenaten durchgeführt.

#### 6.1.3.1 Einfluß der Postmortalzeit

*Western Blot-Analysen* zum Einfluß der Postmortalzeit der Tiere bis zur Herstellung der Lysate zeigten auf, daß die hierfür üblichen Schwankungen im Bereich von wenigen bis maximal 30 Minuten die Menge an detektierbaren Spaltprodukten nicht meßbar beeinflussten (Daten nicht gezeigt). In der Literatur gibt es jedoch einen Hinweis darauf, daß Postmortalzeiten im Bereich von mehreren Tagen die Menge an Spaltprodukten humanen Prionproteins zum Teil deutlich zu erhöhen (Jimenez-Huete, A. *et al.*, 1998). Um derartige Schwankungen der Ergebnisse zu vermeiden, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Hirnhomogenate immer sofort nach Tötung der Tiere hergestellt.

#### 6.1.3.2 Einfluß von Proteasen

Zur Überprüfung möglicher Protease-Aktivitäten in den Hirnhomogenaten wurden unterschiedliche Protease Inhibitoren bei deren Präparation zugesetzt, die Proteine anschließend deglykosyliert und wie in Abbildung 8 dargestellt im *Western Blot* analysiert.

Antipain-dihydrochlorid wurde zur Hemmung von Papain, Trypsin und Cathepsin A und B zugesetzt (Spur 3), Bestatin zur Inhibition von Aminopeptidasen (Spur 4), Chymostatin als Inhibitor für  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Chymotrypsin (Spur 5), E-64 zur spezifischen Hemmung von Cystein-Proteasen (Spur 6), Leupeptin gegen Serin- und Cystein-Proteasen (Spur 7), Pepstatin gegen Aspartat-Proteasen (Spur 8), Phosphoramidon und EDTA- $\text{Na}_2$  als Inhibitoren von Metalloproteasen (Spur 9 und Spur 11), PMSF, Pefabloc oder Aprotinin zur Hemmung von Serinproteasen (Spuren 1, 10 und 12) oder der Proteasen-Inhibitoren-Cocktail *complete* zur gleichzeitigen Hemmung von Serin-, Cystein- und Metalloproteasen sowie Calpainen (Spur 2).

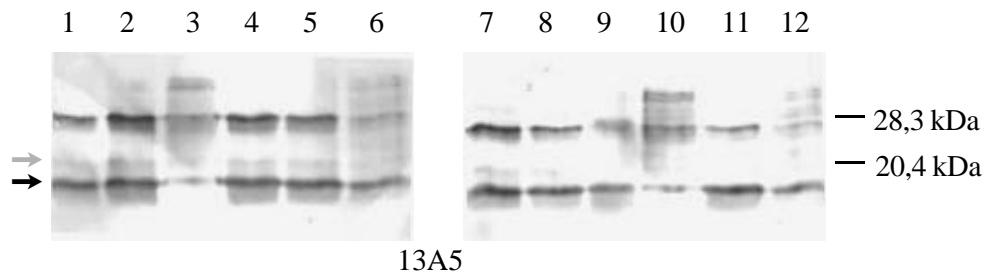


Abbildung 8: Immunologischer Nachweis des Hamster Prionproteins aus tg81 Hirnhomogenaten hergestellt in Anwesenheit verschiedener Proteaseinhibitoren.

Aufgetragen wurden jeweils 100 µg Gesamtprotein. Die Auftrennung der deglykosylierten Proteine erfolgte auf einem 15%igen SDS-PAG. Detektiert wurde mit dem C-terminalen Primärantikörper 13A5 und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-AP über Färbung mit NBT/BCIP.

Spuren: 1: 1 mM PMSF; 2: Proteasen-Inhibitoren-Cocktail *complete* (Konzentration wie vom Hersteller empfohlen); 3: 74 mM Antipain; 4: 130 µM Bestatin; 5: 100 µM Chymostatin; 6: 28 µM E64; 7: 10 µM Leupeptin; 8: 1 µM Pepstatin; 9: 0,6 mM Phosphoramidon; 10: 4 mM Pefablock; 11: 1,3 mM EDTA-Na<sub>2</sub>; 12: 0,3 µM Aprotinin. Die Molekulargewichte von Markerproteinen sind auf der rechten Seite angegeben.

Die Pfeile markieren die C-terminalen Spaltprodukte bei etwa 18 kDa (schwarz) und 20 kDa (grau).

Mit Ausnahme von Antipain (Spur 3) und Pefablock (Spur 10) zeigte keiner der angewandten Protease Inhibitoren einen im *Western Blot* nachweisbaren Effekt auf die Menge C-terminaler Spaltprodukte in den Hirnhomogenaten. Auch die beobachtete deutliche Reduktion detektierbaren Spaltprodukts in Anwesenheit von Antipain (Spur 3) und Pefablock (Spur 10) war vermutlich nicht bedingt durch die Inhibition einer für die Spaltung des Prionproteins verantwortlichen Protease im Homogenat, sondern vielmehr durch die Inhibition der Abspaltung der Zuckerketten mittels PNGaseF. Wie in Absatz 6.1.1 bereits beschrieben wurde, war das C-terminale Spaltprodukte des Prionproteins im *Western Blot* ausschließlich nach Abspaltung der Glykosylierung als Bande detektierbar. Folglich führte auch die durch das Vorhandensein der unterschiedlichen Prionprotein-Banden zwischen 28 und 35kDa angezeigte partielle Inhibition der PNGaseF (Spuren 3 und 10) zu einer deutlichen Abnahme an detektierbarem C-terminalen Spaltprodukt.

Die ermittelten Daten ließen den Schluß zu, daß die proteolytische Aktivität keiner der getesteten Proteasen für die Spaltung des Prionproteins im Lysat als experimentelles Artefakt verantwortlich war.

### 6.1.3.3 Einfluß der Deglykosylierung mit PNGaseF

Zur genaueren Charakterisierung des Einflusses der Abspaltung der Zuckerketten auf die Menge an detektiertem Spaltprodukt wurde, wie in Abbildung 9 gezeigt,



der zeitliche Verlauf der Deglykosylierung von tg81 Hirnhomogenaten mittels *Western Blot-Analyse* untersucht.

Vor Abspaltung der Zuckerketten (Spur 1) waren keine Banden für C-terminale Spaltprodukte bei 18 oder 20 kDa nachweisbar. Mit zunehmender Deglykosylierung durch Verlängerung der Inkubationszeiten mit PNGaseF von 15 Sekunden (Spur 2) auf bis zu 2 Stunden (Spur 9) wurden steigende Mengen an Spaltprodukten detektiert (Spuren 2 bis 9). Wurde das Enzym PNGaseF unter ansonsten identischen Versuchsbedingungen in den Versuchsansätzen weggelassen war dieser Effekt auch nach mehrstündiger Inkubation nicht zu beobachten. Dies schloß eine mögliche unspezifische Proteaseaktivität in den zugesetzten Puffern und Lösungen als Ursache für die erhaltenen Ergebnisse aus (Daten nicht gezeigt).

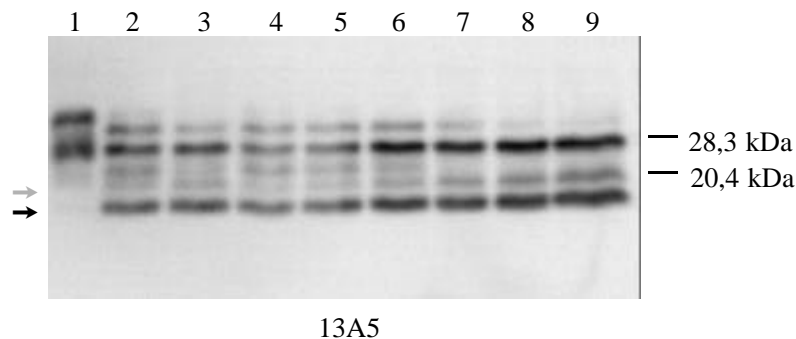


Abbildung 9: Immunologischer Nachweis des Hamster Prionproteins aus tg81 Hirnhomogenaten nach Deglykosylierung mit PNGaseF für unterschiedliche Zeiten.

Aufgetragen wurden jeweils 100 µg Gesamtprotein. Die Auftrennung der Proteine erfolgte auf einem 15%igen SDS-PAG. Detektiert wurde mit dem C-terminalen Primärantikörper 13A5 und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-AP über die Aufzeichnung von Chemolumineszenzsignalen.

Spuren: 1: tg81 Hirnhomogenat; 2: tg81 Hirnhomogenat 15 s PNGaseF; 3: tg81 Hirnhomogenat 30 s PNGaseF; 4: tg81 Hirnhomogenat 1 min PNGaseF; 5: tg81 Hirnhomogenat 2 min PNGaseF; 6: tg81 Hirnhomogenat 4min PNGaseF, 7: tg81 Hirnhomogenat 10 min PNGaseF; 8: tg81 Hirnhomogenat 30 min PNGaseF; 9: tg81 Hirnhomogenat 2 h PNGaseF. Die Molekulargewichte von Markerproteinen sind auf der rechten Seite angegeben.

Die Pfeile markieren die C-terminalen Spaltprodukte bei etwa 18 kDa (schwarz) und 20 kDa (grau).

Eine plausible Erklärung für den Nachweis des C-terminalen Spaltprodukts erst nach der Deglykosylierung des Prionproteins erhielt man nach der in Abbildung 10 gezeigten vergleichenden Betrachtung der PrP-spezifischen Banden nach Detektion mit unterschiedlichen Antikörpern.

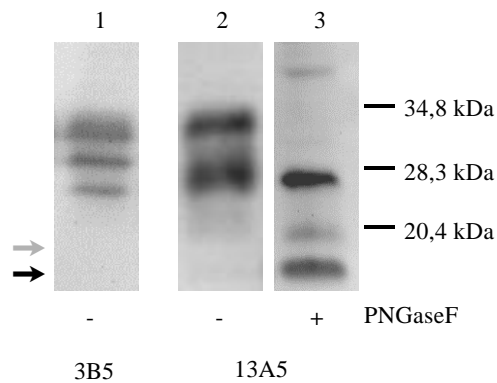


Abbildung 10: Immunologischer Nachweis des Hamster Prionproteins aus tg81 Hirnhomogenaten nach Auftrennung auf einem 15%igen SDS-PAG.

Aufgetragen wurden jeweils 100 µg Gesamtprotein. Gezeigt ist der Nachweis vor (-) und nach (+) der Abspaltung *N*-glycosydischer Glykosylierungen durch PNGaseF. Die Detektion erfolgte mit den Primärantikörpern 3B5 oder 13A5 und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-AP über die Aufzeichnung von Chemolumineszenzsignalen.

Spuren: 1: tg81 Hirnhomogenat detektiert mit mAK 3B5; 2: tg81 Hirnhomogenat detektiert mit mAK 13A5 3: tg81 Hirnhomogenat nach Deglykosylierung mit PNGaseF detektiert mit mAK 13A5. Die Molekulargewichte von Markerproteinen sind auf der rechten Seite angegeben.

Die Pfeile markieren die *C*-terminalen Spaltprodukte bei etwa 18 kDa (schwarz) und 20 kDa (grau).

Die Detektion mit dem *N*-terminalen Antikörper 3B5 ergab die PrP-spezifischen Signale in der bereits beschriebenen Verteilung (siehe auch Abbildung 5). Es wurden drei Banden nachgewiesen: Zweifach glykosyliertes PrP<sup>c</sup> bei etwa 35 kDa ergab die stärkste Bande, einfach glykosyliertes PrP<sup>c</sup> bei etwa 30 kDa lag in geringeren Mengen vor und unglykosyliertes PrP<sup>c</sup> bei etwa 28 kDa ergab die schwächste Bande (Spur 1). Wurde zum Nachweis ein *C*-terminaler Antikörper wie 13A5 verwendet, ergab sich ein abweichendes Bandenmuster mit der stärksten Bande bei 28 kDa (Spur 2). Der *C*-terminale Antikörper erkannte an dieser Position, im Gegensatz zum *N*-terminalen Antikörper, neben dem ungespaltenen unglykosylierten PrP<sup>c</sup> das zweifach glykosylierte *C*-terminale Spaltprodukt des Proteins. Erst nach Abspaltung der Zuckerketten (Spur 3) konnten die *C*-terminalen Spaltprodukte durch den *C*-terminalen Antikörper als diskrete Banden nachgewiesen werden (siehe auch Abbildung 7).

#### 6.1.3.4 Detektion der *C*-terminalen Spaltprodukte mit verschiedenen Antikörpern

Um auszuschließen, daß es sich bei den detektierten Banden im Bereich von 18 und 20 kDa um unspezifische Bindungen des *C*-terminalen Antikörpers 13A5 handelte, wurden *Western Blot-Analysen* mit weiteren *C*-terminalen Antikörpern durchgeführt. Die verwendeten Antikörper mit Angabe ihrer Epitope im Prionprotein sind in Abbildung 11 gezeigt.

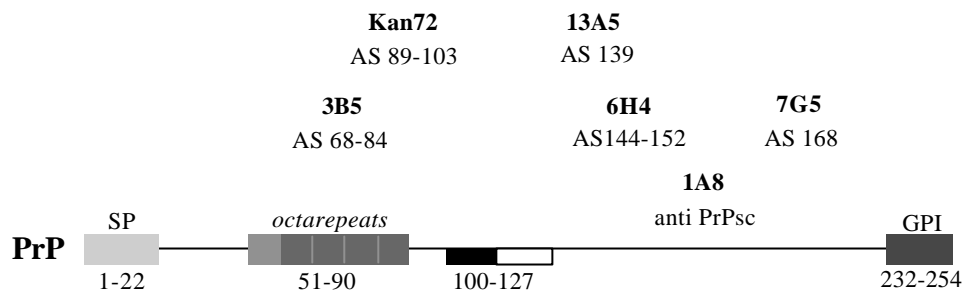


Abbildung 11: Schematische Darstellung der für die Detektion der Spaltprodukte verwendeten Antikörper und ihrer Epitope im Prionprotein.

3B5, Kan72, 6H4 und 1A8 detektieren sowohl Maus als auch Hamster PrP, 13A5 und 7G5 detektieren nur Hamster PrP.

Bezeichnungen: SP: Signalpeptid (AS 1-22); *Octarepeats*: fünfmalige P(Q/H)GG(T/G/S)W GQ Sequenzwiederholung (AS 51-90); zentrale Region (AS 100-127) mit basischer Region (schwarze Box) und hydrophober Region (weiße Box), GPI-S: Signalsequenz zur Anhängung des GPI-Ankers (AS 232-254); AS: Aminosäure.

Die verwendeten Hirnhomogenate der transgenen Mauslinie tg81 wurden in Anwesenheit des Proteaseinhibitors PMSF präpariert, deglykosyliert und das Prionprotein *Western Blot-Analysen* mit den unterschiedlichen C-terminalen Antikörpern unterzogen. Der Nachweis erfolgte über Chemolumineszenzreaktion wobei die Lichtsignale elektronisch aufgezeichnet und ausgewertet wurden. Dargestellt ist jeweils eine exemplarische *Western Blot-Analyse* und in Form eines Balkendiagramms die Quantifizierung des Spaltprodukts aus mehreren unabhängigen Experimenten. Die Höhe der Balken gibt die Menge an C-terminalem Spaltprodukt in Relation zur jeweils detektierten Menge ungespaltenen Prionproteins in Form der Mittelwerte der od18kDa/od28kDa Quotienten an.

Eine Auswahl an *Western Blot*-Untersuchungen zur Detektion des 18 kDa Spaltprodukts und die Ergebnisse der Quantifizierung von jeweils vier unabhängigen Experimenten sind in Abbildung 12 gezeigt. Aus Tabelle 2 sowie Tabelle 3 (Anhang, Seite 141) sind die zugehörigen Meßdaten und die rechnerisch ermittelten Verhältnisse zwischen 18 kDa Spaltprodukt und ungespaltenem PrP für die jeweiligen Experimente und den ermittelten Mittelwert (Mw) zu entnehmen.

	13A5			1A8		
	(od28kDa - Bkg)/mm <sup>2</sup>	(od18kDa - Bkg)/mm <sup>2</sup>	od18kDa/od28kDa	(od28kDa - Bkg)/mm <sup>2</sup>	(od18kDa - Bkg)/mm <sup>2</sup>	od18kDa/od28kDa
	280,67	830,75	2,96	1512,13	1920,40	1,27
	335,43	975,05	2,91	1445,48	1777,94	1,23
	408,27	982,81	2,41	1161,03	1996,97	1,72
	205,97	734,37	3,57	1120,36	974,71	0,87
<b>Mw</b>			2,95			1,28
<b>Stabw</b>			0,47			0,35
	6H4			7G5		
	(od 28kDa - Bkg)/mm <sup>2</sup>	(od18kDa - Bkg)/mm <sup>2</sup>	od18kDa/od28kDa	(od28kDa - Bkg)/mm <sup>2</sup>	(od18kDa - Bkg)/mm <sup>2</sup>	od18kDa/od28kDa
	323,06	361,83	1,12	268,12	152,83	0,57
	404,85	412,95	1,02	267,64	149,88	0,56
	558,61	425,09	0,94	410,37	246,22	0,60
	659,81	917,14	1,39	858,51	437,84	0,51
<b>Mw</b>			1,11			0,56
<b>Stabw</b>			0,19			0,04

Tabelle 2: Quantifizierung des 18 kDa Spaltprodukts im Verhältnis zu ungespaltenem Prionprotein nach Detektion mit den Antikörpern 13A5, 1A8, 6H4 und 7G5.

Bezeichnungen: (od28kDa-Bkg)/mm<sup>2</sup> bzw. (od18kDa-Bkg)/mm<sup>2</sup>: Aufgezeichnete Lichtsignale für ungespaltenes Prionprotein (28 kDa) bzw. 18 kDa Spaltprodukt abzüglich des lokalen Hintergrundes (Bkg) bezogen auf einen Quadratmillimeter Meßfläche gerundet auf zwei Stellen hinter dem Komma; od18kDa/od28kDa: Quotient [(od18kDa-Bkg)/mm<sup>2</sup>]/[(od28kDa-Bkg)/mm<sup>2</sup>] gerundet auf zwei Stellen hinter dem Komma; Mw: Mittelwert od18kDa/od28kDa; Stabw: Standardabweichung od18kDa/od28kDa.

Das C-terminale Spaltprodukt bei 18 kDa konnte mit den Antikörpern 13A5, 1A8, 6H4 und 7G5 nachgewiesen werden. Ein Vergleich der Bandenintensitäten auf den *Western Blot-Analysen* machte jedoch deutlich, daß die unterschiedlichen Antikörper sich bezüglich ihrer Spezifität für das 18 kDa Spaltprodukt zum Teil erheblich unterschieden. Während der Antikörper 13A5 für das Spaltprodukt ein stärkeres Signal ergab als für ungespaltenes PrP<sup>c</sup> (Spur 2), zeigte der Antikörper 7G5 eine im Vergleich zur Erkennung ungespaltenen Prionproteins nur sehr schwache Bande für das Spaltprodukt (Spur 8). Das Antiserum 1A8 (Spur 4) und der Antikörper 6H4 (Spur 6) zeigten eine intermediäre Effizienz in der Erkennung des Spaltprodukts. Die quantitativen Bestimmungen der Bandenintensitäten bestätigten diese Beobachtung. Der Antikörper 13A5 erkannte das 18 kDa Spaltprodukt mit einem od18kDa/od28kDa Quotienten von 2,95 und daher der höchsten Effizienz. Das Antiserum 1A8 und der Antikörper 6H4 wiesen das 18 kDa Spaltprodukt mit od18kDa/od28kDa Quotienten von 1,27 und 1,11 deutlich weniger effizient nach und der Antikörper 7G5 zeigte mit einem od18kDa/od28kDa Wert von 0,56 eine sehr schwache Erkennung des C-terminalen 18 kDa Spaltprodukts in Relation zur Erkennung ungespaltenen Prionproteins.

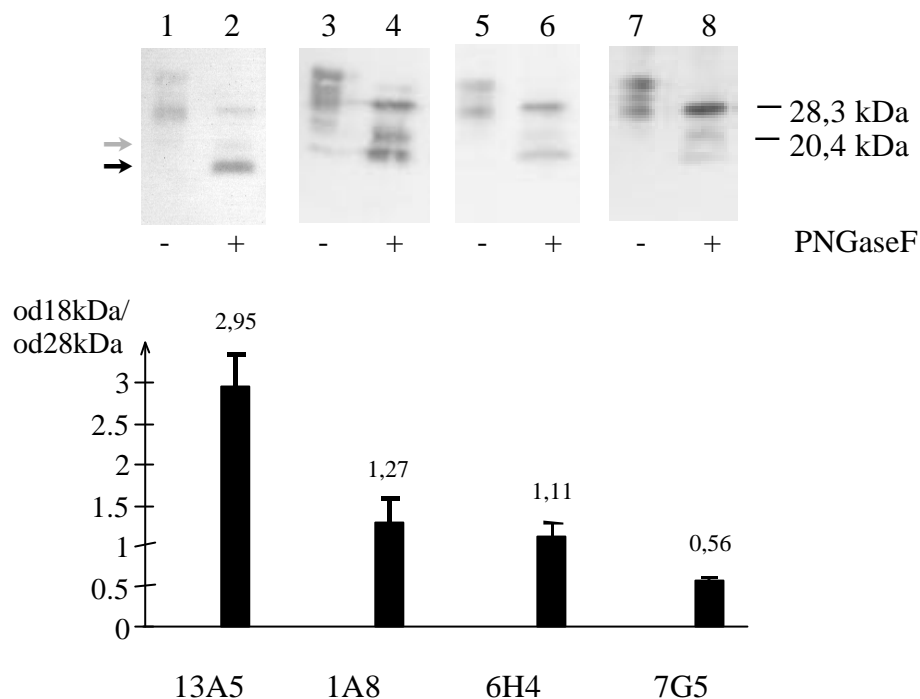


Abbildung 12: *Western Blot-Analysen* und densitometrische Bestimmung der Spezifität verschiedener Antikörper für das 18 kDa Spaltprodukt.

Aufgetragen wurden jeweils 100 µg Gesamtprotein. Gezeigt ist der immunologische Nachweis vor (-) und nach (+) der Abspaltung *N*-glycosydischer Glykosylierungen durch PNGaseF. Die Auftrennung der Proteine erfolgte auf einem 15%igen SDS-PAG. Detektiert wurde mit verschiedenen *C*-terminalen Primärantikörpern oder Antiseren und den Sekundärantikörpern Ziege-anti-Maus-AP bzw. Ziege-anti-Kaninchen-AP über die Aufzeichnung von Chemolumineszenzsignalen.

Spuren: 1: tg81 Hirnhomogenat detektiert mit 13A5; 2: tg81 Hirnhomogenat nach Deglykosylierung detektiert mit 13A5; 3: tg81 Hirnhomogenat detektiert mit 1A8; 4: tg81 Hirnhomogenat nach Deglykosylierung detektiert mit 1A8; 5: tg81 Hirnhomogenat detektiert mit 6H4; 6: tg81 Hirnhomogenat nach Deglykosylierung detektiert mit 6H4; 7: tg81 Hirnhomogenat detektiert mit 7G5; 8: tg81 Hirnhomogenat nach Deglykosylierung detektiert mit 7G5. Die Molekulargewichte von Markerproteinen sind auf der rechten Seite angegeben.

Die Pfeile markieren die *C*-terminalen Spaltprodukte bei etwa 18 kDa (schwarz) und 20 kDa (grau).

Die im Balkendiagramm dargestellte quantitative Auswertung der Bandenintensitäten durch elektronische Aufzeichnung der Lichtsignale erfolgte jeweils normiert auf die Menge an ungespaltenem Prionprotein (bezüglich Details siehe Tabelle 2). Die Mittelwerte der od18kDa/od28kDa Quotienten einzelner Analysen sind oberhalb der Balken angegeben. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Abbildung 13 stellt die Ergebnisse aus den Untersuchungen zum 20 kDa Spaltprodukt dar. Dieses Produkt wurde von den Antikörpern Kan72, 1A8, 13A5 und 6H4 erkannt. Die aus den Meßdaten von jeweils vier unabhängigen Analysen rechnerisch ermittelten Verhältnisse zwischen 20 kDa Spaltprodukt und ungespaltenem PrP<sup>c</sup> sind der Datentabelle Tabelle 4 (Anhang, Seite 141) zu entnehmen. Auch hier machte schon der Vergleich der Bandenintensitäten einzelner *Western Blot-Analysen* deutlich, daß das Spaltprodukt im Verhältnis zu ungespaltenem Prionprotein von verschiedenen Antikörpern mit unterschiedlichen

Effizienzen erkannt wurde. Das Kan72 Antiserum ergab die deutlichste Bande für das Spaltprodukt (Spur 2). Auch mit dem 1A8 Antiserum war der Nachweis vergleichsweise effizient (Spur 4), wohingegen die Antikörper 13A5 (Spur 6) und 6H4 (Spur 8) das 20 kDa Spaltprodukt eher mäßig gut erkannten. Die quantitative Auswertung ergab ein entsprechendes Bild. Die Antiseren Kan72 und 1A8 wiesen mit durchschnittlichen  $od_{20kDa}/od_{28kDa}$  Quotienten von 0,79 und 0,70 die höchste Spezifität für das Spaltprodukt auf. Der Antikörper 13A5 zeigte mit einem Quotienten von 0,42 eine deutlich geringere und der Antikörper 6H4 mit einem Wert von 0,19 die geringste Effektivität der Erkennung des 20 kDa Spaltprodukts.

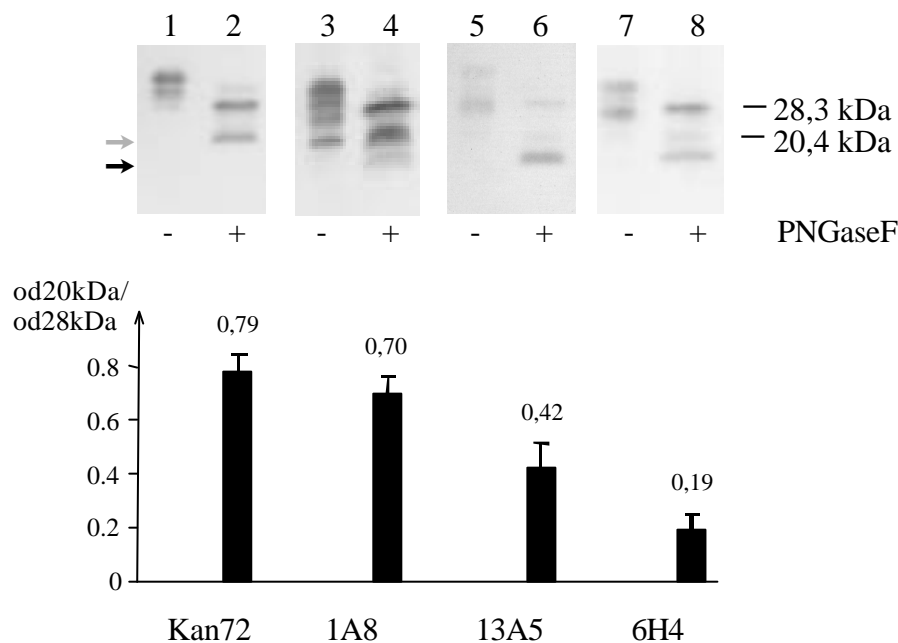


Abbildung 13: *Western Blot-Analyse* und densitometrische Bestimmung der Spezifität verschiedener Antikörper für das 20 kDa Spaltprodukt.

Aufgetragen wurden jeweils 100 µg Gesamtprotein. Gezeigt ist der immunologische Nachweis vor (-) und nach (+) der Abspaltung *N*-glycosydischer Glykosylierungen durch PNGaseF. Die Auftrennung der Proteine erfolgte auf einem 15%igen SDS-PAG. Detektiert wurde mit verschiedenen *C*-terminalen Primärantikörpern oder Antiseren und den Sekundärantikörpern Ziege-anti-Maus-AP bzw. Ziege-anti-Kaninchen-AP über die Aufzeichnung von Chemolumineszenzsignalen.

Spuren: 1: tg81 Hirnhomogenat detektiert mit Kan72 2: tg81 Hirnhomogenat nach Deglykosylierung detektiert mit Kan72; 3: tg81 Hirnhomogenat detektiert mit 1A8; 4: tg81 Hirnhomogenat nach Deglykosylierung detektiert mit 1A8; 5: tg81 Hirnhomogenat detektiert mit 13A5; 6: tg81 Hirnhomogenat nach Deglykosylierung detektiert mit 13A5; 7: tg81 Hirnhomogenat detektiert mit 6H4; 8: tg81 Hirnhomogenat nach Deglykosylierung detektiert mit 6H4. Die Molekulargewichte von Markerproteinen sind auf der rechten Seite angegeben.

Die Pfeile markieren die *C*-terminalen Spaltprodukte bei etwa 18 kDa (schwarz) und 20 kDa (grau).

Die im Balkendiagramm dargestellte quantitative Auswertung der Bandenintensitäten durch elektronische Aufzeichnung der Lichtsignale erfolgte jeweils normiert auf die Menge an ungespaltenem Prionprotein. Die Mittelwerte der  $od_{20kDa}/od_{28kDa}$  Quotienten einzelner Analysen sind oberhalb der Balken angegeben. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Die Erkennung des 20 kDa Protein-Fragments durch den Antikörper Kan72 erlaubte auch eine Einschätzung der *N*-terminalen Ausdehnung des Spaltprodukts, da dieses damit zumindest Teile des bei Aminosäure 90 lokalisierten Kan72 Epitops (vergleiche Abbildung 11) beinhalten muß. Dieser Befund stand im Einklang mit der aus dem Molekulargewicht abgeleiteten Größe des 20 kDa Spaltprodukts, das demnach im Vergleich zum 18 kDa Spaltprodukt um etwa zwanzig Aminosäuren verlängert sein sollte.

#### 6.1.4 Zusammenfassende Beurteilung der erhaltenen Ergebnisse

In Hirnhomogenaten waren beide Spaltprodukte der proteolytischen Spaltung des Prionproteins in dessen zentraler Region nachweisbar. Während gezeigt werden konnte, daß das *N*-terminale Spaltprodukt einem raschen proteolytischen Abbau unterliegt und durch diese Instabilität für weitergehende Analysen ungeeignet erschien, konnte das *C*-terminale Spaltprodukt reproduzierbar detektiert und analysiert werden. Neben diesem Spaltprodukt wurde ein zweites *N*-terminal verlängertes *C*-terminales Spaltprodukt des Prionproteins nachgewiesen. In Abbildung 14 sind die mutmaßlichen Spaltstellen und die resultierenden *C*-terminalen Spaltprodukte schematisch dargestellt.

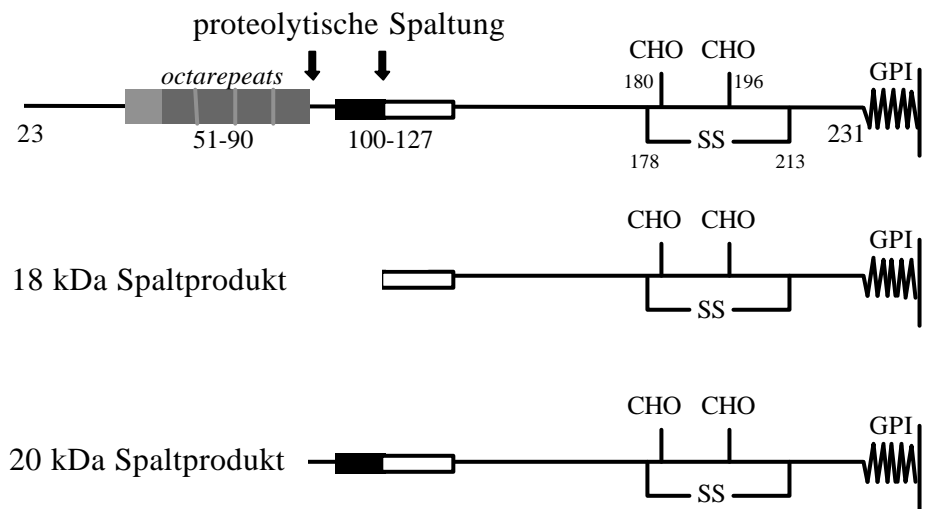


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Prionproteins und seiner *C*-terminalen Spaltprodukte.

Bezeichnungen: *Octarepeats*: fünfmalige P(Q/H)GG(T/G/S)W GQ Sequenzwiederholung (AS 51-90), CHO: *N*-glykosidisch verknüpfte Glykosylierung (AS 180 und 196), SS: Disulfidbrücke zwischen den AS 172 und 213, GPI: GPI-Anker, Schwarze Box: basische Region, weiße Box: hydrophobe Region. Die unterschiedlichen Spaltstellen sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet.

Ein unspezifischer proteolytischer Abbau als mögliche Ursache für das Auftreten der Spaltprodukte des Prionproteins wurde weitestgehend ausgeschlossen. Weder

die Postmortalzeit vor Präparation der Homogenate noch die Anwesenheit verschiedener Proteaseinhibitoren bei deren Herstellung hatten einen Einfluß auf die Menge ermittelten Spaltprodukts. Weiterhin wurde gezeigt, daß das Auftreten diskreter Banden für die C-terminalen Spaltprodukte erst nach Deglykosylierung der Proteine durch die verbesserte Detektierbarkeit der Proteinfragmente nach Abspaltung der Zuckerseitenketten erklärbar war. Beide C-terminalen Spaltprodukte waren mit unterschiedlichen C-terminalen Antikörpern nachweisbar, wobei sich zum Teil deutliche Unterschiede in den Erkennungseffizienzen der verschiedenen Antikörper ergaben.



## 6.2 ANALYSE DER ZELLULÄREN SPALTUNG DES PRIONPROTEINS IN PRP ÜBEREXPRIMIERENDEN ZELLINIEN

Ausgehend von den veröffentlichten Untersuchungen an eukaryontischen Zellkulturen (Harris, D. A. *et al.*, 1993; Chen, S. G. *et al.*, 1995) wurde im folgenden versucht die proteolytische Spaltung des Prionproteins durch verschiedene Analysen an PrP<sup>c</sup> überexprimierenden Zelllinien genauer zu beschreiben. Zur Charakterisierung der Spaltstelle bot sich hier die Möglichkeit auf Aminosäuresequenzebene veränderte Prionproteine überzuexprimieren und die Auswirkungen der eingeführten Veränderungen *in vivo* zu studieren.

Als Zelllinie für die Überexpression des Prionproteins wurde eine murine Neuroblastoma Zelllinie (N2a-Zellen) gewählt, die bereits in zahlreichen Untersuchungen zur Funktion von PrP und PrP-Mutanten verwendet worden war und sich auch für die Infektion mit PrP<sup>sc</sup> als geeignet erwiesen hatte (Butler, D. A. *et al.*, 1988; Tatzelt, J. *et al.*, 1995; Rieger, R. *et al.*, 1998). N2a-Zellen zeigen eine geringe endogene PrP<sup>c</sup>-Expression, so daß davon ausgegangen werden konnte, daß in dieser Zelllinie auch die an Funktion sowie Katabolismus des Prionproteins beteiligten Faktoren zugegen sind. Damit boten sich N2a-Zellen als gutes PrP-Expressionssystem für Untersuchungen der zellulären Spaltung des Proteins an.

### 6.2.1 Einführung des 13A5 Epitops in die murine PrP<sup>c</sup> Aminosäuresequenz

Die verschiedenen PrP-Mutanten wurden auf Basis eines mit dem 13A5 Epitop des Hamster Prionproteins markierten murinen PrP hergestellt, um die zu analysierenden Konstrukte vom endogen in N2a-Zellen gebildeten PrP<sup>c</sup> unterscheiden zu können. Das als moPrPI138M bezeichnete Konstrukt unterschied sich von murinem PrP nur durch einen einzigen Aminosäureaustausch von Isoleucin nach Methionin an Position 138. Das entsprechend mutierte Gen *Prn-pM138* wurde in Zusammenarbeit mit C. Wegner über gezielte Mutagenese durch SOE-PCR mit den äußeren Primern M13uni und M13rev und den inneren Mutageneseprimern 13A5up und 13A5do erzeugt. Als Ausgangskonstrukt diente das über die Schnittstellen *EcoRI* und *HindIII* in den Vektor pBluescript KSII(+) klonierte murine *Prn-p* Gen (Windl, O. *et al.*, 1999). Das so erzeugte *Prn-pI138M* Gen wurde über die Spaltstellen *EcoRI* und *HindIII* unter Erhalt des Vektors pBs-moPrPI138M in das Plasmid pBluescript SKII(-) kloniert und dessen Sequenz durch Sequenzanalyse mit den Primern M13uni-800 und M13rev-800 verifiziert. Anschließend wurde das Konstrukt über die Spaltstellen *XbaI* und *XhoI* unter Erhalt des in Abbildung 15 dargestellten Vektors pCI-moPrPI138M in den eukaryontischen Expressionsvektor pCIneo umklontiert. Das eingefügte Gen stand so unter der Kontrolle der frühen humanen Cytomegalovirus (CMV) Enhancer- und Promotor-Region, die eine starke konstitutive Expression in eukaryontischen

Zellen gewährleistet. Das vorgeschaltete chimäre Intron führte zu einer weiteren Steigerung der Expressionsleistung und das nachgeschaltete späte SV40 Polyadenylierungssignal zur effizienten RNA-Prozessierung. Zur Selektion transformierter *E. coli*-Klone diente das zur Resistenz gegenüber Ampizillin führende  $\beta$ -Lactamase-Gen. Die Selektion stabil transfizierter eukaryontischer Zellen erfolgte über die Aktivität der Neomycin-Phosphotransferase mit Genetizin (G418).

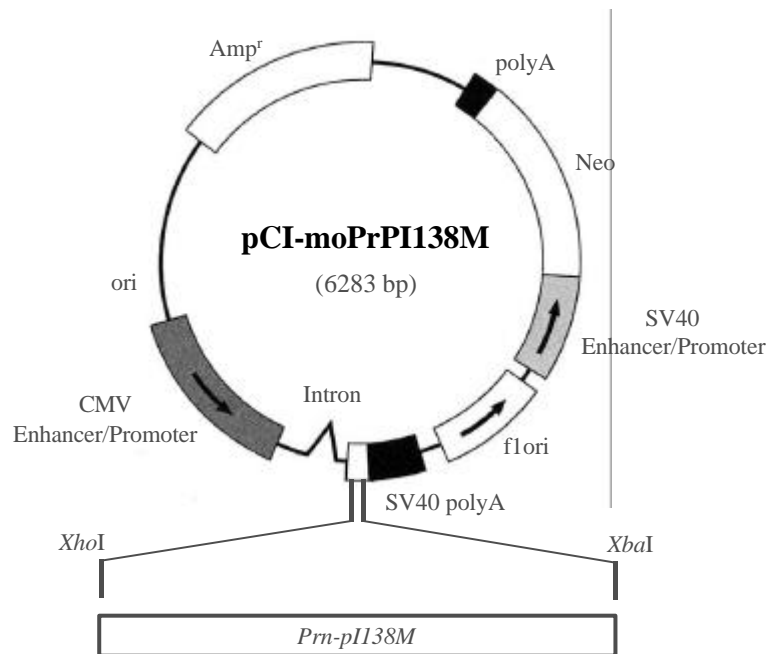


Abbildung 15: Schematische Darstellung des eukaryontischen Expressionsvektors pCI-moPrPI138M.

Bezeichnungen: Amp<sup>r</sup>:  $\beta$ -Lactamase-Gen für die Selektion transformierter *E. coli*-Klone; polyA: Synthetische poly Adenin-Sequenz; Neo: Neomycin-Phosphotransferase-Gen für die Selektion stabil transfizierter eukaryontischer Zellen; SV40 Enhancer/Promoter: SV40 Enhancer und früher Promoter für konstitutive Expression; f1 ori: f1 Replikationsursprung; SV40 polyA: spätes SV40 Polyadenylierungssignal zur effizienten RNA Prozessierung; *Prn-pI138M*: moPrPI138M-Gen; Intron: Chimäres Intron aus der 5'-splice-site des  $\beta$ -Globin Introns und der 3'-splice-site eines IgG-Introns zur gesteigerten Expression; CMV Enhancer/Promoter: Frühe Enhancer- und Promoter-Region des humanen Cytomegalovirus (CMV) für starke konstitutive Expression; ori: SV40 Replikationsursprung; *XhoI* und *XbaI*: Für Klonierungen genutzte Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen.

## 6.2.2 Detektion von für die Spaltung essentiellen Aminosäuren

Zur Analyse der Spaltstelle des Prionproteins wurden durch gezielte Mutagenese *moPrn-p138M*-Gene erzeugt, die Prionproteine mit Aminosäuresequenz-veränderungen im Bereich der Spaltstelle kodierten. Die resultierenden Proteine wurden in N2a Zellen überexprimiert und bezüglich ihrer zellulären Spaltung untersucht. Die Wahl der eingeführten Mutationen war bedingt durch die

Annahme, daß die die Spaltstelle *N*-terminal flankierenden basischen Aminosäuren und die die Spaltstelle *C*-terminal flankierenden kleinen hydrophoben Aminosäuren für die Spaltung an dieser Position verantwortlich sind (Callebaut, I. *et al.*, 1994).

In Abbildung 16 sind die Aminosäuresequenzen der unterschiedlichen moPrPI138M-Konstrukte mit Mutationen im Bereich der Spaltstelle im Vergleich zur moPrPI138M-Kontrolle dargestellt. Die gezeigten Mutanten wurden dort und im Folgenden ausschließlich nach den experimentell entscheidenden Mutationen im Bereich der Spaltstelle benannt. In der Legende zu Abbildung 16 finden sich deren vollständige Bezeichnungen.


<b>Kontrolle</b>	
<b>K105G</b>	KPSKP <u>G</u> TNLK <del>H</del> VAGAAAAGAVVGGLGGY
<b>K109G</b>	KPSKP <del>K</del> TNL <u>G</u> HVAGAAAAGAVVGGLGGY
<b>H110G</b>	KPSKP <del>K</del> TNLK <u>G</u> VAGAAAAGAVVGGLGGY
<b>3G105</b>	KPSKP <u>G</u> TNL <u>GG</u> VAGAAAAGAVVGGLGGY
<b>3S100</b>	<u>SPSS</u> <u>P</u> <del>S</del> TNLK <del>H</del> VAGAAAAGAVVGGLGGY
<b>3S105</b>	KPSKP <u>S</u> TNL <u>SS</u> VAGAAAAGAVVGGLGGY
<b>5S100</b>	<u>SPSS</u> <u>P</u> <del>S</del> TNL <u>SS</u> VAGAAAAGAVVGGLGGY
<b>G/A</b>	KPSKP <del>K</del> TNLK <del>H</del> V <u>AAAAAA</u> AAVVGGLGGY
<b>A/G</b>	KPSKP <del>K</del> TNLK <del>H</del> V <u>GGGGGG</u> <u>GG</u> VVGGLGGY
<b>D 105-125</b>	KPSKP <u>.....</u> GY

Abbildung 16: Aminosäuresequenzen der zentralen Region unterschiedlicher Prionprotein Mutanten im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz.

Alle Konstrukte basieren auf der das 13A5 Epitop tragenden Kontrolle moPrPI138M. Aminosäuresequenzveränderungen bezüglich dieser Kontrolle sind durch Fettdruck und Unterstreichung hervorgehoben. Punkte stellen Deletionen der entsprechenden Kontrollsequenz dar. Beide möglichen Positionen der Spaltstelle sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Bezeichnungen: Wildtyp-Kontrolle: moPrPI138M; K105G: moPrPI138M-K105G; K109G: moPrPI138M-K109G; H110G: moPrPI138M-H110G; 3G105: moPrPI138M-3G105; 3S100: moPrPI138M-3S100; 3S105: moPrPI138M-3S105; 5S100: moPrPI138M-5S100; G/A: moPrPI138M-G/A; A/G: moPrPI138M-A/G, Δ105-125: moPrPI138M-Δ105-125.

In den Konstrukten K105G, K109G und H110G wurde jeweils eine basische Aminosäure *N*-terminal der Spaltstelle durch Glycin ersetzt und das Konstrukt 3G105 trug diese drei Aminosäureaustausche gleichzeitig. In den Konstrukten 3S100, 3S105 und 5S100 wurden verschiedene Austausche basischer Aminosäuren gegen Serin durchgeführt. Nach der Hypothese von Callebaut *et al.* sollten sich all diese Mutationen im basischen Bereich des Proteins negativ auf die

Spaltung auswirken. Die Mutanten 3S105 und 5S100 wiesen neben dem Austausch basischer Aminosäuren gegen unpolare Aminosäuren noch eine weitere Änderung im Vergleich zum Wildtyp-Protein auf. In diesen beiden Konstrukten entstand durch die Veränderung der Aminosäuresequenz ein neues Glykosylierungssignal in direkter Nähe zur Spaltstelle am Asparagin 107. Die Konstrukte G/A und A/G zeichneten sich durch Mutationen im hydrophoben Bereich des Proteins aus. Im einen Fall wurden zwei Glycine durch Alanine ersetzt und im anderen Fall sechs Alanine gegen Glycine. Nach der Hypothese von Callebaut *et al.* war vorstellbar, daß diese Mutationen im hydrophoben Bereich des Proteins nur geringe Auswirkungen auf die proteolytische Spaltung zeigen könnten, da hier die Zusammensetzung der Region aus kleinen hydrophoben Aminosäuren erhalten blieb. Das  $\Delta 105-125$  Konstrukt trug eine Deletion von 21 Aminosäuren, die sich über die Spaltstelle erstreckte und sowohl einen Teil der basischen als auch einen Teil der hydrophoben Region umfaßte.

### 6.2.2.1 Konstruktion und Klonierung verschiedener Prionprotein-Mutanten

Die Etablierung der Konstrukte K105G, K109G, H110G, 3G105, 3S100 und 3S105 erfolgte durch SOE-PCR mit den äußeren Primern T3 und T7neo und den jeweiligen inneren Mutageneseprimern up und do. Als Ausgangsvektor diente das Plasmid pCI-moPrPI138M (siehe Abbildung 15, Seite 60). Die erhaltenen DNA-Konstrukte wurden über ihre *XbaI* und *XhoI* Spaltstellen in die entsprechenden Schnittstellen des eukaryontischen Expressionsvektors pCIneo kloniert und deren Sequenzen über Sequenzanalyse von den Sequenzprimern T3-800 und T7neo-800 ausgehend verifiziert. Das Konstrukt 5S100 wurde auf Basis des Vektors pCI-moPrPI138M3S105 auf gleiche Weise über SOE-PCR mit den entsprechenden Primern hergestellt, über die *XbaI* und *XhoI* Spaltstellen in pCIneo kloniert und sequenziert.

Die weiteren Mutanten wurden in Zusammenarbeit mit C. Wegner auf Basis eines *Prn-pI138M* Gens ohne die ursprüngliche *SmaI* Schnittstelle (Codon Nummer 40) erzeugt. Die Herstellung des dieses Gen tragenden Vektors pBs-moPrPI138M $\Delta$ *SmaI* erfolgte durch SOE-PCR mit den äußeren Primern M13uni und M13rev und den inneren Mutageneseprimern  $\Delta$ *SmaI*up und  $\Delta$ *SmaI*do auf dem Vektor pBS-moPrPI138M. Die *SmaI* Spaltstelle innerhalb der *multiple cloning site* des Vektors wurde durch Spaltung mit *XmaI*, anschließender Glättung der DNA-Enden mit S1 Exonuklease und Religation entfernt. Das  $\Delta 105-125$  Konstrukt wurde auf Basis dieses Vektors durch SOE-PCR mit den äußeren Primern M13uni und M13rev und den inneren Mutageneseprimern  $\Delta 105-125$ up und  $\Delta 105-125$ do erzeugt und über die Schnittstellen *XbaI* und *XhoI* in den Vektor pBluescriptSKII(-) kloniert. Der so erhaltene Vektor pBS-moPrPI138M $\Delta 105-125$  trug neben der Deletion eine neue durch die Mutageneseprimer eingeführte *SmaI* Erkennungssequenz an den Endpunkten der Deletion. Die Erzeugung der Konstrukte G/A und A/G erfolgte durch Hybridisierung der Primer G/Aup mit

G/Ado beziehungsweise A/Gup mit A/Gdo und anschließende Klonierung der hybridisierten Produkte in diese *SmaI* Schnittstelle. Die Sequenzen aller Konstrukte wurde ausgehend von den Sequenzprimern M13uni-800 und M13rev-800 durch Sequenzanalysen bestätigt. Letztlich wurden alle Konstrukte über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *XbaI* und *XhoI* in die entsprechenden Spaltstellen des Expressionsvektors pCIneo kloniert.

### 6.2.2.2 Überexpression der Konstrukte in N2a Zellen

Nach Präparation der entsprechenden Expressionsvektoren wurde die DNA zur stabilen Calciumphosphat-, Effecten- oder Superfect-vermittelten Transformation von N2a-Zellen eingesetzt. Nach Anzucht der G418-resistenten Zellen wurden Zellysate der einzelnen polyklonalen Zelllinien hergestellt und *Western Blot-Analysen* mit unterschiedlichen Antikörpern unterworfen. Zellen mit deutlicher PrP<sup>c</sup> Überexpression wurden unter Selektionsdruck in Kultur gehalten sowie zur späteren Verwendung langfristig in flüssigem Stickstoff gelagert.

In Abbildung 17 ist der immunologische Nachweis der Überexpression der PrP<sup>c</sup> Konstrukte in den für die weiteren Analysen ausgewählten transfizierten polyklonalen N2a Zelllinien (Spuren 1 bis 11) im Vergleich zur endogenen PrP<sup>c</sup> Expression nicht transfizierter N2a-Zellen (Spur 12) gezeigt.

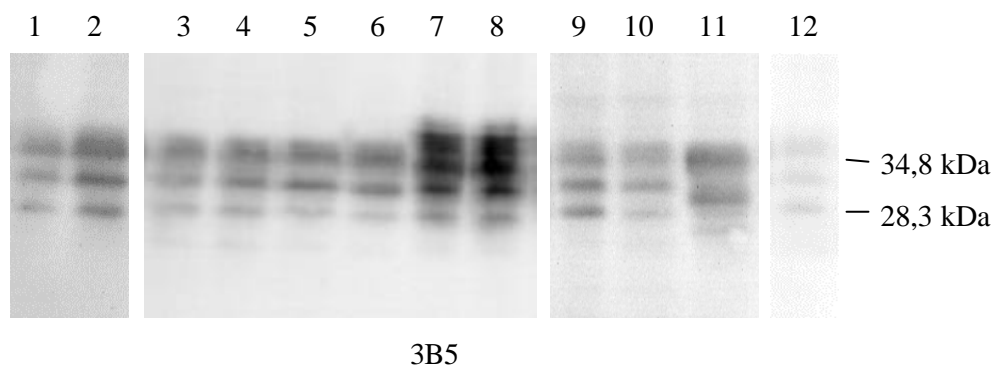


Abbildung 17: Immunologischer Nachweis der Überexpression mutierter Prionproteine in N2a-Zellen nach Auftrennung der Zellysate auf einem 15%igen SDS-PAG.

Aufgetragen wurden jeweils 100 µg Gesamtprotein. Die Detektion erfolgte mit dem Primärantikörper 3B5 und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-AP über die Aufzeichnung von Chemolumineszenzsignalen.

Spuren :1: Wildtyp-Kontrolle; 2: K105G; 3: K109G; 4: H110G; 5: 3G105; 6: 3S100; 7: 3S105; 8: 5S100; 9: G/A; 10: A/G; 11: Δ105-125; 12: N2a-Zellen (nicht transfiziert).

Die Wildtyp-Kontrolle (Spur 1) sowie alle im Bereich der Spaltstelle mutagenisierten Prionproteine (Spuren 2 bis 11) lagen in unterschiedlichen Glykosylierungsstufen vor, was auf eine natürliche Prozessierung der Proteine

hinwies. Abgesehen von den Konstrukten 3S105 und 5S100 (Spuren 7 und 8) zeigten die Proteine eine typische Verteilung der Bandenintensitäten zwischen unglykosylierter sowie einfach und zweifach glykosylierter Form. Das  $\Delta$ 105-125 Konstrukt (Spur 11) wies eine Verschiebung aller drei Banden in Richtung des durch die Deletion verringerten Molekulargewichts auf. Die Konstrukte 3S105 und 5S100 (Spuren 7 und 8) ließen aufgrund ihres zusätzlichen Glykosylierungssignals ein abweichendes Bandenmuster mit Banden oberhalb der zweifach glykosylierten PrP<sup>c</sup>-Form erkennen.

Wie dargestellt wurden für alle Konstrukte G418-resistente polyklonale Zelllinien mit deutlicher Überexpression des mutierten PrP<sup>c</sup> etabliert.

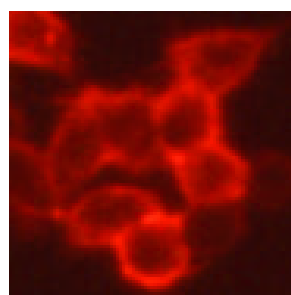
### 6.2.2.3 Lokalisation der mutierten Prionproteine in der Zelle

Durch Immunfluoreszenzmikroskopie sollte ermittelt werden, ob die Lokalisation aller mutagenisierten Prionproteine in überexprimierenden N2a Zellen der natürlichen Lokalisation von PrP<sup>c</sup> an der Zelloberfläche (Stahl, N. *et al.*, 1987) entsprach. Als Antikörper zur Detektion der Prionproteine diente der N-terminale Antikörper 3B5.

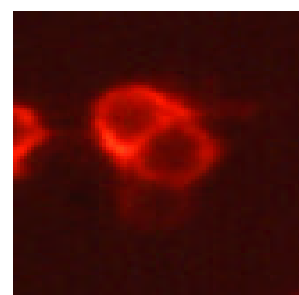
Sowohl die Wildtyp-Kontrolle als auch alle mutagenisierten Prionproteine fanden sich vorwiegend an der Zellmembran lokalisiert und führten dort, wie in Abbildung 18 gezeigt zu deutlichen Fluoreszenzsignalen. Im Vergleich zum endogenen in N2a-Zellen exprimierten PrP<sup>c</sup> bestätigte sich hier auch die Überexpression der verschiedenen Konstrukte.



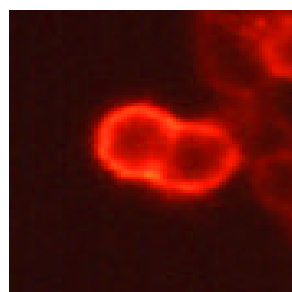
moPrP138M-Kontrolle



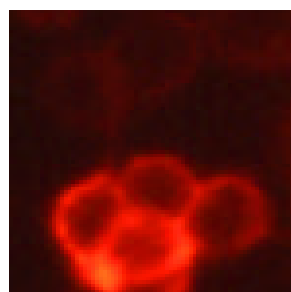
K105G



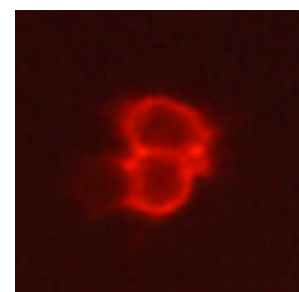
K109G



H110G



3G105



3S105

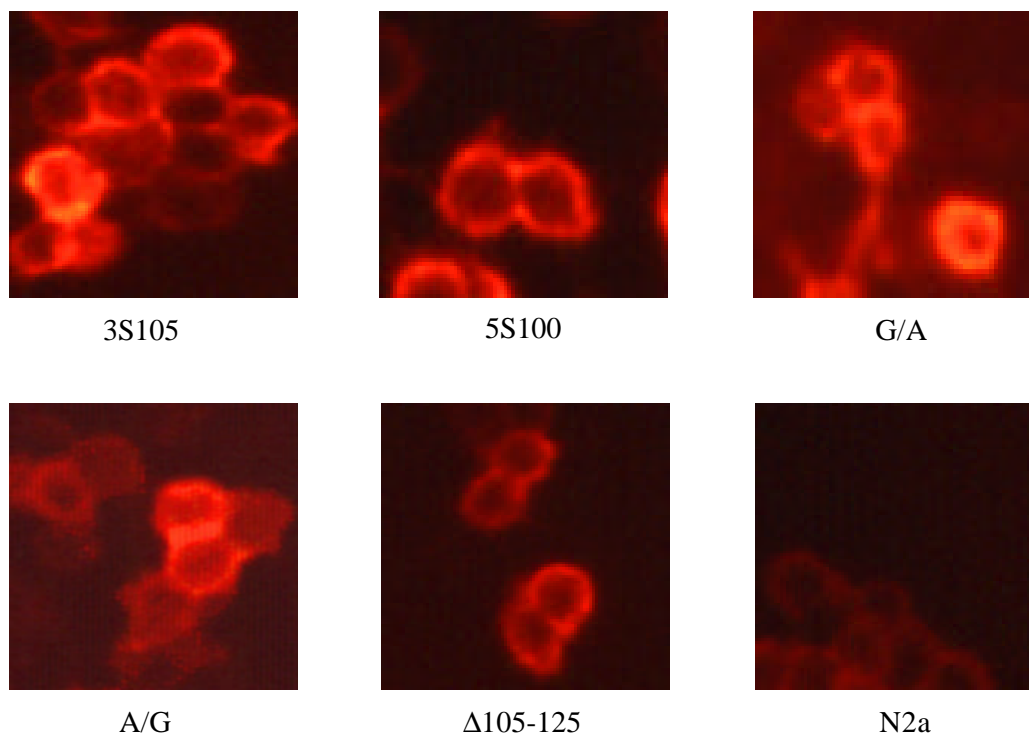


Abbildung 18: Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der Lokalisation der in N2a-Zellen überexprimierten mutierten Prionproteine im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle und zur endogenen PrP-Expression nicht transfizierter N2a-Zellen.

Die Detektion erfolgte in das entsprechende Konstrukt überexprimierenden fixierten und permeabilisierten N2a-Zellen mit dem Primärantikörper 3B5 und dem TRITC gekoppelten Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus.

Weder die eingeführten Mutationen im basischen Bereich des Proteins noch die Mutationen in der hydrophoben Region beeinflussten die durch Immunfluoreszenz detektierbare Lokalisation des Prionproteins an der Zelloberfläche. Auch die Einführung eines zusätzlichen Glykosylierungssignals sowie die Deletion von 21 Aminosäuren in der zentralen Region des Prionproteins hatten keinerlei Einfluß auf die Lokalisation des Proteins.

#### 6.2.2.4 Die proteolytische Spaltung der PrP Mutanten in N2a Zellen

Zur Analyse der proteolytischen Spaltung der in N2a-Zellen überexprimierten PrP-Mutanten wurden von den verschiedenen polyklonalen Zelllinien Zellysate angefertigt, die Proteine durch Behandlung mit PNGaseF deglykolysiert, elektrophoretisch aufgetrennt und PrP<sup>c</sup> immunologisch unter Verwendung der verschiedenen in Abbildung 11 dargestellten C-terminalen Antikörper detektiert und durch Aufzeichnung von Chemolumineszenzsignalen quantifiziert.

### 6.2.2.4.1 Analyse des 18 kDa Spaltprodukts

Eine Auswahl an *Western Blot*-Untersuchungen zur Detektion des 18 kDa Spaltprodukts der unterschiedlichen Konstrukte durchgeführt mit dem Antikörper 6H4 und die Ergebnisse der Quantifizierung von bis zu acht unabhängigen Experimenten sind in Abbildung 19 gezeigt. Aus Tabelle 5 (Anhang, Seite 142) sind die rechnerisch aus den Meßdaten ermittelten Verhältnisse zwischen 18 kDa Spaltprodukt und ungespaltenem PrP zu entnehmen.

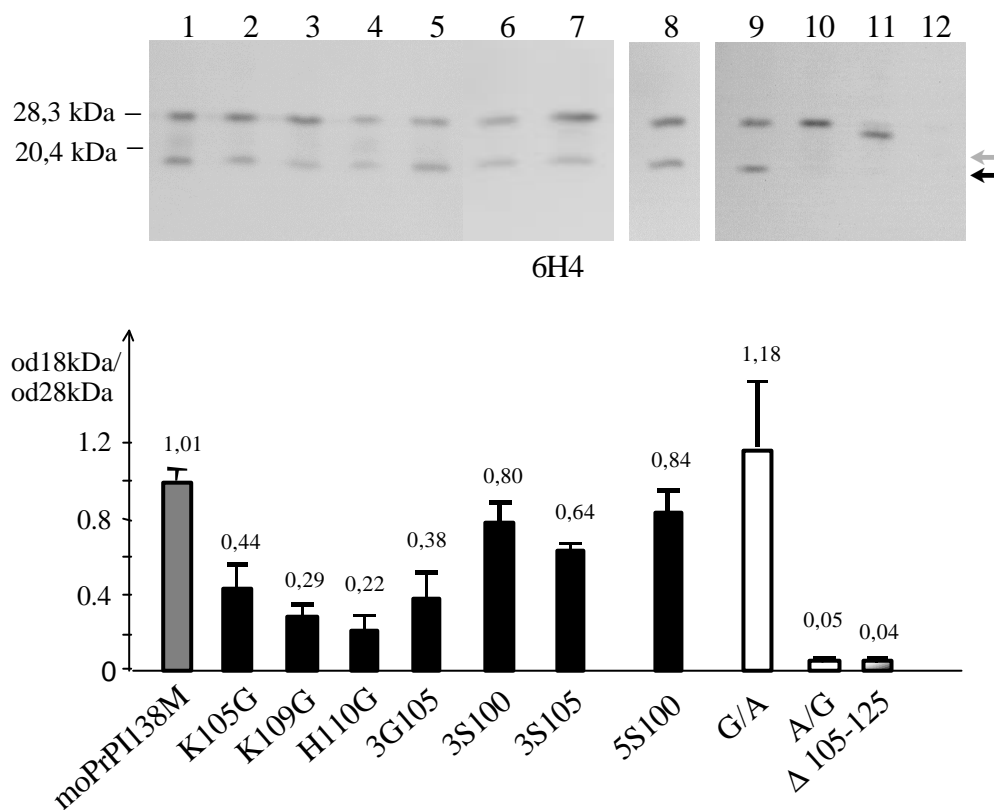


Abbildung 19: *Western Blot*-Analyse der mutierten Prionproteine mit dem Antikörper 6H4 und quantitative Bestimmung des 18 kDa Spaltprodukts im Verhältnis zum nachgewiesenen ungespaltenen Prionprotein.

Die Auftrennung der Proteine aus mit PNGase deglykosylierten N2a-Zellysaten erfolgte auf einem 15%igen SDS-PAG. Aufgetragen wurden jeweils 100 µg Gesamtprotein. Die Detektion erfolgte mit dem Primärantikörper 6H4 und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-AP über die Aufzeichnung von Chemolumineszenzsignalen.

Spuren: 1: Wildtyp-Kontrolle; 2: K105G; 3: K109G; 4: H110G; 5: 3G105; 6: 3S100; 7: 3S105; 8: 5S100; 9: G/A; 10: A/G; 11: Δ105-125; 12: N2a-Zellen (nicht transfiziert). Die Molekulargewichte von Markerproteinen sind auf der linken Seite angegeben.

Die Pfeile markieren die C-terminalen Spaltprodukte bei etwa 18 kDa (schwarz) und 20 kDa (grau).

Die im Balkendiagramm dargestellte quantitative Auswertung der Bandenintensitäten durch elektronische Aufzeichnung der Lichtsignale erfolgte normiert auf die jeweilige Menge an ungespaltenem Prionprotein. Die Mittelwerte der od18kDa/od28kDa Quotienten einzelner Analysen sind oberhalb der Balken angegeben. Fehlerbalken stellen Standardabweichungen dar.



Endogen exprimiertes PrP<sup>c</sup> in nicht transfizierten N2a-Zellen (Spur 12) konnte unter den gewählten Bedingungen immunologisch nicht nachgewiesen werden. In allen transfizierten N2a-Zelllinien hingegen war das aus der Überexpression resultierende Prionprotein detektierbar (Spuren 1 bis 11) und eine quantitative Auswertung möglich. Im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle (Spur 1) zeigte sich, daß die Austausch einzelner basischer Aminosäuren gegen Glycin (Spuren 2 bis 4) zu einer Reduktion an detektierbarem Spaltprodukt geführt haben. Aus der quantitativen Auswertung war zu entnehmen, daß diese Reduktion an Stärke zunahm, je näher der Aminosäureaustausch der Spaltstelle lag. So zeigte das Konstrukt K105G im Mittel einen od18kDa/od28kDa Quotienten von 0,44, das Konstrukt K109G einen Quotienten von 0,29 und das Konstrukt H110G einen noch geringeren Quotienten von 0,22. Die Überprüfung der Signifikanzen dieser Werte untereinander mittels *Student's-t-test* ergab, daß der Unterschied zwischen K105G und H110G als signifikant anzusehen war ( $P = 0,98$ ,  $\alpha = 0,02$ ), wohingegen die Differenzen zwischen K105G und K109G beziehungsweise K109G und H110G sich als nicht signifikant erwiesen. Nach gleichzeitigem Austausch aller drei basischen Aminosäuren im Konstrukt 3G105 (Spur 5) zeigt sich keine gegenseitige Verstärkung der Inhibition der Spaltung, sondern eher eine weniger starke Inhibition als beim Austausch einzelner Aminosäuren. Diese Beobachtung wurde auch durch die Quantifizierung bestätigt, die einen od18kDa/od28kDa Quotienten von 0,38 ergab, der sich nicht signifikant von den Werten der Konstrukte mit Austausch einzelner Aminosäuren unterschied. Die multiplen Austausche basischer Aminosäuren gegen Serin (Spuren 6 bis 8) hatten wenn überhaupt nur schwache Effekte auf die proteolytische Spaltung des Prionproteins. Mit od18kDa/od28kDa Quotienten von 0,80 für das Konstrukt 3S100, 0,64 für das Konstrukt 3S105 und 0,84 für das Konstrukt 5S100 waren die Unterschiede zum od18kDa/od28kDa von 1,01 der Wildtyp-Kontrolle nicht signifikant. Auch die Konstrukte 3S105 und 5S100, die über eine zusätzliche Glykosylierung im Bereich der Spaltstelle verfügten (Spuren 7 und 8), zeigten keine deutlichen Unterschiede bezüglich der Wildtyp-Kontrolle. Die Aminosäuresequenzveränderungen im hydrophoben Bereich der Spaltstelle zeigten zum Teil deutlich drastischere Auswirkungen auf die Spaltung der Proteine. Der Austausch zweier Glycine gegen Alanine unter Bildung von insgesamt acht Alaninen in Folge im Konstrukt G/A (Spur 9) bewirkte eine leicht verstärkte Spaltung des Konstrukts, wie aus dem od18kDa/od28kDa Quotienten von im Mittel 1,18 zu entnehmen war. Die Überprüfung der Signifikanz des Unterschieds zur Wildtyp-Kontrolle ergab jedoch, daß diese Differenz als nicht signifikant anzusehen war. Der Austausch von sechs Alaninen gegen Glycine unter Bildung von insgesamt acht Glycinen im Konstrukt A/G (Spur 10) hingegen inhibierte die Bildung des 18 kDa Spaltprodukts fast vollständig. Dies war auch aus dem hochsignifikanten od18kDa/od28kDa Wert von 0,05 zu entnehmen. Auch die Deletion von 21 Aminosäuren im Konstrukt  $\Delta$ 105-125, die sowohl die

basische als auch die hydrophobe Region umfaßte, führte mit einem Quotienten von 0,04 zu einer nahezu vollständigen Inhibition der Spaltung.

Zur Überprüfung der ermittelten Spaltungseffizienzen einzelner Konstrukte wurden die *Western Blot-Analysen* unter Verwendung anderer *C-terminaler* Antikörper wiederholt.

In Abbildung 20 ist der immunologische Nachweis der verschiedenen PrP-Konstrukte und ihrer Spaltprodukte mit dem Antikörper 13A5 gezeigt. Als Balkendiagramm sind die nach der Quantifizierung rechnerisch ermittelten Verhältnisse zwischen 18 kDa Spaltprodukt und ungespaltenem PrP gezeigt.

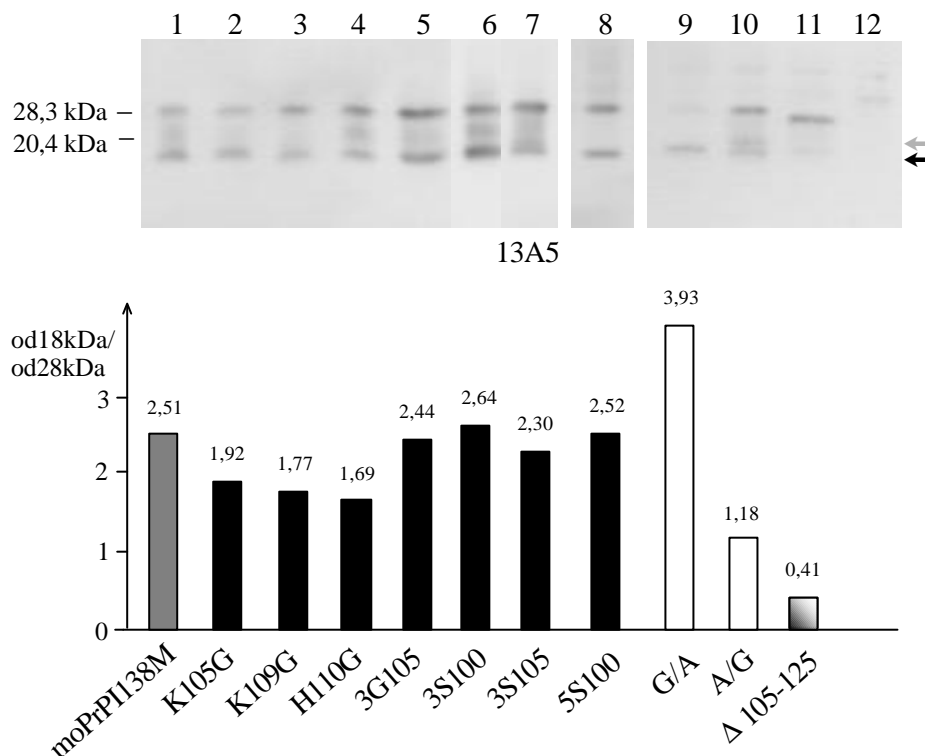


Abbildung 20: *Western Blot-Analyse* der mutierten Prionproteine mit dem Antikörper 13A5 und quantitative Bestimmung des 18 kDa Spaltprodukts im Verhältnis zum nachgewiesenen ungespaltenen Prionprotein.

Die Auftrennung der Proteine aus mit PNGase deglykosylierten N2a-Zellysaten erfolgte auf einem 15%igen SDS-PAG. Aufgetragen wurden jeweils 100 µg Gesamtprotein. Die Detektion erfolgte mit dem Primäntikörper 13A5 und dem Sekundäntikörper Ziege-anti-Maus-AP über die Aufzeichnung von Chemolumineszenzsignalen.

Spuren: 1: Kontrolle; 2: K105G; 3: K109G; 4: H110G; 5: 3G105; 6: 3S100; 7: 3S105; 8: 5S100; 9: G/A; 10: A/G; 11: Δ105-125; 12: N2a-Zellen (nicht transfiziert). Die Molekulargewichte von Markerproteinen sind auf der linken Seite angegeben.

Die Pfeile markieren die *C-terminalen* Spaltprodukte bei etwa 18 kDa (schwarz) und 20 kDa (grau).

Die im Balkendiagramm dargestellte quantitative Auswertung der Bandenintensitäten durch elektronische Aufzeichnung der Lichtsignale erfolgte normiert auf die jeweilige Menge an ungespaltenem Prionprotein. Die od18kDa/od28kDa Quotienten sind oberhalb der Balken angegeben.

Endogen exprimiertes PrP<sup>c</sup> (Spur 12) wurde von diesem Antikörper nicht erkannt, da murines PrP<sup>c</sup> nicht über das entsprechende Hamster-Epitop verfügt. In den unterschiedlichen transfizierten N2a-Zelllinien hingegen waren die mit dem 13A5-Epitop ausgestatteten Prionprotein-Konstrukte und ihre Spaltprodukte detektierbar (Spuren 1 bis 11). Bezüglich der Auswirkungen der eingeführten Mutationen auf die Spaltung des Prionproteins in der zentralen Region bestätigten sich die unter Verwendung des Antikörpers 6H4 erhaltenen Ergebnisse. Einzelne Austausche basischer Aminosäuren gegen Glycin in den Konstrukten K105G (Spur 2), K109G (Spur 3) und H110G (Spur 3) bewirkten im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle (Spur 1) eine leichte Inhibition der proteolytischen Spaltung des Prionproteins, die sich auch in der quantitativen Auswertung widerspiegelte. Der Austausch dieser drei basischen Aminosäuren gleichzeitig im Konstrukt 3G105 (Spur 5) zeigte wenn überhaupt nur einen sehr schwachen negativen Einfluß auf die Spaltung. Die multiplen Aminosäuresequenzveränderungen in den Mutanten 3S100 (Spur 6), 3S105 (Spur 7) und 5S100 (Spur 8) hatten keinerlei Auswirkung auf die Spaltungseffizienz, was sich auch in den der Wildtyp-Kontrolle sehr ähnlichen od18kDa/od28kDa Quotienten zeigte, die für jedes Konstrukt über den Balken des Diagramms dargestellt sind. Auch die Daten hinsichtlich der PrP-Konstrukte mit Mutationen im hydrophoben Bereich der Spaltstelle entsprachen den schon mit dem 6H4 Antikörper ermittelten Werten. Das Konstrukt G/A (Spur 9) zeigte eine deutlich verstärkte Spaltung mit einem od18kDa/od20kDa Quotienten von 3,93 und die Mutante G/A (Spur 10) eine starke Inhibition der Spaltung mit einem Quotienten von 1,18. Die Mutante  $\Delta$ 105-125 (Spur 11) zeigte mit einem Wert von 0,41 eine stark verminderte Menge an 18kDa Spaltprodukt.

Die Auswertung eines exemplarischen *Western Blots* bezüglich des 18kDa Spaltprodukts mit dem Antiserum 1A8, die in Abbildung 21 gezeigt ist, bestätigt die Tendenz der bereits beschriebenen Einflüsse verschiedener Mutationen auf die zelluläre Spaltung des Prionproteins nochmals.

Prionprotein nicht transfizierter N2a-Zellen war auch mit diesem Antikörper unter den gewählten Bedingungen nicht detektierbar (Spur 12). Die die unterschiedlichen PrP-Konstrukte überexprimierenden N2a-Zelllinien (Spuren 1 bis 11) hingegen zeigten deutliche Signale. Die quantitative Auswertung der *Western Blots* ergab auch hier eine deutliche Inhibition der Spaltung durch Austausche basischer Aminosäuren gegen Glycin (Spuren 2 bis 5) im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle (Spur 1). Austausche gegen Serin hatten keinen Effekt auf die Spaltung (Spuren 6 bis 8). Das Konstrukt G/A (Spur 9) wies eine der Wildtyp-Kontrolle (Spur 1) vergleichbare Spaltaktivität auf, wohingegen das Konstrukt A/G (Spur 10) kaum gespalten wurde. Weiterhin zeigte auch die Deletionsmutante  $\Delta$ 105-125 (Spur 11) den gleichen inhibitorischen Phänotyp wie bei Analysen mit anderen C-terminalen Antikörpern.

Somit konnten die Einflüsse verschiedener Aminosäuresequenzveränderungen auf die proteolytische Spaltung von PrP<sup>c</sup> in N2a-Zellen mit unterschiedlichen C-

terminalen Antikörpern dokumentiert werden (Abbildung 19, Abbildung 20 und Abbildung 21). Die teilweise aufgetretenen Unterschiede einzelner Ergebnisse waren zum Teil bedingt durch die schon beschriebenen unterschiedlichen Effizienzen der Erkennung des 18 kDa Spaltprodukts durch die unterschiedlichen Antikörper (siehe Abbildung 12, Seite 55). Zudem wurden mit den Antikörpern 13A5 und 1A8 jeweils nur eine quantitative Bestimmung dargestellt, so daß in diesen Fällen mögliche experimentelle Schwankungen nicht ausgeschlossen werden konnten.

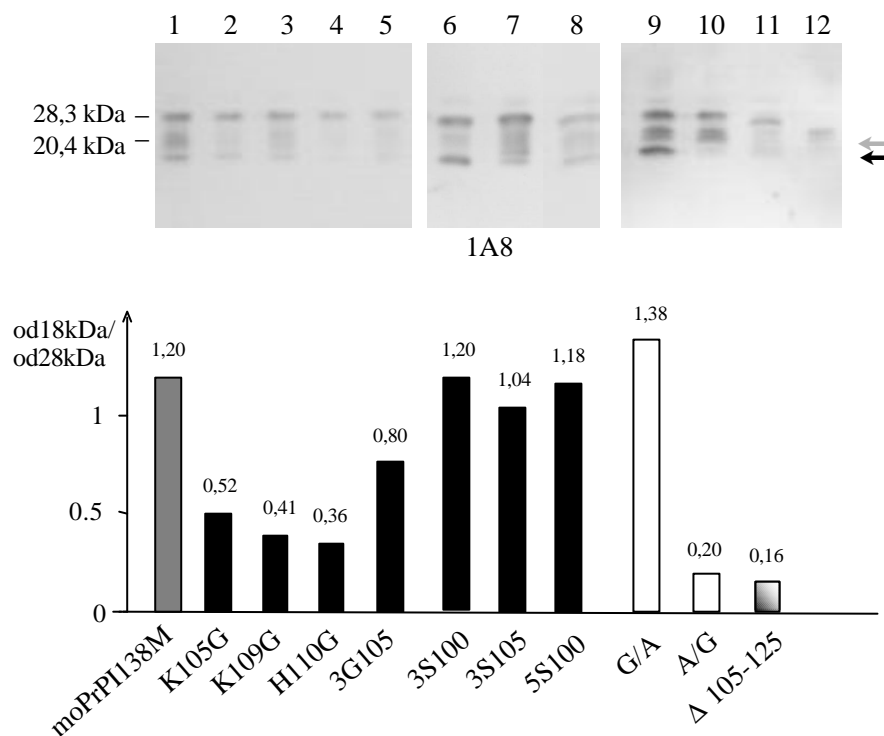


Abbildung 21: *Western Blot-Analyse* der mutierten Prionproteine mit dem Antiserum 1A8 und quantitative Bestimmung des 18 kDa Spaltprodukts im Verhältnis zum nachgewiesenen ungespaltenen Prionprotein.

Die Auftrennung der Proteine aus mit PNGase deglykosylierten N2a-Zellysaten erfolgte auf einem 15%igen SDS-PAG. Aufgetragen wurden jeweils 100 µg Gesamtprotein. Die Detektion erfolgte mit dem Primärantiserum 1A8 und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Kaninchen-AP über die Aufzeichnung von Chemolumineszenzsignalen.

Spuren: 1: Kontrolle; 2: K105G; 3: K109G; 4: H110G; 5: 3G105; 6: 3S100; 7: 3S105; 8: 5S100; 9: G/A; 10: A/G; 11: Δ105-125; 12: N2a-Zellen (nicht transfiziert). Die Molekulargewichte von Markerproteinen sind auf der linken Seite angegeben.

Die Pfeile markieren die C-terminalen Spaltprodukte bei etwa 18 kDa (schwarz) und 20 kDa (grau).

Die im Balkendiagramm dargestellte quantitative Auswertung der Bandenintensitäten durch elektronische Aufzeichnung der Lichtsignale erfolgte normiert auf die jeweilige Menge an ungespaltenem Prionprotein. Die od18kDa/od28kDa Quotienten sind oberhalb der Balken angegeben.

#### 6.2.2.4.2 Analyse des 20 kDa Spaltprodukts

Die Analyse des 20 kDa Spaltprodukts erfolgte zunächst durch immunologische Detektion des deglykosylierten Prionproteins mit dem Antiserum Kan72. Wie aus Abbildung 11 (Seite 53) sowie Abbildung 13 (Seite 56) hervorgeht erkennt das Antiserum Kan72 neben ungespaltenem PrP ausschließlich das 20 kDa Spaltprodukt. Die zu diesem Produkt führende Spaltung des Prionproteins findet etwa 20 Aminosäuren *N*-terminal der proteolytischen Spaltung im zentralen Bereich des Proteins statt.

Eine Auswahl exemplarischer *Western Blot-Analysen* zur Detektion des 20 kDa Spaltprodukts der unterschiedlichen Prionprotein-Konstrukte durchgeführt mit dem Antiserum Kan72 und die Ergebnisse der Quantifizierung von bis zu sieben unabhängigen Experimenten sind in Abbildung 22 gezeigt. Aus Tabelle 7 (Anhang, Seite 143) sind die zugehörigen rechnerisch aus den Meßdaten ermittelten Verhältnisse zwischen 20 kDa Spaltprodukt und ungespaltenem PrP zu entnehmen.

Endogen exprimiertes Prionprotein nicht transfizierter N2a-Zellen konnte unter den gewählten Bedingungen mit dem Antiserum Kan72 nicht nachgewiesen werden (Spur 12). Alle transfizierten Zelllinien hingegen zeigten deutliche Signale für ihre jeweiligen PrP-Konstrukte (Spuren 1 bis 11) und eine quantitative Auswertung konnte erfolgen. Verglichen mit der für die Wildtyp-Kontrolle ermittelten Menge an Spaltprodukt (Spur 1) zeigten insbesondere die Aminosäureaustausche in der basischen Region einen negativen Einfluß auf die Spaltung (Spuren 2 bis 8). Die für diese Mutanten ermittelten  $od20kDa/od28kDa$  Quotienten lagen zwischen 0,37 für das Konstrukt H110G (Spur 4) und 0,60 für das Konstrukt 3G105 (Spur 5) verglichen mit einem Wert von 0,82 für die Wildtyp-Kontrolle (Spur 1). Die Abweichungen der für die Mutanten ermittelten Werte untereinander waren nach Durchführung des *Student's-t-test* als nicht signifikant anzusehen, wohingegen die jeweilige Abweichung vom Quotienten der Wildtyp-Kontrolle signifikant waren ( $P = 98, \hat{a} 0,02$ ). Die Mutationen im hydrophoben Bereich des Prionproteins in den Konstrukten A/G (Spur 9) und G/A (Spur 10) hatten keinen Einfluß auf die Spaltbarkeit des Prionproteins. Die durch Quantifizierung ermittelten  $od20kDa/od28kDa$  Quotienten wichen nicht signifikant vom Wert der Wildtyp-Kontrolle (Spur 1) ab. Die Deletionsmutante (Spur 11) hingegen zeigte mit einem Quotienten von 0,10 eine kaum nachweisbare Mengen an 20 kDa Spaltprodukt und zeigte demnach eine fast vollständige Inhibition der proteolytischen Spaltung.

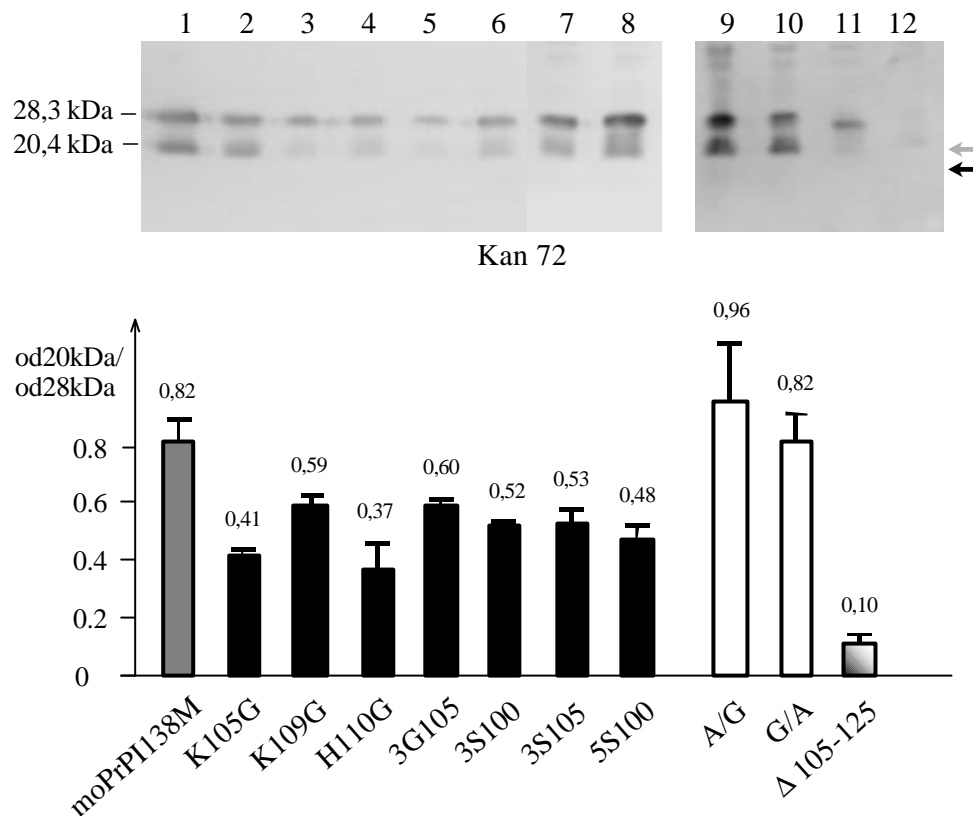


Abbildung 22: *Western Blot-Analyse* der mutierten Prionproteine mit dem Antiserum Kan72 und quantitative Bestimmung des 20 kDa Spaltprodukts im Verhältnis zum nachgewiesenen ungespaltenen Prionprotein.

Die Auftrennung der Proteine aus mit PNGase deglykosylierten N2a-Zellysaten erfolgte auf einem 15%igen SDS-PAG. Aufgetragen wurden jeweils 100  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein. Die Detektion erfolgte mit dem Primärantiserum Kan72 und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Kaninchen-AP über die Aufzeichnung von Chemo lumineszenzsignalen.

Spuren: 1: Wildtyp-Kontrolle; 2: K105G; 3: K109G; 4: H110G; 5: 3G105; 6: 3S100; 7: 3S105; 8: 5S100; 9: A/G; 10: G/A; 11:  $\Delta 105-125$ ; 12: N2a-Zellen (nicht transfiziert). Die Molekulargewichte von Markerproteinen sind auf der linken Seite angegeben.

Die Pfeile markieren die C-terminalen Spaltprodukte bei etwa 18 kDa (schwarz) und 20 kDa (grau).

Die im Balkendiagramm dargestellte quantitative Auswertung der Bandenintensitäten durch elektronische Aufzeichnung der Lichtsignale erfolgte normiert auf die jeweilige Menge an ungespaltenem Prionprotein. Die Mittelwerte der  $\text{od}_{20\text{kDa}}/\text{od}_{28\text{kDa}}$  Quotienten einzelner Analysen sind oberhalb der Balken angegeben. Fehlerbalken stellen Standardabweichungen dar.

Zur Überprüfung der ermittelten Spaltungseffizienzen einzelner Konstrukte wurden die *Western Blot-Analysen* unter Verwendung des C-terminalen Antiserums 1A8 wiederholt.

In Abbildung 23 sind der immunologische Nachweis der verschiedenen PrP-Konstrukte und ihrer Spaltprodukte mit dem Antiserum 1A8 (vergleiche auch Abbildung 21) sowie die Ergebnisse der aus der Quantifizierung rechnerisch ermittelten Verhältnisse zwischen 20 kDa Spaltprodukt und ungespaltenem PrP gezeigt.

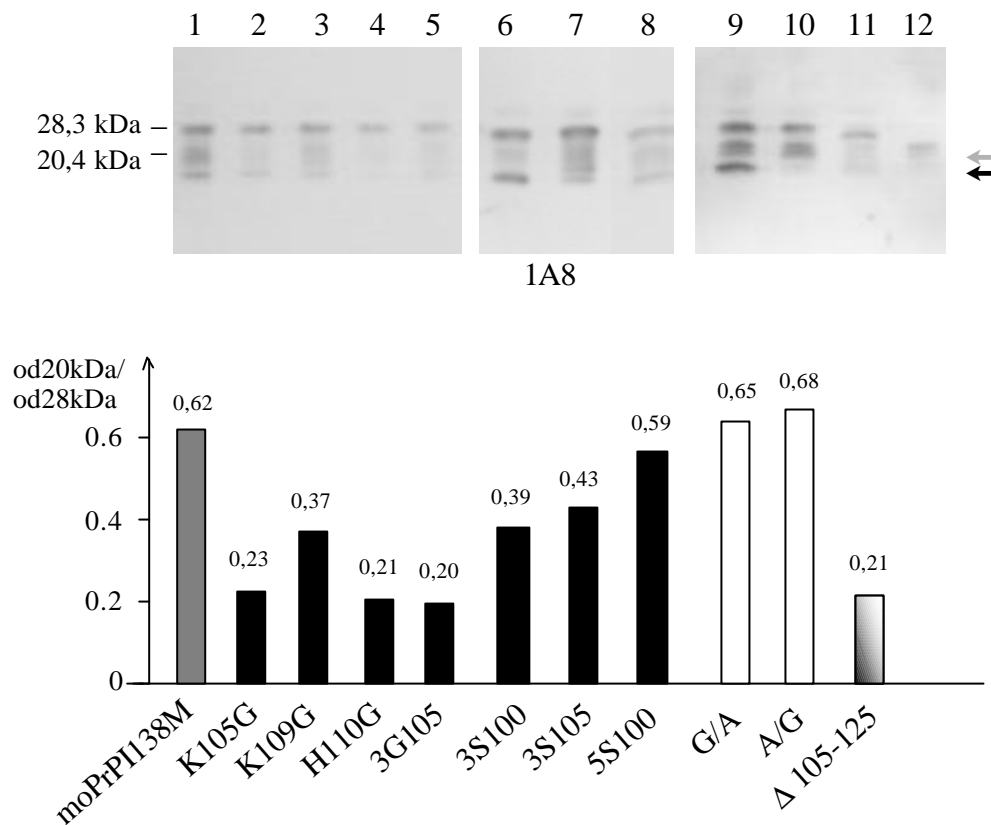


Abbildung 23: Western Blot-Analyse der mutierten Prionproteine mit dem Antiserum 1A8 und quantitative Bestimmung des 20 kDa Spaltprodukts im Verhältnis zum nachgewiesenen ungespaltenen Prionprotein.

Die Auftrennung der Proteine aus mit PNGase deglykosylierten N2a-Zellysaten erfolgte auf einem 15%igen SDS-PAG. Aufgetragen wurden jeweils 100 µg Gesamtprotein. Die Detektion erfolgte mit dem Primäntiserum 1A8 und dem Sekundäntikörper Ziege-anti-Kaninchen-AP über die Aufzeichnung von Chemolumineszenzsignalen.

Spuren: 1: Kontrolle; 2: K105G; 3: K109G; 4: H110G; 5: 3G105; 6: 3S100; 7: 3S105; 8: 5S100; 9: G/A; 10: A/G; 11: Δ105-125; 12: N2a-Zellen (nicht transfiziert). Die Molekulargewichte von Markerproteinen sind auf der linken Seite angegeben.

Die Pfeile markieren die C-terminalen Spaltprodukte bei etwa 18 kDa (schwarz) und 20 kDa (grau).

Die im Balkendiagramm dargestellte quantitative Auswertung der Bandenintensitäten durch elektronische Aufzeichnung der Lichtsignale erfolgte normiert auf die jeweilige Menge an ungespaltenem Prionprotein. Die od20kDa/od28kDa Quotienten sind oberhalb der Balken angegeben.

Endogen in nicht transfizierten N2a-Zellen exprimiertes Prionprotein wurde mit dem 1A8 Antiserum nicht nachgewiesen (Spur 12). Für alle transfizierten N2a-Zellen war der quantitative Nachweis der PrP-Konstrukte möglich (Spuren 1 bis 11). Bei Verwendung des 1A8 Antiserums zeigten sich ähnliche Unterschiede der Spaltungseffizienz verschiedener Konstrukte wie bei Analysen mit dem Kan72 Antiserum. Verglichen mit der Spaltungseffizienz der Wildtyp-Kontrolle (Spur 1) zeigten insbesondere Mutationen in der basischen Region einen inhibitorischen Effekt auf die Spaltung des Proteins. (Spuren 2 bis 8), was durch deutlich von der Kontrolle differierende od20kDa/od28kDa Quotienten, die jeweils oberhalb der

Balken des Diagramms angegeben sind zum Ausdruck kam. Aminosäuresequenzveränderungen in der hydrophoben Region des Prionproteins (Spuren 9 und 10) hatten keinen deutlichen Einfluß auf die proteolytische Spaltung. Die Deletionsmutante  $\Delta 105-125$  (Spur 11) hingegen zeigte nur sehr wenig 20 kDa Spaltprodukt im Verhältnis zu ungespaltenem Prionprotein. Hier wurde die Spaltung offenbar stark inhibiert.

Die unterschiedlichen immunologischen Untersuchungen zum 20 kDa Spaltprodukt kamen somit zu vergleichbaren Resultaten (Abbildung 22 und Abbildung 23). Abweichungen einzelner Daten waren möglicherweise auf verschieden ausgeprägte Effizienzen der Erkennung des 20 kDa Spaltprodukts der beiden verwendeten Antikörper zurückzuführen (siehe Abbildung 13, Seite 56).

#### 6.2.2.5 Die Wirkung von Tunikamyzin auf die Spaltung von PrP<sup>c</sup>

Da die Spaltung des Prionproteins erst nach Deglykosylierung detektierbar war, wurden neben den Analysen mit durch PNGaseF *in vitro* deglykosyliertem PrP<sup>c</sup> auch Untersuchungen mit in Gegenwart von Tunikamyzin kultivierten N2a-Zellen durchgeführt, um die ermittelten Resultate in diesem System zu vergleichen. Beim Wachstum eukaryontischer Zellen in Anwesenheit von Tunikamyzin wird die *N*-Glykosylierung von Glykoproteinen wie PrP<sup>c</sup> vollständig inhibiert (Caughey, B. *et al.*, 1989).

In Abbildung 24 ist der immunologische Nachweis einer Auswahl unterschiedlicher PrP-Mutanten mit Aminosäureaustauschen sowohl in der basischen als auch in der hydrophoben Region des Proteins nach Wachstum der die Konstrukte überexprimierenden Zellen in Anwesenheit von Tunikamyzin dargestellt. Analysiert wurden hier neben der Wildtyp-Kontrolle (Spur 1) die Konstrukte K105G (Spur 2), K109G (Spur 3), H110G (Spur 4), G/A (Spur 5), A/G (Spur 6) und  $\Delta 105-125$  (Spur 7), da diese in den zuvor beschriebenen Experimenten zum Teil deutliche Veränderungen bezüglich der proteolytischen Spaltung aufgewiesen hatten. Die Analysen wurden mit den C-terminalen Antikörpern 13A5 (Abbildung 24 A) und 6H4 (Abbildung 24 B) durchgeführt.

Bei allen Konstrukten mit Aminosäuresubstitutionen ließ sich mit beiden Antikörpern eine Bande bei 28 kDa für ungespaltenes Prionprotein detektieren (Spuren 1 bis 6). Das Konstrukt  $\Delta 105-125$  zeigte aufgrund der Deletion von 21 Aminosäuren eine Bande leicht verringerten Molekulargewichts (Spur 7). Weiterhin wurde für alle Konstrukte eine im Verhältnis zur jeweils nachgewiesenen Menge ungespaltenem Prionproteins konstant starke Bande bei 18 kDa detektiert. Eine Bande bei 20 kDa konnte mit keinem der beiden Antikörper eindeutig nachgewiesen werden (Spuren 1 bis 7).



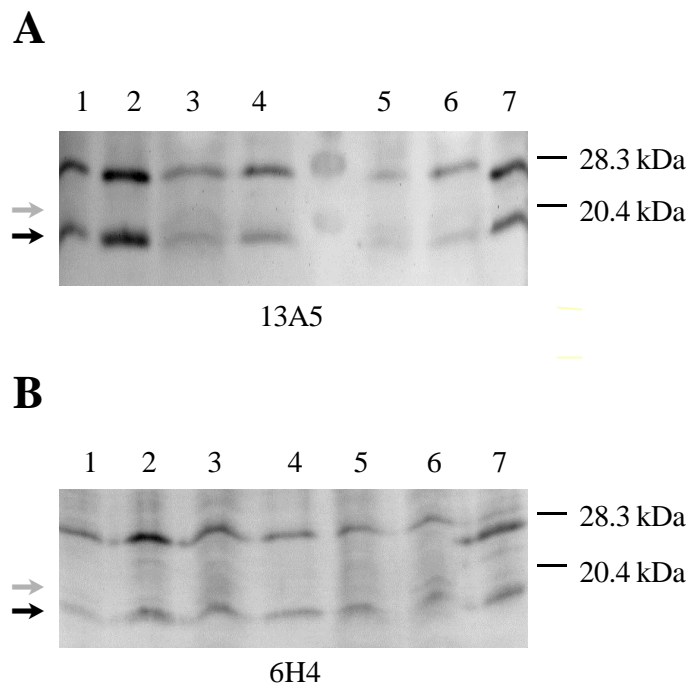


Abbildung 24: Immunologischer Nachweis der mutierten Prionproteine in N2a-Zellen nach Wachstum in Gegenwart von Tunikamyzin.

Die verwendeten Zellen wurden vor Herstellung der Lysate für 48 h in Anwesenheit von 10 µg/ml Tunikamyzin kultiviert. Die Auftrennung der Zellysate erfolgte auf einem 15%igen SDS-PAG. Aufgetragen wurden jeweils 100 µg Gesamtprotein. Die Detektion erfolgte mit den Primärantikörpern 13A5 (A) oder 6H4 (B) und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-AP über Reaktion mit NBT/BCIP.

Spuren: 1: Wildtyp-Kontrolle; 2: K105G; 3: K109G; 4: H110G; 5: G/A; 6: A/G; 7: Δ105-125. Die Molekulargewichte von Markerproteinen sind auf der rechten Seite angegeben.

Die Pfeile markieren die C-terminalen Spaltprodukte bei etwa 18 kDa (schwarz) und 20 kDa (grau).

Die durch einige eingeführten Mutationen zuvor beobachteten Veränderungen der Spaltungseffizienz konnten hier nicht nachgewiesen werden. Sowohl die Konstrukte mit Mutationen im basischen Bereich des Proteins (Spuren 2 bis 4), die nach Deglykosylierung mit PNGaseF eine leicht verminderte Spaltungseffizienz aufgewiesen hatten, als auch die Konstrukte mit Mutationen im hydrophoben Bereich des Proteins, von denen das Konstrukt G/A (Spur 5) eine leichte Steigerung und das Konstrukt A/G eine starke Hemmung der Spaltung in den vorangegangenen Experimenten gezeigt hatte, wiesen nach Wachstum der Zellen in Anwesenheit von Tunikamyzin keinerlei Veränderungen bezüglich ihrer Spaltbarkeit auf. Auch die zuvor als spaltungsdefizient bezeichnete Mutante Δ105-125 (Spur 7) wurde in diesem Ansatz wie die Wildtyp-Kontrolle (Spur 1) gespalten. Auffällig war hier, daß das auftretende Spaltprodukt keine Molekulargewichtsveringerung zeigte, die aufgrund der eingeführten Deletion in diesem Konstrukt zu erwarten gewesen wäre. Infolge dieser Beobachtungen blieb unsicher, ob die bei 18 kDa aufgetretene Bande tatsächlich das unter physiologischen Bedingungen auftretende 18 kDa Spaltprodukt dargestellt hat.

Auch die Tatsache, daß das 20 kDa Spaltprodukt nicht nachweisbar war ließ die Vermutung zu, daß bei Anwesenheit von Tunikamyzin im Wachstumsmedium viele physiologische Prozesse nicht oder nur gestört ablaufen und somit die Übertragbarkeit von auf diese Weise ermittelten Ergebnissen auf die Situation *in vivo* eher fraglich ist.

#### 6.2.2.6 Proteinase K Sensitivität verschiedener PrP Mutanten in N2a Zellen

Die Bildung von Proteinase K resistentem Prionprotein ist nach der zellulären Spaltung des Proteins im Bereich der Aminosäuren 111 oder 112 vermutlich nicht möglich, da der C-terminale proteaseresistente Kern von PrP<sup>Sc</sup> etwa bei Aminosäure 90 beginnt (siehe Abbildung 2). Im Umkehrschluß lag die Vermutung nahe, daß die Inhibition der zellulären Spaltung zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Proteinase K resistenten PrP-Molekülen oder aber sogar zur spontanen Bildung von PrP<sup>Sc</sup> führen könnte.

Zur Beantwortung der Frage ob ein solcher Effekt tatsächlich zu beobachten ist, wurden alle in dieser Studie erzeugten PrP-Konstrukte einer Behandlung mit Proteinase K unterzogen. In Abbildung 25 ist der immunologische Nachweis der PrP-Konstrukte vor und nach Verdau der Zellysate mit 3,3 µg/ml Proteinase K für 10 Minuten bei 37 °C an einigen Beispielen dargestellt.

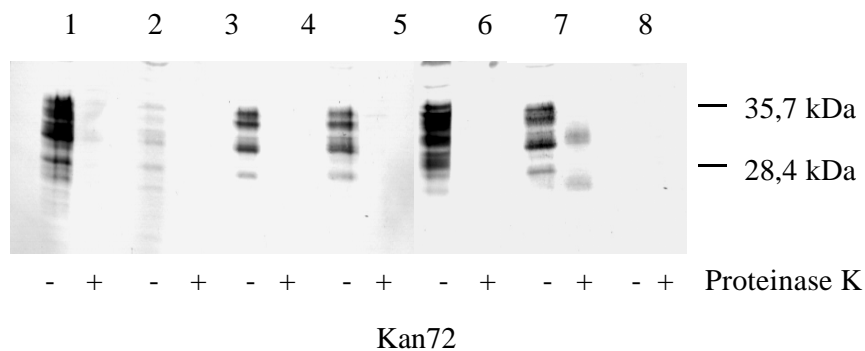


Abbildung 25: Immunologischer Nachweis der mutierten Prionproteine vor und nach milder Behandlung mit Proteinase K.

Der Verdau von jeweils 100 µg Gesamtprotein wurde für 10 min bei 37 °C mit einer Proteinase K Konzentration von 3,3 µg/ml durchgeführt. Die Auftrennung der Proteine vor (-) und nach (+) der Behandlung mit Proteinase K erfolgte auf einem 15%igen SDS-PAG. Die Detektion erfolgte mit dem Primäntiserum Kan72 und dem Sekundäntikörper Ziege-anti-Kaninchen-AP über Reaktion mit NBT/BCIP.

Spuren: 1: Wildtyp-Kontrolle; 2: K105G; 3: K109G; 4: H110G; 5: G/A; 6: A/G; 7: N2a-Zellen (nicht transfiziert). Die Molekulargewichte von Markerproteinen sind auf der rechten Seite angegeben.

Wie durch Proteinfärbung mit Coomassie im SDS-PAG gezeigt werden konnte wurde schon bei dieser milden Form der Proteinase K Behandlung ein Großteil der Proteine im Zellysat abgebaut (Daten nicht gezeigt). Auch die Prionprotein-

Konstrukte K105G (Spur 2), K109G (Spur 3) und H110G (Spur 4) mit Aminosäureaustauschen im basischen Bereich des Proteins waren, wie die Wildtyp-Kontrolle (Spur 1) nach der Behandlung immunologisch nicht mehr nachweisbar. Ebenso war das Konstrukt G/A (Spur 5) vollständig abgebaut. Die Mutante A/G hingegen (Spur 6) zeigte unter diesen Bedingungen eine partielle Proteinase K Resistenz, und wies das für PrP<sup>Sc</sup> nach stringenter Behandlung mit Proteinase K typische Bandenmuster im Bereich geringeren Molekulargewichts auf. Zum Vergleich wurde ein Verdau von Hamster PrP<sup>Sc</sup> unter üblichen Bedingungen mit 20 µg/ml Proteinase K für 60 Minuten bei 37 °C durchgeführt, der in Abbildung 26 gezeigt ist. Proteinase K resistente Banden wurden wie im Fall des A/G-Konstrukts im Bereich von 20 bis 30 kDa detektiert (Spur 2). Unbehandeltes PrP<sup>Sc</sup> zeigte eine Bandenverteilung zwischen 28 und 35 kDa (Spur 1). Abgesehen von der Mutante A/G wurden alle anderen in dieser Studie erzeugten PrP-Konstrukte unter mildem Proteinase K Verdau vollständig abgebaut (Daten nicht für alle Konstrukte gezeigt).

Ein interessanter Aspekt dieser Analysen war, daß ein PrP-Konstrukt mit deutlicher Inhibition der Spaltung das Auftreten von partieller Proteinase K Resistenz aufwies. Auf der anderen Seite zeigten Konstrukte mit geringfügiger eingeschränkter Spaltungseffizienz, wie das Konstrukt H110G einen derartigen Effekt nicht. Und auch die Mutante  $\Delta$ 105-125, die eine ebenso starke Inhibition der Spaltung aufwies wie die Mutante G/A zeigte kein Auftreten einer Proteinase K resistenten Bande (Daten nicht gezeigt). Somit konnte nicht auf einen direkter Zusammenhang zwischen Spaltungseffizienz und der gesteigerten Wahrscheinlichkeit des Auftretens Proteinase K resistenter Prionprotein-Moleküle geschlossen werden.

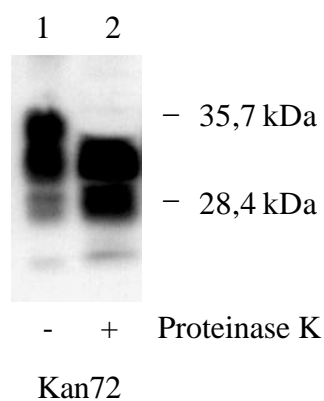


Abbildung 26: Immunologischer Nachweis von PrP<sup>Sc</sup> vor und nach Behandlung mit Proteinase K.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte auf einem 15 %igen SDS-PAG. Der Nachweis von PrP wurde mit dem Primärantiserum Kan72 und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Kaninchen-AP über die Aufzeichnung von Chemolumineszenzsignalen durchgeführt.

Spuren: 1:Hamster PrP<sup>Sc</sup> vor Proteinase K Behandlung; 2: Hamster PrP<sup>Sc</sup> nach 60 min 20 µg/ml Proteinase K Reaktion bei 37 °C. Die Molekulargewichte von Markerproteinen sind auf der rechten Seite angegeben.

### 6.2.2.7 Überexpression der Prionprotein Mutanten in CHO Zellen

Zur Bestätigung der durch Überexpression verschiedener PrP-Mutanten in N2a-Zellen und anschließende Analyse der zellulären Spaltung des Prionproteins gewonnenen Daten wurden die verschiedenen Konstrukte in eine weitere eukaryontische Zelllinie (CHO-Zellen) eingebracht.

Die Transfektion von CHO-Zellen wurde mit Hilfe der Transfektionsreagenzien Superfect und Effecten durchgeführt. Nach erfolgter Selektion wurden Zellysate der entsprechenden polyklonalen Linien im *Western Blot* auf die PrP-Überexpression hin untersucht. Wegen der im Vergleich zur Überexpression in N2a-Zellen sehr schwacher Expression der Konstrukte in dieser Zelllinie erfolgten die durchgeführten *Western Blot-Analysen* zur Detektion der Spaltprodukte nach vorheriger Immunpräzipitation der PrP-Konstrukte mit dem Antiserum 1A8.

In Abbildung 27 ist der immunologische Nachweis einer Auswahl von in CHO-Zellen exprimierten PrP-Konstrukten nach Deglykosylierung gezeigt. Die Analyse der zellulären Spaltung war aufgrund der schwachen Expression nur schwer möglich. Sichere Aussagen hinsichtlich der Spaltbarkeit verschiedener Prionprotein-Konstrukte konnten nicht getroffen werden.

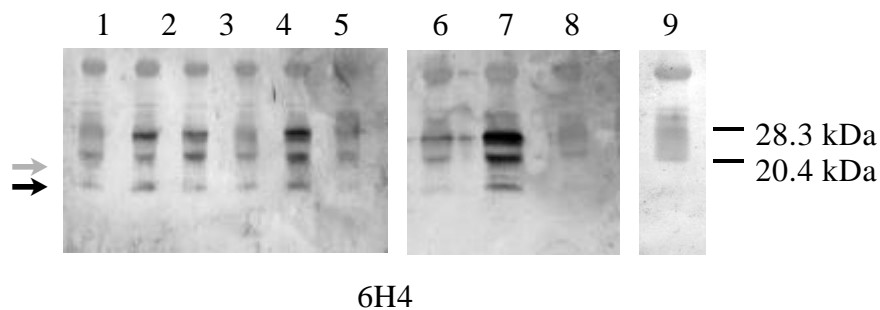


Abbildung 27: Immunologischer Nachweis der mutierten mit PNGaseF deglykosylierten Prionproteine in CHO-Zellen.

Die Auftrennung der zuvor mit dem Antikörper 1A8 (Verdünnung 1 : 166) immunpräzipitierten und anschließend deglykosylierten Zellysate erfolgte auf einem 15%igen SDS-PAG. Aufgetragen wurde jeweils die gesamte Immunpräzipitation ausgehend von 500 µg Gesamtprotein. Die Detektion erfolgte mit dem Primärantikörper 6H4 und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-AP über die Aufzeichnung von Chemolumineszenzsignalen.

Spuren: 1: Wildtyp-Kontrolle; 2: K105G; 3: K109G; 4: H110G; 5: 3G105; 6: A/G; 7: G/A; 8: Δ105-125; 9: CHO-Zellen (nicht transfiziert). Die Molekulargewichte von Markerproteinen sind auf der rechten Seite angegeben.

Die Pfeile markieren die C-terminalen Spaltprodukte bei etwa 18 kDa (schwarz) und 20 kDa (grau).

In nicht transfizierten CHO-Zellen war das Prionprotein nicht nachweisbar (Spur 9). Die erfolgreich transfizierten Zelllinien zeigten neben der Bande für

ungespaltenes Prionprotein bei 28 kDa eine das 18 kDa Spaltprodukt darstellende Bande bei 18 kDa. Der Vergleich der Verhältnisse der Bandenintensitäten zwischen Wildtyp-Kontrolle (Spur 1) und den Konstrukten mit Aminosäureaustauschen in der basischen Region des Proteins K105G (Spur 2), K109G (Spur 3), H110G (Spur 4) und 3G105 (Spur 5) legte eine schwache Inhibition der zellulären Spaltung dieser Konstrukte in CHO-Zellen nahe. Auch das Konstrukt A/G (Spur 6) zeigte in CHO-Zellen die schon aus den Experimenten mit N2a-Zellen bekannte Hemmung der Spaltung. Die Spaltaktivität des Konstrukts G/A (Spur 7) war mit der der Wildtyp-Kontrolle vergleichbar. Das Konstrukt  $\Delta$ 105-125 (Spur 8) ließ sich in CHO-Zellen, wie einige andere Konstrukte auch nicht überexprimieren. Eine Bande bei 20 kDa für das 20 kDa Spaltprodukt war in keinem Fall möglich. Allerdings trat bei allen Konstrukten eine Bande bei etwa 23 kDa auf (Spuren 1 bis 7).

### **6.2.3 Eingrenzung der für die beobachteten Phänotypen verantwortlichen Aminosäuren durch gezielte Mutagenese**

Zur weiteren und genaueren Analyse der Spaltstelle wurden auf Basis der gewonnenen Erkenntnisse weitere Prionprotein Konstrukte erzeugt, in N2a-Zellen überexprimiert und hinsichtlich ihrer zellulären Spaltung untersucht. Da Mutationen im hydrophoben Bereich des Proteins deutlichere Einflüsse auf die zelluläre Spaltung hatten, wurden vor allen Dingen in dieser Region weitere Aminosäuresequenzveränderungen vorgenommen.

In Abbildung 28 sind die Aminosäuresequenzen der unterschiedlichen moPrPI138M Konstrukte mit Mutationen im Bereich der Spaltstelle im Vergleich zur moPrPI138M Kontrolle dargestellt. Die Mutanten wurden nach den entscheidenden Mutationen im Bereich der Spaltstelle benannt. In der Legende zu Abbildung 28 sind die vollständigen Bezeichnungen aufgeführt.

Im Konstrukt  $\Delta$ 105-110 wurde eine Deletion von sechs Aminosäuren in der basischen Region eingeführt, die den *N*-terminalen Anteil der  $\Delta$ 105-125 Deletion umfaßte und mit der Entfernung von drei basischen Aminosäuren einher ging. Durch Analyse dieser Mutation sollte geklärt werden, welcher Anteil der bereits untersuchten Deletion  $\Delta$ 105-125 für die beobachtete Inhibition der Spaltung verantwortlich war. Gleiches galt für die  $\Delta$ 111-125 Deletion, die im hydrophoben Bereich eingeführt wurde und den *C*-terminalen Anteil der  $\Delta$ 105-125 Mutation umfaßte. Die Konstrukte V111G und V111I trugen Aminosäureaustausche von Valin nach Glycin oder Isoleucin. Sie wurden eingeführt, um den Einfluß dieser in direkter Nachbarschaft zur Spaltstelle lokalisierten Aminosäure auf die Spaltungseffizienz zu analysieren. Es handelte sich in beiden Fällen um den Austausch einer hydrophoben Aminosäure gegen eine andere unpolare Aminosäure.


<b>Kontrolle</b>	 <p style="text-align: center;">KPSKPKTNLKHVAGAAAAGAVVGGLGGY 100<span style="float: right;">127</span></p>
<b>D105-110</b>	KPSKP <u>.....</u> VAGAAAAGAVVGGLGGY
<b>V111G</b>	KPSKPKTNLKH <u>G</u> AGAAAAGAVVGGLGGY
<b>V111I</b>	KPSKPKTNLKH <u>I</u> AGAAAAGAVVGGLGGY
<b>A112/114G</b>	KPSKPKTNLKHV <u>G</u> GGAAAAGVVGGLGGY
<b>A115/116G</b>	KPSKPKTNLKHVA <u>GAG</u> AGAVVGGLGGY
<b>A117/119G</b>	KPSKPKTNLKHVAGAAA <u>GG</u> VVGGLGGY
<b>AG/I</b>	KPSKPKTNLKHV <u>I</u> IIIIIIIVVGGLGGY
<b>A/I</b>	KPSKPKTNLKHV <u>I</u> GIIIIIGIVVGGLGGY
<b>G/I</b>	KPSKPKTNLKHVA <u>I</u> AAAA <u>I</u> AVVGGLGGY
<b>A116V</b>	KPSKPKTNLKHVAGAA <u>V</u> AGAVVGGLGGY
<b>D112-119</b>	KPSKPKTNLKHV <u>.....</u> VVGGLGGY
<b>D111-125</b>	KPSKPKTNLKH <u>.....</u> GY

Abbildung 28: Aminosäuresequenzen der zentralen Region unterschiedlicher Prionprotein Mutanten im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz.

Alle Konstrukte basieren auf der das 13A5 Epitop tragenden Kontrolle moPrPI138M. Aminosäuresequenzveränderungen bezüglich dieser Kontrolle sind durch Fettdruck und Unterstreichung hervorgehoben. Punkte stellen Deletionen der entsprechenden Kontrollsequenz dar. Beide möglichen Positionen der Spaltstelle sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Bezeichnungen: Wildtyp-Kontrolle: moPrPI138M;  $\Delta$ 105-110: moPrPI138M- $\Delta$ 105-110; V111G: moPrPI138M-V111G; V111I: moPrPI138M-V111I; A112/114G: moPrPI138M-A112/114G; A115/116G: moPrPI138M-A115/116G; A117/119G: moPrPI138M-A117/119G; AG/I: moPrPI138M-AG/I; A/I: moPrPI138M-A/I; G/I: moPrPI138M-G/I, A116V: moPrPI138M-A116V;  $\Delta$ 112-119: moPrPI138M- $\Delta$ 112-119;  $\Delta$ 111-125: moPrPI138M-  $\Delta$ 111-125.

Bei den Konstrukten A112/114G, A115/116G und A117/119G wurden Austausche von jeweils zwei Alaninen gegen Glycine vorgenommen, die Teile des A/G Konstrukts darstellten und Aufschluß darüber geben sollten, welche der insgesamt sechs Aminosäureaustausche in diesem Konstrukt die beobachtete Inhibition der Spaltung verursacht hatte. Auch die Konstrukte AG/I, A/I und G/I dienten jenem Ziel. Hier wurden multiple Austausche von Alaninen und Glycinen gegen Isoleuzine durchgeführt wobei der hydrophobe Charakter der Region erhalten blieb. Letztlich wurde das gesamte Motiv AGAAAAGA unter Erhalt des Konstrukts  $\Delta$ 112-119 deletiert. Das Konstrukt A116V wurde hergestellt, da es sich bei dieser Aminosäuresubstitution um ein Homologon der humanpathogenen Mutation A117V handelt (Windl, O. und Kretzschmar, H.-A., 2000). Da die durch diese Mutation ausgelöste familiäre Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Erkrankung nur mit geringfügigen Ablagerungen von PrP<sup>Sc</sup> im Gehirn einher geht und die Mutation der Spaltstelle des Prionproteins sehr nahe liegt sollte überprüft werden,

ob möglicherweise ein Defekt bei der proteolytischen Spaltung des Proteins ursächlich für die Erkrankung sein könnte.

### 6.2.3.1 Konstruktion und Klonierung weiterer Prionprotein Mutanten

Die Etablierung der verschiedenen Konstrukte erfolgte durch SOE-PCR mit den äußeren Primern T3 und T7neo und den jeweiligen nach der Mutation benannten inneren Mutageneseprimern up und do. Als Ausgangsvektor diente das Plasmid pCI-moPrPI138M (siehe Abbildung 15, Seite 60). Die erhaltenen PCR-Produkte wurden über ihre *Xba*I und *Xho*I Restriktionsenzymchnittstellen in die entsprechenden Spaltstellen des eukaryontischen Expressionsvektors pCIneo kloniert und deren Sequenzen anschließend durch Sequenzierung mit den Sequenzprimern T3-800 und T7neo-800 bestätigt.

### 6.2.3.2 Überexpression der Konstrukte in N2a Zellen

Die verschiedenen Expressionsvektoren wurden zur Effecten- und Superfect-vermittelten Transformation von N2a-Zellen eingesetzt. Nach Anzucht von G418-resistenten Zellpopulationen wurden Zellysate hergestellt und *Western Blot-Analysen* mit unterschiedlichen Antikörpern durchgeführt, um die Expressionsraten der einzelnen polyklonalen Zelllinien zu ermitteln. Kulturen, die eine deutliche Überexpression der Konstrukte zeigten, wurden unter Selektionsdruck in Kultur gehalten sowie zur späteren Verfügbarkeit in flüssigem Stickstoff gelagert.

In Abbildung 29 ist der immunologische Nachweis der Überexpression der PrP<sup>c</sup> Konstrukte in den für die weiteren Analysen ausgewählten stabil transfizierten polyklonalen N2a Zelllinien (Spuren 2 bis 13) im Vergleich zur Überexpression der Wildtyp-Kontrolle (Spur 1) gezeigt.

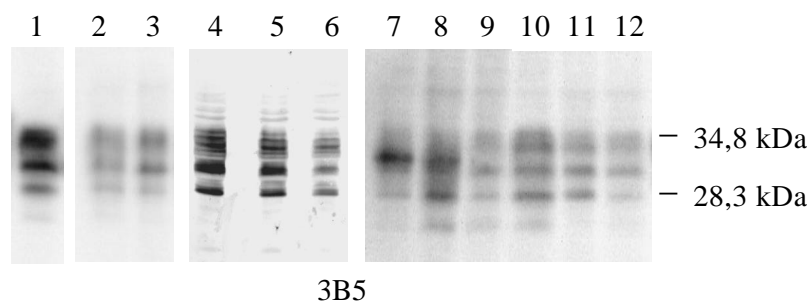


Abbildung 29: Immunologischer Nachweis der Überexpression mutierter Prionproteine in N2a-Zellen nach Auftrennung der Zellysate auf einem 15%igen SDS-PAG.

Aufgetragen wurden jeweils 100 µg Gesamtprotein. Die Detektion erfolgte mit dem Primärantikörper 3B5 und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-AP über die Aufzeichnung von Chemolumineszenzsignalen.

Spuren: 1: Wildtyp-Kontrolle; 2: V111G; 3: V111I; 4: A112/114G; 5: A115/116G; 6: A117/119G; 7: A/I; 8: G/I; 9: A116V; 10: Δ105-110; 11: Δ112-119; 12: Δ111-125. Die Molekulargewichte von Markerproteinen sind auf der rechten Seite angegeben.

Abgesehen von den Konstrukten A/I (Spur 7) und G/I (Spur 8) lagen alle Konstrukte in den für PrP<sup>c</sup> typischen verschiedenen Glykosylierungsstufen vor (Spuren 2 bis 6 und 9 bis 12), was auf eine natürliche Prozessierung der Proteine schließen ließ. Die Konstrukte mit Aminosäureaustauschen von hydrophoben Aminosäuren zu Isoleucin zeigten ein ungewöhnliches Bandenmuster, mit einer prominenten Bande oberhalb der einfach glykosylierten Form der Wildtyp-Kontrolle. Beim Konstrukt A/I (Spur 7) fehlten Banden für andere Glykosylierungsformen fast vollständig. Beim Konstrukt G/I (Spur 8) war dieser Effekt weniger stark ausgeprägt. Die eingeführten Aminosäuresubstitutionen führten möglicherweise zu einer veränderten Prozessierung der mutierten Proteine.

Wie dargestellt wurden für fast alle Konstrukte G418-resistente polyklonale N2a Zelllinien mit einer ausreichenden Überexpression des mutierten Prionproteins etabliert (Spuren 2 bis 12). Eine das Konstrukt AG/I stabil überexprimierende Zelllinie konnte auch nach mehrfacher Durchführung der Transfektion und Optimierung der Transfektionsbedingungen nicht erzeugt werden (Daten nicht gezeigt). Ursache hierfür war möglicherweise eine im Vergleich zu den Konstrukten A/I und G/I stärker fehlgeleitete Prozessierung dieses Konstrukts.

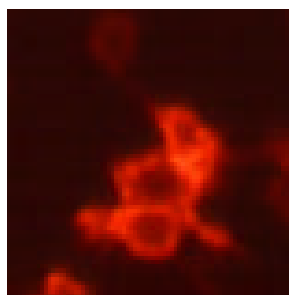
### 6.2.3.3 Lokalisation der mutierten Prionproteine in der Zelle

Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie wurde überprüft, ob die Lokalisation der mutagenisierten Prionproteine in überexprimierenden N2a-Zellen der natürlichen Lokalisation von PrP<sup>c</sup> an der Zelloberfläche entspricht. Zur Detektion der Prionproteine wurde der N-terminale Antikörper 3B5 verwendet.

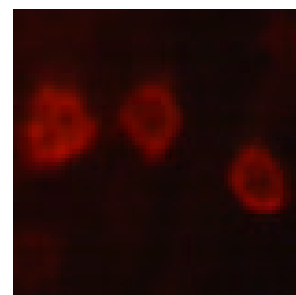
Wie in Abbildung 30 gezeigt ist, ergab sich aus diesen Untersuchungen, daß die Mehrzahl der mutagenisierten Prionproteine vorwiegend an der Zelloberfläche lokalisiert waren und dort zu deutlichen Fluoreszenzsignalen führten.



moPrP138M-Kontrolle



Δ105-110



V111G



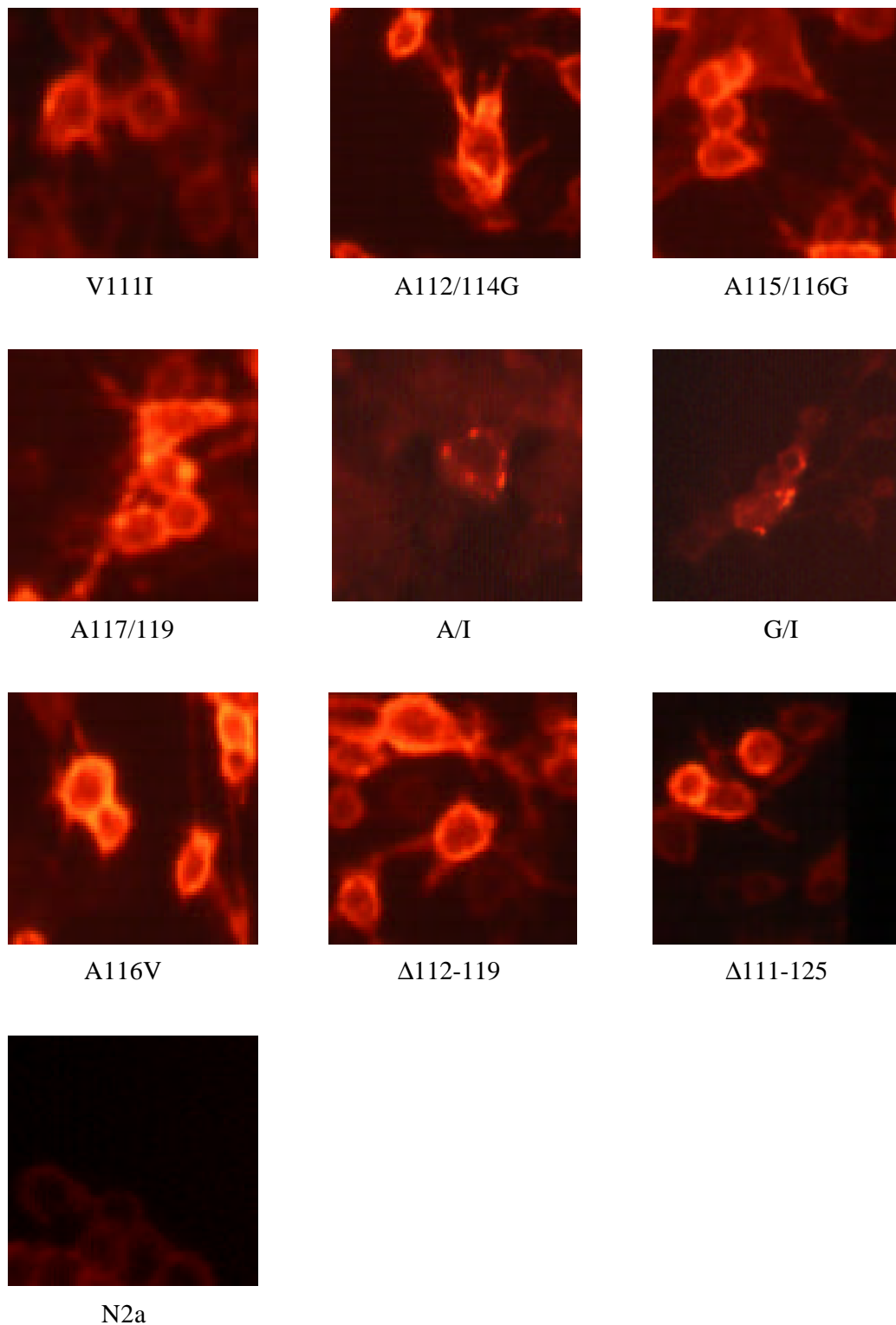


Abbildung 30: Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der Lokalisation der in N2a-Zellen überexprimierten mutierten Prionproteine.

Die Detektion erfolgte an das entsprechende Konstrukt überexprimierenden fixierten und permeabilisierten N2a-Zellen mit dem Primärantikörper 3B5 und dem TRITC gekoppelten Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus.

Nur die Konstrukte A/I und G/I zeigten keine Verankerung an der Zellmembran, sondern schienen ausschließlich in Organellen im Inneren der Zellen lokalisiert zu sein. Von Interesse war bei dieser Beobachtung auch die Tatsache, daß gerade diese beiden Prionprotein-Mutanten auch eine aberrante Glykosylierung aufgewiesen hatten (siehe Abbildung 29, Spuren 7 und 8). Diese beiden Befunde könnten möglicherweise in direktem Zusammenhang miteinander stehen.

#### **6.2.3.4 Analyse der proteolytischen Spaltung der verschiedenen PrP Mutanten in N2a-Zellen**

Zur Untersuchung der proteolytischen Spaltung der unterschiedlichen PrP-Konstrukte wurden Zelllysate von den entsprechenden G418-resistenten polyklonalen Zelllinien hergestellt, die Proteine enzymatisch durch PNGaseF deglykosyliert und durch Detektion mit den unterschiedlichen in Abbildung 11 dargestellten C-terminalen Antikörpern im *Western Blot* analysiert und die verschiedenen Banden durch Aufzeichnung von Chemolumineszenzsignalen quantifiziert.

##### **6.2.3.4.1 Analyse des 18 kDa Spaltprodukts**

In Abbildung 31 ist eine Auswahl von *Western Blot*-Untersuchungen mit dem Antikörper 6H4 zur Detektion des 18 kDa Spaltprodukts der verschiedenen Konstrukte dargestellt. Weiterhin finden sich dort die Ergebnisse der Quantifizierung von bis zu acht unabhängigen Experimenten. Für die Konstrukte A112/114G, A1516/116G und A117/119G wurden jeweils nur vier Analysen durchgeführt. Aus Tabelle 6 (Anhang, Seite 142) sind die rechnerisch aus den Meßdaten ermittelten Verhältnisse zwischen 18 kDa Spaltprodukt und ungespaltenem Prionprotein zu entnehmen.

Abgesehen von der mit dem Konstrukt AG/I transfizierten Zelllinie (Spur 10) war in allen transfizierten N2a-Zelllinien das aus der Überexpression resultierende mutagenisierte Prionprotein detektierbar (Spuren 1 bis 9 und 11 bis 13) und eine quantitative Auswertung möglich. Im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle (Spur 1) zeigten sich bei einigen auf Aminosäureebene veränderten Prionproteinen deutliche Unterschiede in der Spaltungseffizienz. Während die im Konstrukt  $\Delta$ 105-110 vorliegende Deletionsmutation im basischen Bereich des Proteins mit einem durch Quantifizierung ermitteltem  $\text{od18kDa}/\text{od28kDa}$  Quotienten von 0,67 im Vergleich zum für die Wildtyp-Kontrolle ermittelten Wert von 1,01 einen mäßig negativen Einfluß auf die zelluläre Spaltung ausübte (Spur 2), zeigten die Konstrukte  $\Delta$ 112-119 und  $\Delta$ 111-125 mit Deletionen in der hydrophoben Region eine deutliche Verringerung der Spaltungseffizienz (Spuren 12 und 13). Nach Überprüfung der Signifikanzen der Werte mittels *Student's-t-test* ergab sich, daß der Unterschied zwischen der Mutante  $\Delta$ 112-119 mit einem  $\text{od18kDa}/\text{od28kDa}$  Quotienten von 0,13 und der Deletionsmutante  $\Delta$ 111-125 mit einem Quotienten

von 0,06 nicht signifikant war, folglich also insbesondere die Entfernung der Aminosäuren 112 bis 119 einen Einfluß auf die Spaltungseffizienz ausgeübt hatte.

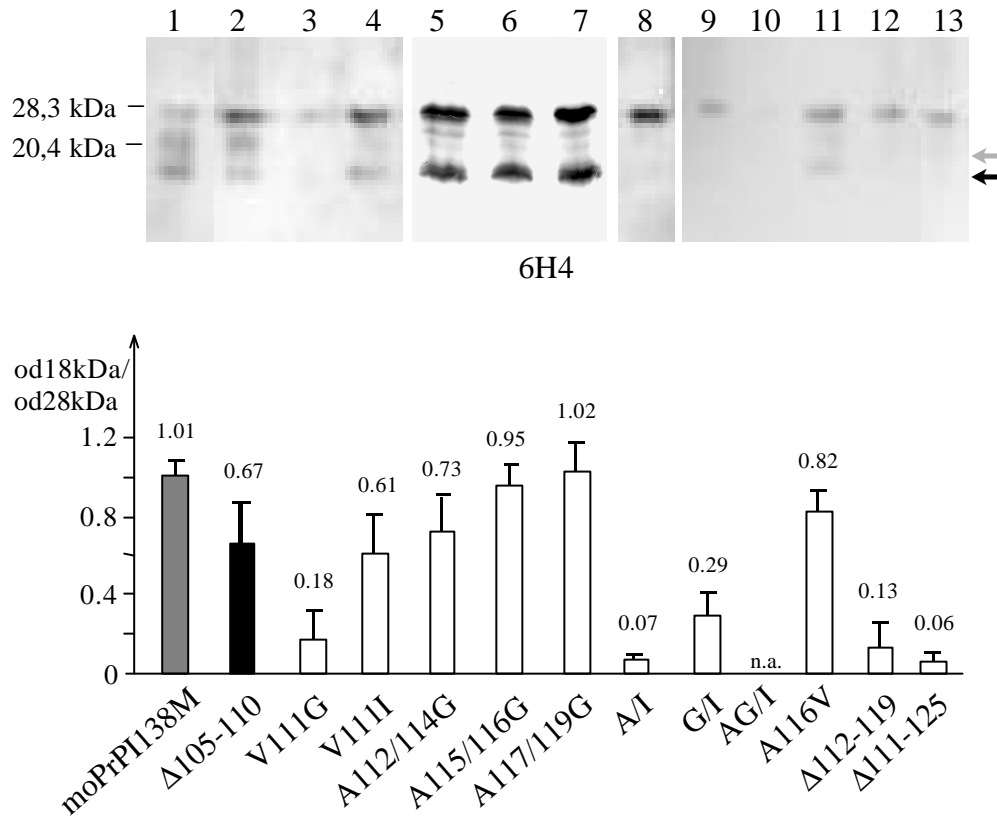


Abbildung 31: *Western Blot-Analyse* der mutierten Prionproteine mit dem Antikörper 6H4 und quantitative Bestimmung des 18 kDa Spaltprodukts im Verhältnis zum nachgewiesenen ungespaltenen Prionprotein.

Die Auftrennung der Proteine aus mit PNGase deglykosylierten N2a-Zellysaten erfolgte auf einem 15%igen SDS-PAGE. Aufgetragen wurden jeweils 100  $\mu$ g Gesamtprotein. Die Detektion erfolgte mit dem Primärantikörper 6H4 und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-AP über die Aufzeichnung von Chemolumineszenzsignalen.

Spuren: 1: Kontrolle; 2:  $\Delta 105-110$ ; 3: V111G; 4: V111I; 5: A112/114G; 6: A115/116G; 7: A117/119G; 8: A/I; 9: G/I; 10: AG/I; 11: A116V; 12:  $\Delta 112-119$ ; 13:  $\Delta 111-125$ . Die Molekulargewichte von Markerproteinen sind auf der linken Seite angegeben.

Die Pfeile markieren die C-terminalen Spaltprodukte bei etwa 18 kDa (schwarz) und 20 kDa (grau).

Die im Balkendiagramm dargestellte quantitative Auswertung der Bandenintensitäten durch elektronische Aufzeichnung der Lichtsignale erfolgte normiert auf die jeweilige Menge an ungespaltenem Prionprotein. Die Mittelwerte der od18kDa/od28kDa Quotienten einzelner Analysen sind oberhalb der Balken angegeben. Fehlerbalken stellen Standardabweichungen dar. n.a.: Nicht auswertbar.

Dieser Befund wurde auch dadurch gestützt, daß der Austausch der Alanine beziehungsweise Glycine dieser Region gegen Isoleucine in den Konstrukten A/I (Spur 8) und G/I (Spur 9) zu einer starken Inhibition der Spaltung führte, die sich

in deutlich von der Wildtyp-Kontrolle abweichenden  $od18kDa/od28kDa$  Quotienten von 0,07 und 0,29 äußerte. Bei der Beurteilung der verringerten Spaltungseffizienz dieser beiden Konstrukte darf allerdings auch deren aberrante Lokalisation innerhalb der Zelle nicht vernachlässigt werden (siehe Absatz 6.2.3.3). Für das Konstrukt AG/I (Spur 10) war die Ermittlung statistisch relevanter Daten aufgrund des geringen Expressionslevels nicht möglich. Die Austausche von jeweils zwei Alaninen gegen Glycin in den Konstrukten A112/114G (Spur 5), A115/116G (Spur 6) und A117/119G (Spur 7) zeigten nur geringfügige Effekte auf die zelluläre Spaltung des Prionproteins. Die im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle leichten Veränderungen hinsichtlich der Spaltungsraten erwiesen sich abgesehen vom Konstrukt A112/114G als nicht signifikant. Ebenso führte auch die der humanpathogenen Mutation A117V entsprechende Aminosäuresubstitution im Konstrukt A116V (Spur 11) nur zu einer mäßigen aber signifikanten Veränderung der Spaltungseffizienz. Die Austausche von Valin gegen Glycin oder Isoleucin in den Mutanten V111G (Spur 3) und V111I (Spur 4) hingegen bewirkten eine unterschiedlich stark ausgeprägte Inhibition der Spaltung. Während der Austausch gegen Glycin mit einem  $od18kDa/od28kDa$  Quotienten von 0,18 einen stark negativen Effekt ausübte, zeigte der Austausch gegen Isoleucin mit einem Quotienten von 0,61 einen eher moderaten Effekt auf die Menge an detektierbarem Spaltprodukt.

Zur Überprüfung der Spaltungseffizienzen verschiedener Konstrukte wurden die *Western Blot-Analysen* unter Verwendung anderer C-terminaler Antikörper wiederholt. Die Auswertung dieser mit den Antikörpern 13A5 und 1A8 durchgeführten Untersuchungen bestätigten im allgemeinen die bereits beschriebenen Beobachtungen bezüglich der Einflüsse verschiedener Mutationen auf die zelluläre Spaltung des Prionproteins (Daten nicht gezeigt).

#### **6.2.3.4.2 Analyse des 20 kDa Spaltprodukts**

Die Analyse des 20 kDa Spaltprodukts erfolgte durch immunologische Detektion des deglykosylierten Prionproteins mit dem Antiserum Kan72. Einige exemplarische *Western Blot-Analysen* der unterschiedlichen Prionprotein-Konstrukte und die Ergebnisse der Quantifizierung von jeweils bis zu sieben unabhängigen Experimenten sind in Abbildung 32 gezeigt. Für die Konstrukte A112/114G, A1516/116G und A117/119G wurde jeweils nur eine Analyse durchgeführt. Aus Tabelle 8 (Anhang, Seite 143) sind die zugehörigen aus den Meßdaten rechnerisch ermittelten Verhältnisse zwischen 20 kDa Spaltprodukt und ungespaltenem Prionprotein zu entnehmen.

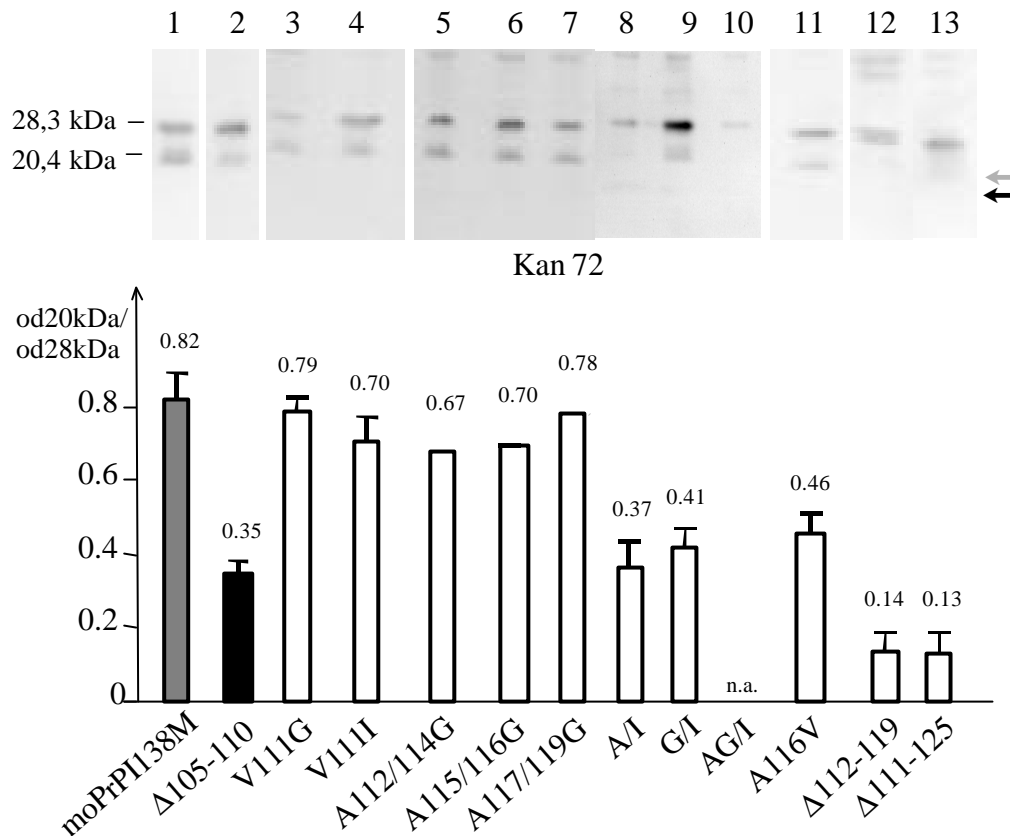


Abbildung 32: *Western Blot-Analyse* der mutierten Prionproteine mit dem Antiserum Kan72 und quantitative Bestimmung des 20 kDa Spaltprodukts im Verhältnis zum nachgewiesenen ungespaltenen Prionprotein.

Die Auftrennung der Proteine aus mit PNGase deglykosylierten N2a-Zellysaten erfolgte auf einem 15%igen SDS-PAG. Aufgetragen wurden jeweils 100 µg Gesamtprotein. Die Detektion erfolgte mit dem Primärantiserum Kan72 und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Kaninchen-AP über die Aufzeichnung von Chemolumineszenzsignalen.

Spuren: 1: Kontrolle; 2: Δ105-110; 3: V111G; 4: V111I; 5: A112/114G; 6: A115/116G; 7: A117/119G; 8: A/I; 9: G/I; 10: AG/I; 11: A116V; 12: Δ112-119; 13: Δ111-125. Die Molekulargewichte von Markerproteinen sind auf der linken Seite angegeben.

Die Pfeile markieren die C-terminalen Spaltprodukte bei etwa 18 kDa (schwarz) und 20 kDa (grau).

Die im Balkendiagramm dargestellte quantitative Auswertung der Bandenintensitäten durch elektronische Aufzeichnung der Lichtsignale erfolgte normiert auf die jeweilige Menge an ungespaltenem Prionprotein. Die Mittelwerte der  $od_{20kDa}/od_{28kDa}$  Quotienten einzelner Analysen sind oberhalb der Balken angegeben. Fehlerbalken stellen Standardabweichungen dar. n.a.: Nicht auswertbar.

Abgesehen von der mit dem Konstrukt AG/I transfizierten Zelllinie (Spur 10) zeigten alle Zelllinien deutliche Signale für die jeweiligen Prionprotein-Konstrukte (Spuren 1 bis 9 und 11 bis 13) und eine quantitative Auswertung der Spaltungseffizienzen konnte erfolgen. Auch die weiter N-terminal lokalisierte Spaltung des Prionproteins wurde, wie der Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle (Spur 1) zeigte durch einige Aminosäuresequenzveränderungen im zentralen Bereich des Proteins beeinflusst. Die Deletion Δ105-110 (Spur 2) im basischen Bereich des Proteins führte zu einer Reduktion an detektierbarem Spaltprodukt, was sich in

einem od20kDa/od28kDa Quotienten von 0,35 im Vergleich zum Quotienten der Wildtyp-Kontrolle von 0,82 ausdrückte. Wie schon bei vorhergehenden Analysen beobachtet (siehe Absatz 6.2.2.4.2), scheinen basische Aminosäuren im zentralen Bereich bei der weiter *N*-terminal lokalisierten Spaltung des Proteins eine Rolle zu spielen. Aber auch die Deletionen  $\Delta$ 112-119 (Spur 12) und  $\Delta$ 111-125 (Spur 13) in der hydrophoben Region zeigten mit Quotienten von 0,14 und 0,13 hochsignifikante stark negative Auswirkungen auf die Spaltungseffizienz. Einzelne Aminosäureaustausche in der hydrophoben Region wie in den Konstrukten V111G (Spur 3) und V111I (Spur 4) zeigten mit od20kDa/od28kDa Quotienten von 0,79 und 0,70 keinen signifikanten Effekt auf die Menge an detektierbarem Spaltprodukt und auch die verschiedenen Austausche hydrophober Aminosäuren gegen Glycine in den Konstrukten A112/114G (Spur 5), A115/116G (Spur 6) und A117/119G (Spur 7) zeigten mit Quotienten von 0,67 bis 0,78 keine signifikanten Auswirkungen auf die Spaltung des Prionproteins. Austausche hydrophober Aminosäuren gegen Isoleucine in den Konstrukten A/I (Spur 8) und G/I (Spur 9) hingegen hatten mit Werten von 0,37 und 0,41 eine Reduktion an detektierbarem 20 kDa Spaltprodukt zur Folge. Bei der Beurteilung der verringerten Spaltungseffizienz dieser beiden Konstrukte darf allerdings auch deren aberrante Lokalisation innerhalb der Zelle nicht vernachlässigt werden (siehe Absatz 6.2.3.3). Das Konstrukt AG/I konnte wegen zu geringer Expressionsrate nicht quantitativ ausgewertet werden (Spur 10). Die der humanpathogenen Mutation A117V äquivalente Mutation A116V (Spur 11) zeigte mit einem Quotienten von 0,46 eine auffällige Inhibition der proteolytischen Spaltung des Prionproteins.

Zur Überprüfung der Spaltungseffizienzen der unterschiedlichen Konstrukte wurden die *Western Blot-Analysen* mit dem *C*-terminalen Antiserum 1A8 wiederholt. Die Auswertung dieser durchgeführten Untersuchungen bestätigten im allgemeinen die bereits beschriebenen Beobachtungen bezüglich der Einflüsse verschiedener Mutationen auf die zelluläre Spaltung des Prionproteins (Daten nicht gezeigt).

#### **6.2.3.5 Analyse der Proteinase K Sensitivität**

Die Analyse der Proteinase K Sensitivität der unterschiedlichen Konstrukte erfolgte über einen milden Verdau der entsprechenden Lysate mit Proteinase K. Es konnten keinerlei Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Alle mutierten Prionproteine wurden unter den gegebenen Bedingungen vollständig abgebaut (Daten nicht gezeigt).

#### **6.2.4 Zusammenfassende Beurteilung der erhaltenen Ergebnisse**

Im Bereich der zentralen Region des Prionproteins mutierte PrP-Konstrukte wurden in N2a-Zellen überexprimiert und analysiert. Die verschiedenen

Konstrukte und deren Aminosäuresequenzen der zentralen Region sind in Abbildung 33 A und B zusammengefaßt.

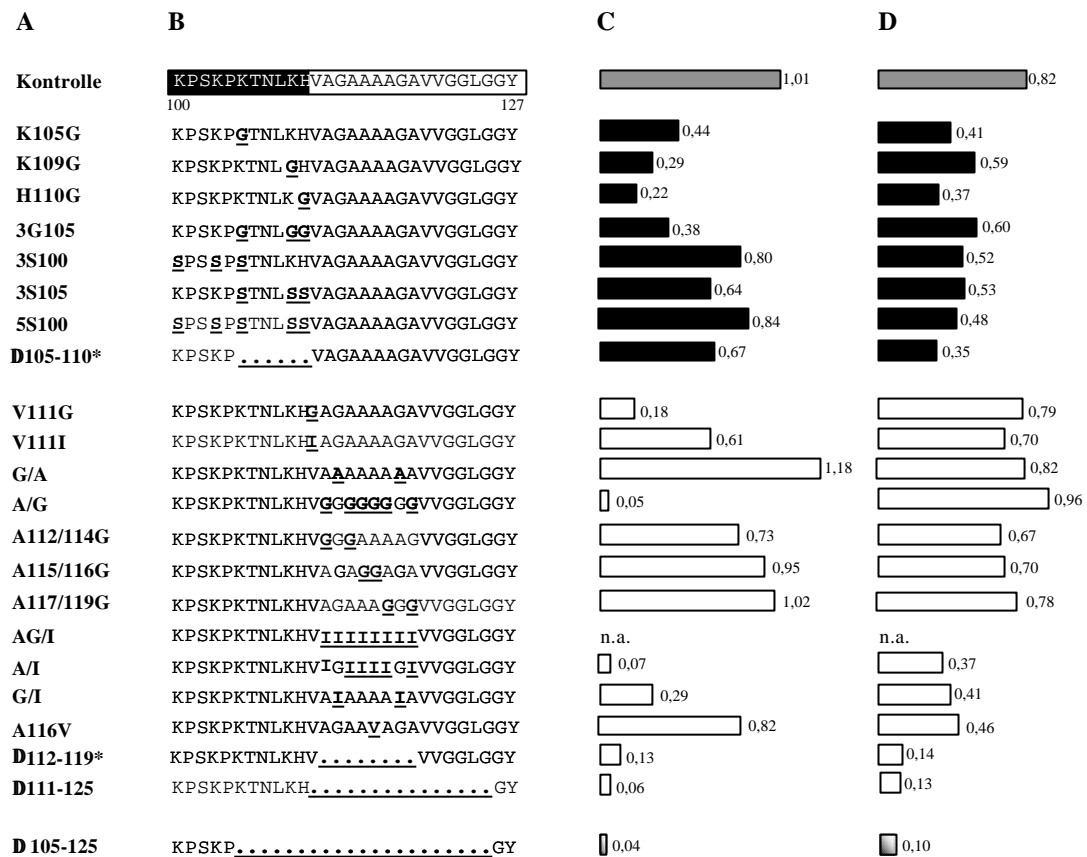


Abbildung 33: Zusammenfassende Darstellung der in N2a-Zellen überexprimierten PrP-Konstrukte (A), ihrer Aminosäuresequenzen in der zentralen Region (B) und der Ergebnisse der densitometrischen Detektion des 18 kDa Spaltprodukts mit dem 6H4 Antikörper (C) und des 20 kDa Spaltprodukts mit dem Kan72 Antiserum (D) im Verhältnis zum jeweils detektierten ungespaltenen Prionprotein.

Alle Konstrukte basieren auf der das 13A5 Epitop tragenden Wildtyp-Kontrolle moPrPI138M. Aminosäuresequenzveränderungen bezüglich dieser Kontrolle sind durch Fettdruck und Unterstreichung hervorgehoben. Punkte stellen Deletionen der entsprechenden Kontrollsequenz dar.

Die vollständigen Bezeichnungen der Konstrukte finden sich in den Legenden zu Abbildung 16 und Abbildung 28. n.a.: Nicht auswertbar.

\* Wie nach Beendigung der Arbeit festgestellt wurde, waren die DNA-Konstrukte Ä105-110 und Ä112-119 nicht mehr eindeutig zuzuordnen. Auf die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse hatte dies sehr wahrscheinlich keinen Einfluß.

Alle im basischen Bereich mutierten Proteine wiesen eine natürliche Lokalisation an der Zelloberfläche auf. Auch die Mehrzahl der Mutanten mit Aminosäuresequenzveränderungen im hydrophoben Bereich des Prionproteins zeigten eine Lokalisation an der Zelloberfläche. Eine Ausnahme bildeten die Prionproteine mit Aminosäureaustauschen von hydrophoben Aminosäuren nach Isoleucin, die im Inneren der Zellen lokalisiert waren.

Die Untersuchung der proteolytischen Spaltung der in N2a-Zellen überexprimierten Konstrukte zeigte, daß verschiedene Aminosäuresequenz-veränderungen in der zentralen Region des Prionproteins zum Teil deutliche Auswirkungen auf die zellulären Spaltungen des Proteins hatten. Die quantitative Auswertungen der Spaltung der verschiedenen Konstrukte sind in Abbildung 33 C und D zusammenfassend in Form der durchschnittlichen  $od_{18kDa}/od_{28kDa}$  beziehungsweise  $od_{20kDa}/od_{28kDa}$  Quotienten dargestellt. Die proteolytische Spaltung in der zentralen Region, die in der Bildung eines 18 kDa C-terminalen Spaltprodukts resultiert, wurde insbesondere durch einige Aminosäureaustausche sowie Deletionen in der hydrophoben Region des Prionproteins fast vollständig inhibiert. Auch einige Mutationen im basischen Bereich zeigten eine negative Wirkung auf die Spaltungseffizienz. Ebenso wurde die weiter N-terminal lokalisierte proteolytische Spaltung von PrP<sup>c</sup>, die in einem C-terminalen Spaltprodukt von 20 kDa resultiert, durch verschiedene Mutationen negativ beeinflusst. Insbesondere Mutationen in der basischen Region des Proteins und Deletionen zeigten hier eine zum Teil starke inhibitorische Wirkung.

Bei der Untersuchung der Proteinase K Sensitivität der mutierten Prionprotein wurde festgestellt, daß das Konstrukt A/G eine erhöhte Resistenz gegenüber dem proteolytischen Abbau durch Proteinase K aufwies. Interessanterweise hatte dieses Konstrukt gleichzeitig eine fast vollständige Inhibition der zellulären Spaltung im zentralen Bereich des Prionproteins gezeigt.



### 6.3 UNTERSUCHUNGEN ZUR AUTOKATALYTISCHEN SPALTAKTIVITÄT DES PRIONPROTEINS

Die strukturelle Homologie der C-terminalen Domäne des Prionproteins (PrP(121-231)) zu den katalytisch aktiven Domänen einiger membranverankerter Signalpeptidasen führte zu der Annahme, daß es sich bei der zellulären Spaltung von PrP<sup>c</sup> um einen durch PrP<sup>c</sup> selbst oder durch das C-terminale Spaltprodukt katalysierten Prozeß handeln könnte. Der Aminosäuresequenzvergleich zwischen den Resten 121 bis 217 des Prionproteins und der mutmaßlichen katalytisch aktiven Domäne der Signalpeptidase der Ratte zeigt eine 23 %ige Aminosäuresequenzidentität und eine 41 %ige Ähnlichkeit der Aminosäurezusammensetzung. Die in Prionproteinen verschiedener Spezies hochkonservierten Reste Tyrosin 127 und Histidin 176, die sich beim gefalteten Protein in direkter räumlicher Nähe zueinander befinden, könnten den das aktive Zentrum von Signal Peptidasen bildenden Aminosäureresten entsprechen (Glockshuber, R. *et al.*, 1998). In Abbildung 34 ist das murine Prionprotein mit der Lage dieser hochkonservierten Reste schematisch dargestellt.



Abbildung 34: Schematische Darstellung des Prionproteins mit Bezeichnung der möglicherweise das aktive Zentrum des Proteins bildenden Aminosäuren Tyrosin 127 und Histidin 176.

Bezeichnungen: *Octarepeats*: fünfmalige P(Q/H)GG(T/G/S)W GQ Sequenzwiederholung (AS 51-90), CHO: N-glykosidisch verknüpfte Glykosylierung (AS 180 und 196), SS: Disulfidbrücke zwischen den AS 172 und 213, GPI: GPI-Anker; Y127: Tyrosin 127; H176: Histidin 176; Schwarze Box: basische Region, weiße Box: hydrophobe Region..

Die Annahme eines autokatalytischen Ursprungs der zellulären Spaltung des Prionproteins wurde gestützt durch die Beobachtung, daß Präparationen von bakteriell erzeugtem aufgereinigtem PrP(23-231) nach längerer Lagerung bei Raumtemperatur Zerfallsprodukte aufwiesen, die vom Molekulargewicht den Produkten der zellulären Spaltung entsprachen (Daten nicht gezeigt).

#### 6.3.1 Konstruktion und Klonierung verschiedener Prionprotein Mutanten zur Überprüfung der autokatalytischen Aktivität des Prionproteins

Zur Überprüfung der autokatalytischen Aktivität des Prionproteins wurden durch gezielte Mutagenese *moPrn-p1138M* Gene, kodierend für Prionproteine mit

Aminosäuresequenzveränderungen im angenommenen aktiven Zentrum hergestellt, die mutierten Proteine in N2a-Zellen überexprimiert und bezüglich der zellulären Spaltung untersucht.

In Abbildung 35 sind die Aminosäuresequenzen der verschiedenen moPrPI138M Konstrukte mit Veränderungen Aminosäuren Tyrosin 127 und Histidin 176 im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle moPrPI138M dargestellt. Die Mutanten werden dort und im Folgenden nach der entscheidenden Mutation benannt. In der Legende zu Abbildung 35 finden sich die vollständigen Bezeichnungen.

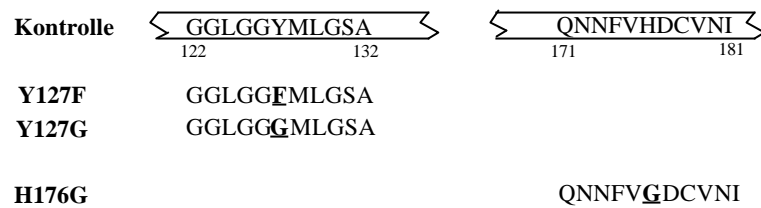


Abbildung 35: Aminosäuresequenzen im postulierten aktiven Zentrum der Prionprotein Mutanten im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz.

Alle Konstrukte basieren auf der das 13A5 Epitop tragenden Kontrolle moPrPI138M. Aminosäuresequenzveränderungen bezüglich dieser Kontrolle sind durch Fettdruck und Unterstreichung hervorgehoben.

Bezeichnungen: Kontrolle: moPrPI138M; Y127F: moPrPI138M-Y127F; Y127G: moPrPI138M-Y127G; H176G: moPrPI138M-H176G.

In den Konstrukten Y127F und Y127G wurde das durch seine an den aromatischen Ring gebundene ionisierbare Hydroxylgruppe sehr reaktive Tyrosin gegen Phenylalanin beziehungsweise Glycin mit ihren chemisch inerten Seitenketten ausgetauscht, womit in beiden Fällen das postulierte aktive Zentrum seine Funktion verlieren sollte. In der Mutante H176G wurde das stark hydrophile Histidin mit seiner polaren Seitenkette gegen die aliphatische Aminosäure Glycin ersetzt. Auch dieser Austausch sollte mit einem Verlust an katalytischer Aktivität der angenommenen Protease einher gehen.

Die Etablierung der Konstrukte erfolgte durch SOE-PCR mit den äußeren Primern T3 und T7neo und den jeweiligen inneren Mutageneseprimern up und do. Als Ausgangsvektor diente das Plasmid pCI-moPrPI138M (siehe Abbildung 15, Seite 60). Die PCR-Produkte wurden über ihre *Xba*I und *Xho*I Schnittstellen in die entsprechenden Spaltstellen des Expressionsvektors pCI-neo kloniert und deren Sequenzen durch Sequenzanalyse von den Sequenzprimern T3-800 und T7neo-800 ausgehend bestätigt.

### 6.3.2 Überexpression der mutierten Prionproteine in N2a Zellen

Nach stabiler Effecten-vermittelter Transfektion von N2a-Zellen wurden Zellysate der G418-resistenten Zellen hergestellt und diese für *Western Blot-Analysen* mit unterschiedlichen Antikörpern verwandt.

In Abbildung 36 ist der immunologische Nachweis der Überexpression der PrP-Konstrukte in den für weitere Analysen ausgewählten polyklonalen N2a Zelllinien (Spuren 2 bis 4) im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle (Spur 1) gezeigt.

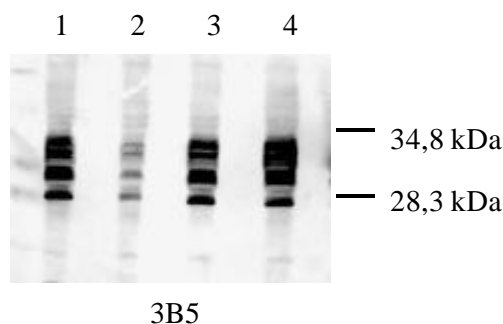


Abbildung 36: Immunologischer Nachweis der Überexpression im Bereich des aktiven Zentrums mutierter Prionproteine in N2a-Zellen nach Auftrennung der Zellysate auf einem 15%igen SDS-PAG.

Aufgetragen wurden jeweils 100 µg Gesamtprotein. Die Detektion erfolgte mit dem Primärantikörper 3B5 und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-AP über Reaktion mit NBT/BCIP.

Spuren: 1: Kontrolle; 2: Y127F; 3: Y127G; 4: H176G.

Für alle Konstrukte wurden ausreichend stark überexprimierende polyklonale Zelllinien etabliert. Die Mutanten zeigten das für PrP<sup>c</sup> typische Glykosylierungsmuster, mit drei Banden im Bereich von 28 bis 35 kDa, was einen Hinweis auf die natürliche Prozessierung der PrP-Konstrukte darstellte.

### 6.3.3 Analyse der proteolytischen Spaltung der verschiedenen PrP Mutanten

In Abbildung 37 sind der immunologische Nachweis der verschiedenen PrP-Konstrukte und ihrer Spaltprodukte nach Abspaltung der Zuckerketten mit dem Antikörper 6H4 sowie die Ergebnisse der aus der Quantifizierung einer Analyse rechnerisch ermittelten Verhältnisse zwischen 18 kDa Spaltprodukt und ungespaltenem PrP gezeigt.

Schon der Vergleich der Bandenintensitäten zwischen Wildtyp-Kontrolle (Spur 1) und den verschiedenen Konstrukten (Spuren 2 bis 4) der *Western Blot-Analyse* zeigte, daß keine der eingeführten Mutation einen deutlichen Einfluß auf die proteolytische Spaltung der Proteine hatte. Dies wurde durch die durchgeführte quantitative Auswertung detektierter Lichtsignale bestätigt. Sowohl die Konstrukte Y127F (Spur 2) und Y127G (Spur 3) als auch das Konstrukt H176G (Spur 4) wiesen einen od18kDa/od28kDa Quotienten auf, der sich nicht erheblich

von dem der Wildtyp-Kontrolle (Spur 1) unterschied. Die verschiedenen im möglichen aktiven Zentrum des Prionproteins eingeführten Aminosäuresequenzveränderungen hatten demnach keinen Einfluß auf die proteolytische Spaltung des Proteins in dessen zentraler Region.

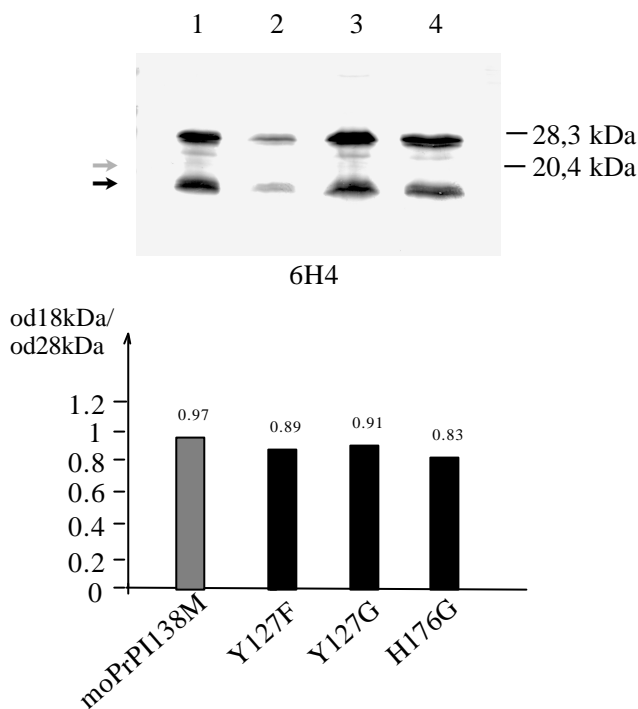


Abbildung 37: *Western Blot-Analyse* der mutierten Prionproteine mit dem Antikörper 6H4 und quantitative Bestimmung des 18 kDa Spaltprodukts im Verhältnis zum nachgewiesenen ungespaltenen Prionprotein.

Die Auftrennung der Proteine aus mit PNGase deglykosylierten N2a-Zellysaten erfolgte auf einem 15%igen SDS-PAG. Aufgetragen wurden jeweils 100 µg Gesamtprotein. Die Detektion erfolgte mit dem Primärantikörper 6H4 und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-AP über die Aufzeichnung von Chemolumineszenzsignalen.

Spuren: 1: Wildtyp-Kontrolle; 2: Y127F; 3: Y127G; 4: H176G. Die Molekulargewichte von Markerproteinen sind auf der linken Seite angegeben.

Die Pfeile markieren die C-terminalen Spaltprodukte bei etwa 18 kDa (schwarz) und 20 kDa (grau).

Die im Balkendiagramm dargestellte quantitative Auswertung der Bandenintensitäten durch elektronische Aufzeichnung der Lichtsignale erfolgte normiert auf die jeweilige Menge an ungespaltenem Prionprotein. Die Werte der od18kDa/od28kDa Quotienten einzelner Analysen sind oberhalb der Balken angegeben.

Zur Überprüfung der erhaltenen Resultate wurde die *Western Blot*-Untersuchung wie in Abbildung 38 dargestellt unter Verwendung des C-terminalen Antikörpers 13A5 wiederholt.

Auch hier ergab der Vergleich der Bandenintensitäten zwischen Wildtyp-Kontrolle (Spur 1) und den Prionprotein-Mutanten (Spuren 2 bis 4) keinerlei Hinweis auf eine Inhibition der zellulären Spaltung durch eine der eingeführten Mutationen. Eine Quantifizierung wurde für diese Analyse nicht durchgeführt.

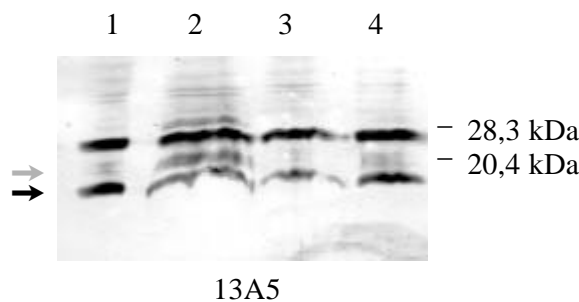


Abbildung 38: Immunologischer Nachweis der mutierten mit PNGaseF deglykosylierten Prionproteine in N2a-Zellen nach Auftrennung der Zellysate auf einem 15%igen SDS-PAG mit dem Antikörper 13A5.

Aufgetragen wurden wenn nicht anders angegeben 100 µg Gesamtprotein. Wegen der schwachen Überexpression wurden für Y127F 200 µg Gesamtprotein eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit den Primärantikörpern 13A5 und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-AP über Reaktion mit NBT/BCIP.

Spuren: 1: Kontrolle; 2: Y127F; 3: Y127G; 4: H176G. Die Molekulargewichte von Markerproteinen sind auf der rechten Seite angegeben.

Die Pfeile markieren die C-terminalen Spaltprodukte bei etwa 18 kDa (schwarz) und 20 kDa (grau).

Die Detektion des 20 kDa Spaltprodukts erfolgte mit dem Antiserum 1A8. Auch für diese zweite Spaltung des Prionproteins konnte ein Einfluß der Mutationen im postulierten aktiven Zentrum des Proteins nicht gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

#### 6.3.4 Zusammenfassende Beurteilung der erhaltenen Ergebnisse

Es wurden verschiedene PrP-Konstrukte mit Mutationen im postulierten für eine autokatalytische Spaltung verantwortlichen Bereich des Proteins eingeführt und deren Wirkung auf die zelluläre Spaltung des Prionproteins in die Konstrukte überexprimierenden N2a-Zellen analysiert. Dabei ergab sich daß keine der eingeführten Mutationen eine meßbare Auswirkung auf die proteolytische Spaltung von PrP<sup>c</sup> zeigte und somit das angenommene aktive Zentrum des Prionproteins vermutlich nicht an der zellulären Spaltung von PrP<sup>c</sup> beteiligt ist.

## 6.4 UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOLOGISCHEN FUNKTION DER PROTEOLYTISCHEN SPALTUNG DES PRIONPROTEINS

Ein sehr interessanter Aspekt der proteolytischen Spaltung des Prionproteins ist die Frage nach ihrer biologischen Funktion. Die bisher erhaltenen Ergebnisse zeigten, daß die zelluläre Spaltung des Prionproteins ein regulierter Prozeß zu sein scheint und ließen den Schluß zu, daß sie an der natürlichen Funktion des Prionproteins mitwirkt. Im folgenden Abschnitt sollte der Zusammenhang zwischen angenommener physiologischer Funktion des Prionproteins und der zellulären Spaltung mit Hilfe verschiedener experimenteller Ansätze genauer betrachtet werden.

### 6.4.1 Einfluß der $\text{Cu}^{2+}$ -Bindung auf die Spaltung des Prionproteins

Eine derzeit viel diskutierte mögliche natürliche Funktion des Prionproteins ist eine Beteiligung am Kupfer-Metabolismus und dadurch bedingt am Stoffwechsel von Sauerstoffradikalen (Brown, D. R. *et al.*, 1997; Kretzschmar, H. A. *et al.*, 1997). Die Bindung von Kupfer an aufgereinigtes  $\text{PrP}^c$  ist nachgewiesen und die Bindungsstelle, die *N*-terminale Histidin-haltige *octarepeat*-Region des Proteins, lokalisiert (Hornshaw, M. P. *et al.*, 1995; Viles, J. H. *et al.*, 1999).

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der vermuteten biologischen Funktion von  $\text{PrP}^c$  im Kupfer-Metabolismus und der zellulären Spaltung des Proteins aufzuklären, wurde zunächst der Einfluß der Bindung von  $\text{Cu}^{2+}$  an das Prionprotein auf die zelluläre Spaltung des Proteins hin untersucht.

#### 6.4.1.1 Untersuchungen an mikrobiell erzeugtem murinem Prionprotein

Erste Untersuchungen zur Wirkung von Kupfer auf die Spaltung des Prionproteins wurden, wie in Abbildung 39 gezeigt, an mikrobiell erzeugtem aufgereinigtem  $\text{moPrP}^c$  ( $\text{moPrP}^{23-231}$ ) (Hornemann, S. *et al.*, 1997) durchgeführt. Dazu wurde  $\text{PrP}^{23-231}$  für mehrere Tage in An- und Abwesenheit von  $\text{Cu}^{2+}$  bei 37 °C inkubiert und anschließend über SDS-PAGE analysiert. Voraussetzung für ein aussagekräftiges Experiment war die Verwendung absolut  $\text{Cu}^{2+}$ -freier Puffer und Lösungen sowie einer  $\text{Cu}^{2+}$ -freien Proteinpräparation. Die Reaktionsbedingungen sowie die durchgeführten Kontroll-Analysen sind aus der Legende zu Abbildung 39 zu entnehmen.

Die Gegenwart von Kupfer im Reaktionsansatz (Spuren 3 und 4) bewirkte eine Spaltung des Proteins, die in zwei Spaltprodukten resultierte die vom Molekulargewicht den Spaltprodukten der zellulären Spaltung des Proteins in der zentralen Region entsprachen. Neben der Bande für ungespaltenes  $\text{moPrP}^{23-231}$  bei 28 kDa wurde ein Spaltprodukt mit einem Molekulargewicht von etwa 18 kDa, möglicherweise dem C-terminalen Spaltprodukt entsprechend und ein

Spaltprodukt mit einem Molekulargewicht von etwa 9 kDa, möglicherweise dem N-terminalen Spaltprodukt entsprechend detektiert. Sowohl die Gegenwart freier  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen (Spur 3) als auch die Gegenwart an Glycin gebundener  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen ( $\text{CuGly}_2$ ) (Spur 4) verursachten die Spaltung des Proteins. Als Kontrolle eingesetzte  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen hingegen führten in diesem experimentellen System nicht zum Auftreten von Spaltprodukten des Prionproteins (Spur 2). Hier wie auch nach der Inkubation in Anwesenheit des Chelators EDTA (Spur 1) wurde ausschließlich die auch bei der nicht inkubierten Kontrolle (Spur 5) auftretende Bande für ungespaltenes moPrP23-231 nachgewiesen.

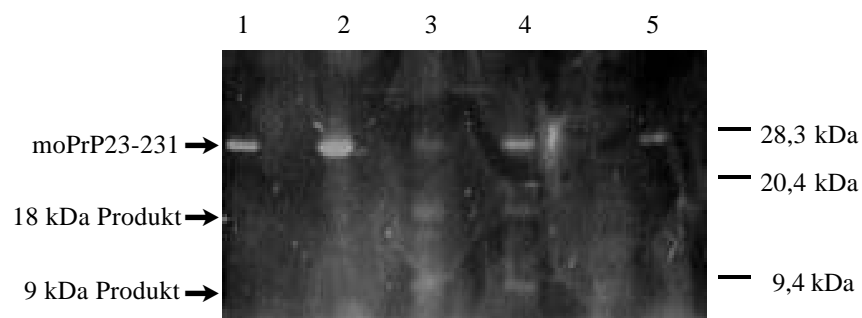


Abbildung 39: Elektrophoretische Analyse der autokatalytischen Spaltung von bakteriell erzeugtem aufgereinigtem moPrP23-231.

Die Auftrennung der für 6 Tage bei 37°C in NEMO-Puffer, 30 mM KCl inkubierten Proben mit unterschiedlichen Zusätzen erfolgte auf einem 12,5 %igen SDS-PAG. Aufgetragen wurden je 10 µg moPrP der entsprechenden Ansätze. Die Protein-Banden wurden durch Färbung mit Nil-Rot detektiert.

Spuren: 1: Inkubation in Gegenwart von 1 mM EDTA; 2: Inkubation in Gegenwart von 56 µM  $\text{Zn}^{2+}$ ; 3: Inkubation in Gegenwart von 56 µM  $\text{Cu}^{2+}$ ; 4: Inkubation in Gegenwart von 56 µM  $\text{CuGly}_2$ ; 5: Kontrolle ohne Inkubation. Die Molekulargewichte von Markerproteinen sind auf der rechten Seite angegeben.

Ob die hier beobachtete Proteolyse bakteriell erzeugten Prionproteins im Zusammenhang mit der *in vivo* ablaufenden zellulären Spaltung des Proteins steht, muß noch gezeigt werden.

#### 6.4.1.2 Untersuchungen an Prionproteinen mit Aminosäuresequenzveränderungen in der *octarepeat*-Region

Da die Kupferbindung des Prionproteins an der Histidin-haltigen *octarepeat*-Region erfolgt, wurde die Beeinflussung der zellulären Spaltung von  $\text{PrP}^c$  durch Kupfer anhand von bereits vorliegenden moPrP-Mutanten mit verschiedenen Aminosäuresequenzveränderungen in dieser Region analysiert. Die Konstrukte sowie die polyklonalen N2a-Zelllinien, die die mutierten Prionproteine überexprimieren wurden im Rahmen der Diplomarbeit von C. Behrens wie dort beschrieben erzeugt. Sie basieren auf murinem PrP ohne das 13A5 Epitop und

tragen die PrP-Gene unter der Kontrolle des hCMV-Promotors im Vektor PCIneo (siehe Abbildung 15, Seite 60).

In Abbildung 40 sind die Aminosäuresequenzen der unterschiedlichen moPrP Konstrukte mit Mutationen in der *octarepeat*-Region im Vergleich zur moPrP Kontrolle dargestellt. Die Mutanten werden dort und im folgenden nach den eingeführten Mutationen benannt. In der Legende zu Abbildung 40 finden sich die vollständigen Bezeichnungen.

Im Konstrukt H/G waren die vier in dieser Region lokalisierten Histidine durch Glycine ersetzt. Da die Kupferbindung wahrscheinlich über Komplexbildung mit diesen vier Histidinen verläuft, sollte dieses PrP-Konstrukt die Fähigkeit zur Bindung von Kupfer verloren haben. Bei den Konstrukten  $\Delta$ NcoI und  $\Delta$ 51-90 handelte es sich um Mutanten mit unterschiedlich ausgedehnten Deletionen in der *octarepeat*-Region. Das  $\Delta$ NcoI Konstrukt verfügte noch über zwei Histidine in diesem Bereich, dem  $\Delta$ 51-90 Konstrukt fehlte die gesamte *octarepeat*-Region.

<b>Kontrolle</b>	GGNRYP	<b>P</b> QGGTWGQ	<b>P</b> HGGGWGQ	<b>P</b> HGGSWGQ	<b>P</b> HGGSWGQ	<b>P</b> HGGGWGQ	GGGTH
<b>H/G</b>	GGNRYP	PQGGTWGQ	<u>P</u> GGGGWGQ	<u>P</u> GGGSWGQ	<u>P</u> GGGSWGQ	<u>P</u> GGGGWGQ	GGGTH
<b>D NcoI</b>	GGNRYP	PQGGTWGQ	PH.....	.....	..GGGWGQ	GGGTH	
<b>D 51-90</b>	GGNRYP	.....	.....	.....	.....	.....	GGGTH

Abbildung 40: Aminosäuresequenzen der *octarepeat*-Region unterschiedlicher Prionprotein Mutanten im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz.

Alle Konstrukte basieren auf der Kontrolle moPrP. Aminosäuresequenzveränderungen bezüglich dieser Kontrolle sind durch Fettdruck und Unterstreichung hervorgehoben. Punkte stellen Deletionen der entsprechenden Kontrollsequenz dar.

Bezeichnungen: Kontrolle: moPrP; H/G: moPrP-H/G;  $\Delta$ NcoI: moPrP- $\Delta$ NcoI;  $\Delta$ 51-90: moPrP- $\Delta$ 51-90.

Die Analyse des 18 kDa Spaltprodukts erfolgte durch immunologische Detektion des deglykosylierten Prionproteins aus Zelllysaten der das jeweilige Konstrukt überexprimierenden N2a-Zelllinien mit dem Antikörper 6H4. Eine exemplarische *Western Blot-Analyse* und die Ergebnisse der Quantifizierung von jeweils drei unabhängigen Experimenten sind in Abbildung 41 gezeigt. Aus Tabelle 9 (Anhang, Seite 144) sind die rechnerisch aus den Meßdaten ermittelten Verhältnisse zwischen 18 kDa Spaltprodukt und ungespaltenem Prionprotein zu entnehmen.



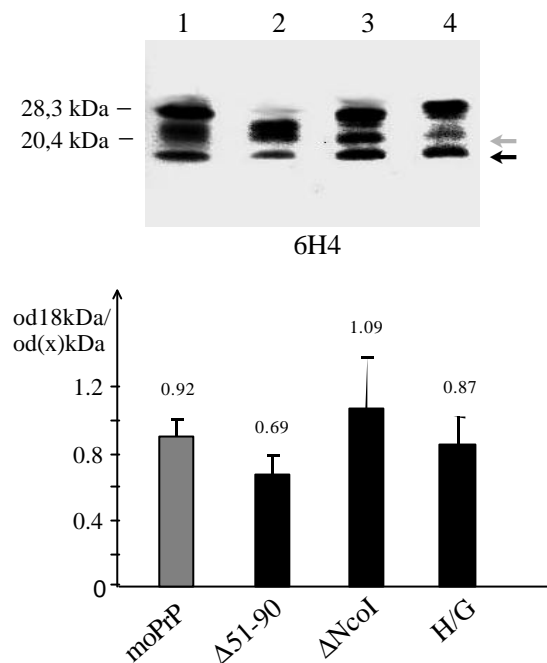


Abbildung 41: *Western Blot-Analyse* der mutierten Prionproteine mit dem Antikörper 6H4 und quantitative Bestimmung des 18 kDa Spaltprodukts im Verhältnis zum nachgewiesenen ungespaltenen Prionprotein.

Die Auftrennung der Proteine aus mit PNGase deglykosylierten N2a-Zellysaten erfolgte auf einem 15%igen SDS-PAG. Aufgetragen wurden jeweils 100 µg Gesamtprotein. Die Detektion erfolgte mit dem Primärantikörper 6H4 und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-AP über die Aufzeichnung von Chemolumineszenzsignalen.

Spuren: 1: Wildtyp-Kontrolle; 2: Δ51-90; 3: ΔNcoI; 4: H/G. Die Molekulargewichte von Markerproteinen sind auf der linken Seite angegeben.

Die Pfeile markieren die C-terminalen Spaltprodukte bei etwa 18 kDa (schwarz) und 20 kDa (grau).

Die im Balkendiagramm dargestellte quantitative Auswertung der Bandenintensitäten durch elektronische Aufzeichnung der Lichtsignale erfolgte normiert auf die jeweilige Menge an ungespaltenem Prionprotein. Die Mittelwerte der od18kDa/od(x)kDa Quotienten einzelner Analysen sind oberhalb der Balken angegeben. (x): Molekulargewicht des jeweils analysierten ungespaltenen Prionprotein-Konstrukts. Fehlerbalken stellen Standardabweichungen dar.

In allen transfizierten N2a-Zelllinien war das aus der Überexpression resultierende Prionprotein detektierbar (Spuren 1 bis 4) und eine quantitative Auswertung der Bandenintensitäten möglich. Während das ungespaltene Konstrukt H/G (Spur 4) wie die Wildtyp-Kontrolle (Spur 1) ein Molekulargewicht von 28 kDa aufwies zeigten die ungespaltenen Deletionsmutanten ein wie erwartet verringertes Molekulargewicht. Das ungespaltene Konstrukt Δ51-90 (Spur 2) ergab eine Bande bei etwa 24 kDa und das Konstrukt ΔNcoI (Spur 3) eine Bande bei etwa 26 kDa. Da die Deletionen im N-Terminus des Proteins lokalisiert waren, blieb das Molekulargewicht der C-terminalen Spaltprodukte konstant bei 18 beziehungsweise 20 kDa. Die quantitative Analyse der Spaltungseffizienzen ergab für die Wildtyp-Kontrolle (Spur 1) einen od18kDa/od28kDa Quotienten von im

Mittel 0,92. Eine deutliche Veränderung der Spaltungseffizienz war für keine der untersuchten Prionprotein-Mutanten zu detektieren. Für das Konstrukt H/G (Spur 4) wurde ein fast der Wildtyp-Kontrolle entsprechender  $od_{18kDa}/od_{28kDa}$  Quotient von 0,87 ermittelt. Das Konstrukt  $\Delta NcoI$  (Spur 3) zeigte einen leicht erhöhten  $od_{18kDa}/od_{26kDa}$  Quotienten von 1,09 und die Mutante  $\Delta 51-90$  (Spur 2) einen leicht erniedrigten  $od_{18kDa}/od_{24kDa}$  Wert von 0,69. Die ermittelten Abweichungen von der Wildtyp-Kontrolle wurden nach Durchführung des *Student's-t-test* als nicht signifikant eingestuft.

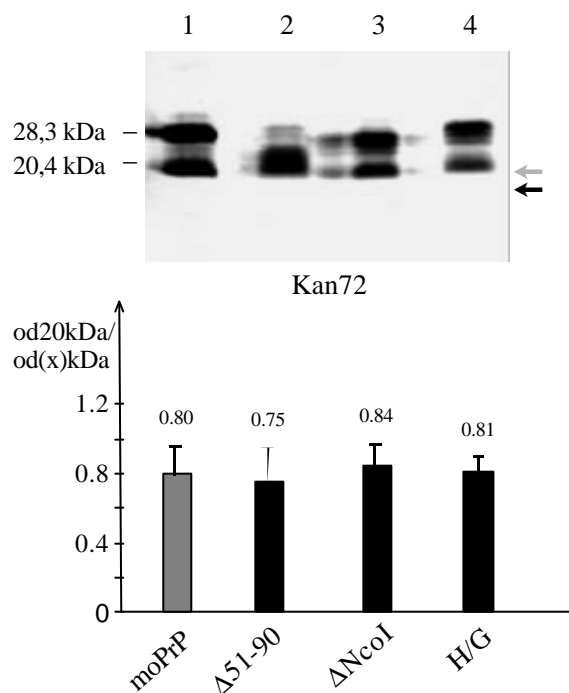


Abbildung 42: *Western Blot-Analyse* der mutierten Prionproteine mit dem Antikörper Kan72 und quantitative Bestimmung des 20 kDa Spaltprodukts im Verhältnis zum nachgewiesenen ungespaltenen Prionprotein.

Die Auftrennung der Proteine aus mit PNGase deglykosylierten N2a-Zellysaten erfolgte auf einem 15%igen SDS-PAG. Aufgetragen wurden jeweils 100  $\mu$ g Gesamtprotein. Die Detektion erfolgte mit dem Primärantiserum Kan72 und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Kaninchen-AP über die Aufzeichnung von Chemolumineszenzsignalen.

Spuren: 1: Wildtyp-Kontrolle; 2:  $\Delta 51-90$ ; 3:  $\Delta NcoI$ ; 4: H/G. Die Molekulargewichte von Markerproteinen sind auf der linken Seite angegeben.

Die Pfeile markieren die C-terminalen Spaltprodukte bei etwa 18 kDa (schwarz) und 20 kDa (grau).

Die im Balkendiagramm dargestellte quantitative Auswertung der Bandenintensitäten durch elektronische Aufzeichnung der Lichtsignale erfolgte normiert auf die jeweilige Menge an ungespaltenem Prionprotein. Die Mittelwerte der  $od_{18kDa}/od(x)kDa$  Quotienten einzelner Analysen sind oberhalb der Balken angegeben. (x): Molekulargewicht des jeweils analysierten ungespaltenen Prionprotein-Konstrukts. Fehlerbalken stellen Standardabweichungen dar.

Die Analyse des 20 kDa Spaltprodukts erfolgte durch immunologische Detektion des deglykosylierten Prionproteins aus Zellysaten der das jeweilige Konstrukt überexprimierenden N2a-Zelllinien mit dem Antiserum Kan 72. Eine exemplarische *Western Blot-Analyse* und die Ergebnisse der Quantifizierung von jeweils drei unabhängigen Experimenten sind in Abbildung 42 gezeigt. Aus Tabelle 10 (Anhang, Seite 144) sind die rechnerisch aus den Meßdaten ermittelten Verhältnisse zwischen 20 kDa Spaltprodukt und ungespaltenem Prionprotein zu entnehmen.

Im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle (Spur 1) mit einem durch Quantifizierung ermittelten od 20kDa/28kDa Quotient von 0,80 zeigten sich für die verschiedenen Prionprotein-Mutanten keinerlei signifikante Unterschiede bezüglich der Menge an detektierbarem 20 kDa Spaltprodukt. Weder die Aminosäuresubstitutionen im Konstrukt H/G (Spur 4) mit einem Wert von 0,81 noch die Deletionrn in den Konstrukten  $\Delta$ NcoI (Spur 3) und  $\Delta$ 51-90 (Spur 2) mit Werten von 0,84 und 0,75 zeigten einen Einfluß auf die Spaltung des Proteins.

Wie in Abbildung 43 exemplarisch gezeigt, wurden die *Western Blot-Analysen* unter Verwendung des Antiserums 1A8 wiederholt, um die für beide Spaltprodukte ermittelten Daten zu überprüfen. Sowohl die für das 18 kDa Spaltprodukt als auch das 20 kDa Spaltprodukt zuvor durch Quantifizierung ermittelten Resultate konnten bestätigt werden. Keine der eingeführten Mutationen hatte einen deutlichen Einfluß auf die zelluläre Spaltung des Prionproteins in N2a-Zellen.

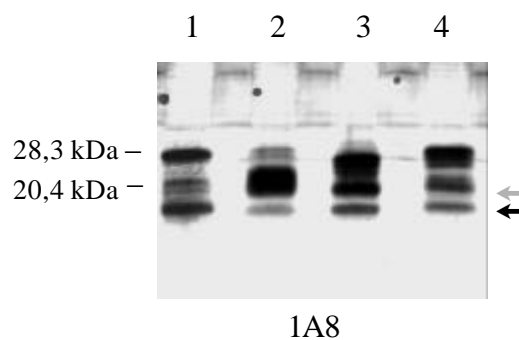


Abbildung 43: Immunologischer Nachweis der mutierten mit PNGaseF deglykosylierten Prionproteine in N2a-Zellen nach Auftrennung der Zellysate auf einem 15%igen SDS-PAG mit dem Antiserum 1A8.

Aufgetragen wurden 100  $\mu$ g Gesamtprotein. Die Detektion erfolgte mit dem Primärantiserum 1A8 und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Kaninchen-AP über Reaktion mit NBT/BCIP.

Spuren: 1: Wildtyp-Kontrolle; 2:  $\Delta$ 51-90; 3:  $\Delta$ NcoI; 4: H/G. Die Molekulargewichte von Markerproteinen sind auf der linken Seite angegeben.

Die Pfeile markieren die C-terminalen Spaltprodukte bei etwa 18 kDa (schwarz) und 20 kDa (grau).

Weder die durch die Antikörper 6H4 und 1A8 nachgewiesene Spaltung im zentralen Bereich des Proteins noch die durch die Antiseren 1A8 und Kan72 gezeigte weiter *N*-terminal lokalisierte Spaltung wurden von den Mutationen, die eine Kupfer-Bindung des Prionproteins zumindest zum Teil inhibieren sollten beeinflusst.

#### **6.4.2 Überexpression der Spaltprodukte zur funktionellen Analyse**

Zur weiteren Analyse der Funktion der zellulären Spaltung des Prionproteins ist es nötig, die resultierenden Spaltprodukte genauer zu betrachten, da diese möglicherweise selbst die Funktion ausüben. Zu diesem Zweck wurden sowohl das *N*- als auch das *C*-terminale Spaltprodukt in verschiedenen Systemen überexprimiert.

##### **6.4.2.1 Mikrobielle Erzeugung des *N*-terminalen Spaltprodukts**

Die Überexpression des *N*-terminalen Spaltprodukts in N2a Zellen erschien wenig sinnvoll, da der *N*-Terminus im eukaryontischen Expressionssystem vermutlich ins Medium abgegeben würde und er dort wahrscheinlich einem raschen proteolytischen Abbau unterläge. Daher wurde für die Überexpression dieses Proteinfragments ein bakterielles Expressionssystem gewählt.

###### **6.4.2.1.1 Konstruktion und Klonierung des prokaryontischen Expressionsvektors pET21dhuPrP23-112**

Auf Basis des in pBluescript KS(+) klonierten offenen Leserahmens des humanen *PRNP*-Gens (Windl, O. *et al.*, 1996) wurde die kodierende Region des *N*-Terminus (huPrP23-112) wie in Abbildung 44 B dargestellt über PCR mit den Primern huPrP23-112up und huPrP23-112do amplifiziert. Der Primer huPrP23-112up beinhaltet eine *Bsp*HI Erkennungssequenz und ein Start-Kodon zur Initialisierung der Transkription und der Primer huPrP23-112 zwei Stop-Kodons zur Termination der Transkription und eine *Eco*RI Erkennungssequenz. Das erhaltene PCR-Produkt wurde in die *Sma*I Schnittstelle des Vektors pBluescript SKII(-) kloniert und die Sequenz des klonierten Konstrukts durch Sequenzierung ausgehend von den Sequenzprimern M13uni-800 und M13rev-800 verifiziert. Über Spaltung der eingeführten Erkennungssequenzen mit den Restriktionsenzymen *Bsp*HI und *Eco*RI wurde das Konstrukt im richtigen Leserahmen in die komplementären *Nco*I und *Eco*RI Schnittstellen des Expressionsvektors pET-21d (Studier, F. W. und Moffatt, B. A., 1986) umkloniert. In diesem Vektor stand das konstruierte huPrP23-112 Gen unter Kontrolle des induzierbaren *T7lac* Promotors (Dubendorff, J. W. und Studier, F. W., 1991). Die Sequenz des Konstrukts huPrP23-112 ist aus Abbildung 49 (Anhang, Seite 145) zu entnehmen.

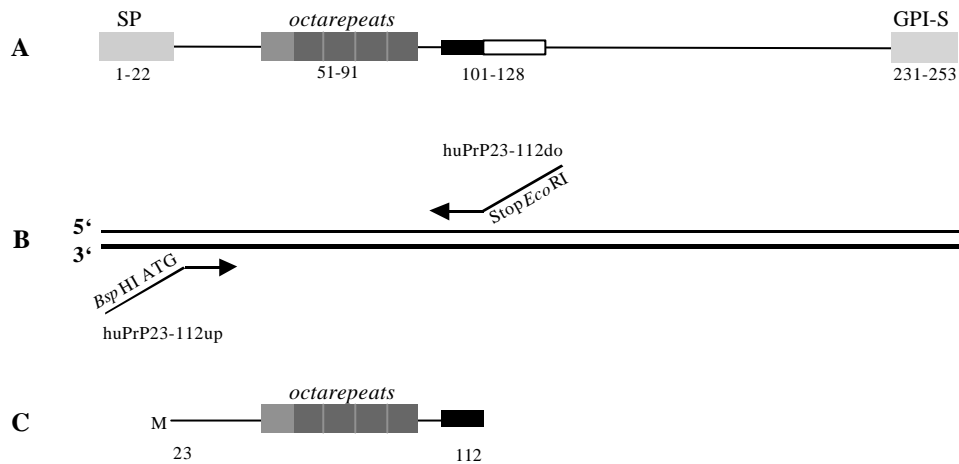


Abbildung 44: Schematische Darstellung des humanen Prionproteins (A), der Amplifikation des den *N*-Terminus des Proteins kodierenden Genabschnitts mittels PCR (B) und des nach Überexpression vorliegenden huPrP23-112 Proteins (C).

Bezeichnungen: SP: Signalpeptid (AS 1-22), *octarepeats*: fünfmalige P(Q/H)GG(T/G/S)W GQ-Sequenzwiederholung (AS 51-91), GPI-S: Signalsequenz zur Anhängung des GPI-Ankers (AS 232-254), Schwarze Box: basische Region, weiße Box: hydrophobe Region; Pfeile: verwendete Primer huPrP23-112up und huPrP23-112do; BspHI, EcoRI: Erkennungssequenzen der entsprechenden Restriktionsendonukleasen, ATG: Startkodon; Stop: Stopkodon.

#### 6.4.2.1.2 Überexpression und Aufreinigung von huPrP23-112

Die Überexpression von huPrP23-112 erfolgte im *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS durch Induktion mit IPTG und die Aufreinigung des Proteins über standardisierte FPLC Auftrennungen durch M. Kramer. Die Authentizität des in Abbildung 44 C schematisch dargestellten huPrP23-112 wurde durch Massenspektroskopie, HPLC-Analyse sowie *Western Blot-Analysen* belegt.

In Abbildung 45 ist die Auftrennung unterschiedlicher Mengen des aufgereinigten Proteins auf einem SDS-PAG von 17,74 µg (Spur 1) bis 0,74 µg (Spur 5) gezeigt. In allen Spuren zeigte sich eine Bande bei etwa 9 kDa, die das monomere huPrP23-112 darstellte. Weiterhin wurden verschiedene Banden im höhermolekularen Bereich bis zu über 100 kDa detektiert. Möglicherweise stellten einige dieser Banden stabile Polymere des huPrP23-112 Proteins dar, die in Gegenwart von SDS nicht aufgebrochen werden konnten (vergleiche Abbildung 46).

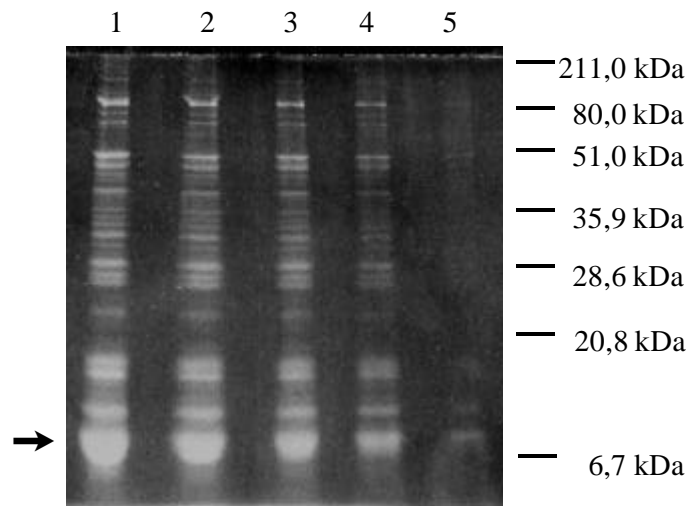


Abbildung 45: Auftrennung des aufgereinigten huPrP23-112 auf einem 15 %igen SDS-PAG.

Die Detektion erfolgte durch Färbung mit Nil-Rot.

Spuren: 1: 17,74  $\mu\text{g}$  huPrP23-112; 2: 11,1  $\mu\text{g}$  huPrP23-112; 3: 7,4  $\mu\text{g}$  huPrP23-112; 4: 3,7  $\mu\text{g}$  huPrP23-112; 5: 0,74  $\mu\text{g}$  huPrP23-112. Molekulargewichte von Markerproteinen sind auf der rechten Seite angegeben.

Der Pfeil markiert das monomere huPrP23-112 Protein bei etwa 9 kDa.

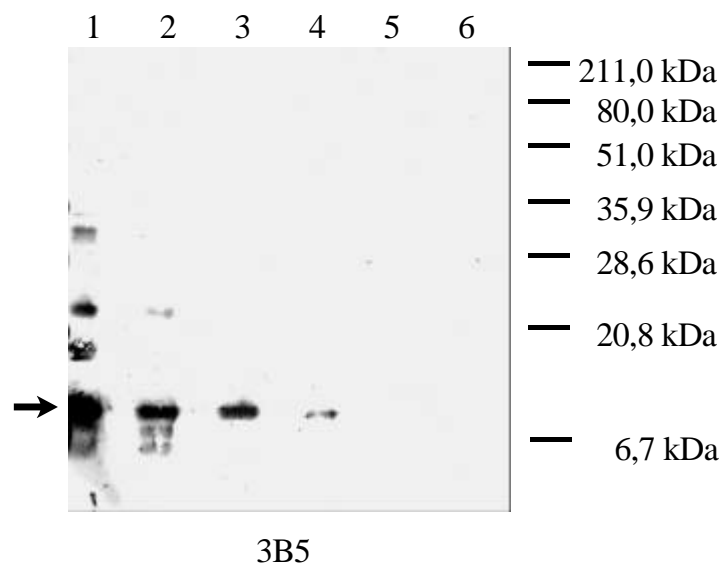


Abbildung 46: Immunologischer Nachweis des aufgereinigten huPrP23-112 nach Auftrennung der Präparation auf einem 15%igen SDS-PAG.

Die Detektion erfolgte mit dem Primärantikörper 3B5 und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-AP über Reaktion mit NBT/BCIP.

Spuren: 1: 3,7  $\mu\text{g}$  huPrP23-112; 2: 0,74  $\mu\text{g}$  huPrP23-112; 3: 74 ng huPrP23-112; 4: 7,4 ng huPrP23-112; 5: 0,74 ng huPrP23-112; 6: 74 pg huPrP23-112. Molekulargewichte von Markerproteinen sind auf der rechten Seite angegeben.

Der Pfeil markiert das monomere huPrP23-112 Protein bei etwa 9 kDa.

Zur Überprüfung der Identität der multiplen höhermolekularen Banden wurde aufgereinigtes huPrP23-112 wie in Abbildung 46 gezeigt einer *Western Blot-Analyse* mit dem den *N*-Terminus des Prionproteins erkennenden Antikörper 3B5 unterzogen. Die Analyse erfolgte mit Proben unterschiedlicher Proteinmenge von 3,7 µg (Spur 1) bis 74 pg (Spur 6). Das monomere huPrP23-112 Protein war als Bande bei etwa 9 kDa detektierbar (Spuren 1 bis 4). Proteinmengen unter 7,4 ng waren nicht mehr nachweisbar (Spuren 5 und 6). Die Analyse größerer Proteinmengen resultierte wie schon beim SDS-PAG festgestellt im Auftreten von Banden im höhermolekularen Bereich. Bei einer aufgetragenen Proteinmenge von 3,7 µg traten neben der 9 kDa Bande eine Bande bei etwa 18 kDa, eine bei etwa 22 kDa und eine bei etwa 30 kDa auf. Weiterhin wurden auch Banden unterhalb von 9 kDa detektiert (Spur 1). Mit abnehmender Proteinmenge wurde vermutlich die Grenze der Nachweisbarkeit unter den gegebenen Detektionsbedingungen erreicht. Durch eine Verlängerung der Reaktion mit NBT/BCIP waren sowohl bei hohen als auch bei niederen Proteinmengen zahlreiche weitere Banden im höhermolekularen Bereich detektierbar (Daten nicht gezeigt).

Einige der im SDS-PAG detektierten höhermolekularen Banden konnten im *Western Blot* als Multimere von huPrP23-112 identifiziert werden. Die Lokalisation anderer Signale sowohl im SDS-PAG als auch im *Western Blot* war mit einer Multimerisierung des 9 kDa Proteins huPrP23-112 jedoch nicht zu erklären. Dennoch ist mit der erfolgten Herstellung und Aufreinigung des *N*-terminalen Spaltprodukts die Grundlage für weitergehende Analysen gelegt.

#### **6.4.2.2 Überexpression des C-terminalen Spaltprodukts im eukaryontischen System**

Die Überexpression des *C*-terminalen Spaltprodukts erfolgte im eukaryontischen System, um eine spätere funktionelle Analyse zu ermöglichen. Aufgrund der bisher ermittelten Daten sollte dieses Protein-Fragment in N2a-Zellen verhältnismäßig stabil und damit verschiedensten Analysen zugänglich sein. Um der *in vivo* Situation, in der das *C*-terminale Spaltprodukt wie ungespaltenes PrP<sup>c</sup> an der Zellmembran verankert ist möglichst nahe zu kommen, wurde ein Konstrukt des *C*-terminalen Spaltprodukts erzeugt, das wie in Abbildung 47 C dargestellt *N*-terminal mit dem Signal-Peptid des Prionproteins verknüpft ist.

##### **6.4.2.2.1 Konstruktion und Klonierung des eukaryontischen Expressionsvektors pCIneomoPrPSIG111-254**

Die Konstruktion des den *C*-Terminus mit Signalsequenz kodierenden Gens erfolgte wie in Abbildung 47 B gezeigt über SOE-PCR mit den äußeren Primern T3 und T7neo und den inneren Mutageneseprimern *C*-Terminusup und *C*-Terminusdo. Als Ursprungsvektor diente das Plasmid pCI-moPrPI138M. Die PCR-Produkte wurden über ihre *Xba*I und *Xho*I Schnittstellen in die

entsprechenden Spaltstellen des Expressionsvektors pCI-neo kloniert und deren Sequenzen durch Sequenzanalyse von den Sequenzprimern T3-800 und T7neo-800 ausgehend bestätigt. Die Sequenz des moPrPSIG111-254 Konstrukts ist aus Abbildung 50 (Anhang, Seite 145) zu entnehmen.

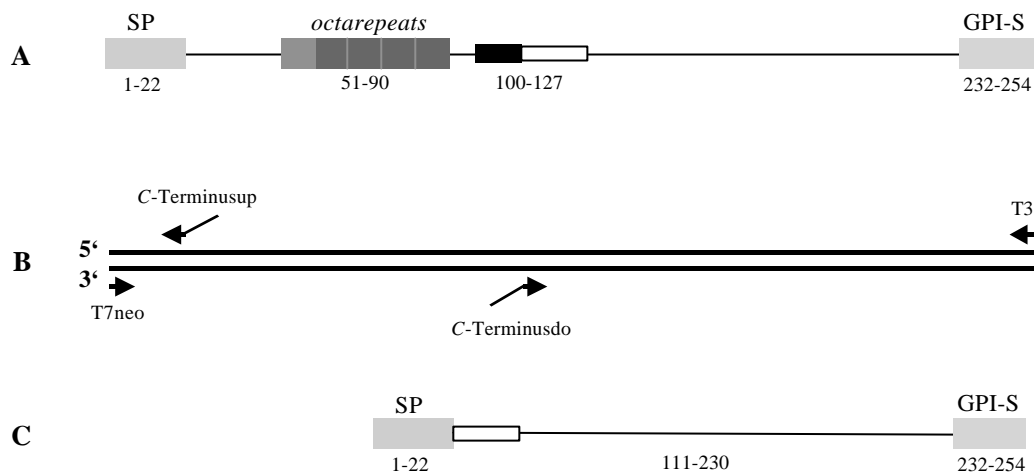


Abbildung 47: Schematische Darstellung des murinen Prionproteins (A), der Amplifikation der die Signalsequenz und den C-Terminus des Proteins kodierenden Genabschnitte mittels PCR mit überlappenden Primern (B) und des nach Überexpression vorliegenden moPrPSIG111-254 Proteins (C).

Bezeichnungen: SP: Signalpeptid (AS 1-22), octarepeats: fünfmalige P(Q/H)GG(T/G/S)W GQ-Sequenzwiederholung (AS 51-91), GPI-S: Signalsequenz zur Anhängung des GPI-Ankers (AS 232-254), Schwarze Box: basische Region, weiße Box: hydrophobe Region; Pfeile: verwendete Primer T7neo, T3, C-Terminusup und C-Terminusdo.

#### 6.4.2.2.2 Überexpression des C-terminalen Spaltprodukts in N2a Zellen

Nach stabiler Effecten-vermittelter Transfektion von N2a-Zellen mit dem Vektor pCIneo-moPrPSIG111-254 wurden Zellysate der G418-resistenten Zellen hergestellt und diese für *Western Blot-Analysen* mit C-terminalen Antikörpern verwandt.

In Abbildung 48 ist der immunologische Nachweis des überexprimierten C-Terminus vor (Spur 3) und nach der Deglykosylierung mit PNGaseF (Spur 2) im Vergleich zur überexprimierten moPrPI138M-Kontrolle (Spur 1) mit dem Antikörper 6H4 gezeigt. Das Konstrukt moPrPSIG111-254 (Spuren 2 und 3) wurde in N2a-Zellen stark überexprimiert und zeigte im SDS-PAG nach Deglykosylierung (Spur 2) ein dem Spaltprodukt der moPrPI138M-Kontrolle (Spur 1) entsprechendes Laufverhalten. Das ließ darauf schließen, daß die 23 Aminosäuren umfassende Signalsequenz bei der Prozessierung des Proteins abgespalten wurde. Vor Abspaltung der Glykosylierung (Spur 3) waren sowohl



das unglykosylierte Protein-Fragment bei 18 kDa als auch ein- und zweifach glykosyliertes Protein bei 20 und 28 kDa nachweisbar, was auf einen vollständig und fehlerfrei verlaufenden Metabolismus schließen ließ. Die erfolgte Erzeugung des C-terminalen Spaltprodukts im eukaryontischen System legt den Grundstein für nachfolgende funktionelle Untersuchungen des Proteins und damit auch für die Aufklärung der biologischen Funktion der Spaltung des Prionproteins.

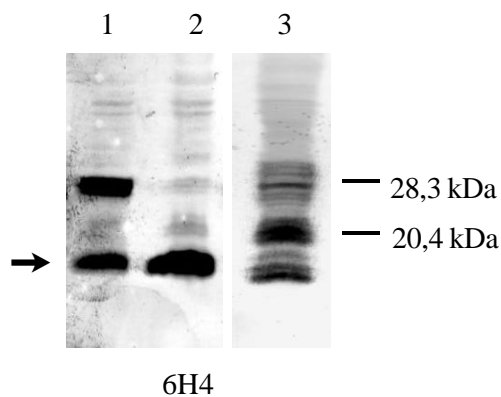


Abbildung 48: Immunologischer Nachweis des in N2a-Zellen überexprimierten murinen C-Terminus vor und nach Deglykosylierung mit PNGaseF.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte auf einem 15%igen SDS-PAG. Aufgetragen sind jeweils 100 µg Gesamtprotein. Die Detektion erfolgte mit dem Primärantikörper 6H4 und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-AP über Reaktion mit NBT/BCIP.

Spuren: 1: moPrPI138M-Kontrolle nach Deglykosylierung; 2: moPrPC-Terminus nach Deglykosylierung ; 3: moPrPC-Terminus vor Deglykosylierung. Molekulargewichte von Markerproteinen sind auf der rechten Seite angegeben.

Der Pfeil markiert das C-terminale Spaltprodukt sowie den überexprimierten C-Terminus.

### 6.4.3 Zusammenfassende Beurteilung der erhaltenen Ergebnisse

Die Untersuchungen bezüglich des Einflusses der mutmaßlich an der biologischen Funktion des Prionproteins beteiligten  $\text{Cu}^{2+}$ -Bindung auf die zelluläre Spaltung von  $\text{PrP}^c$  führte nicht zu eindeutigen Ergebnissen. Während die  $\text{Cu}^{2+}$ -Bindung im *in vitro* System zu einer Spaltung von bakteriell erzeugtem  $\text{PrP}^c$  führte, zeigten *in vivo* Studien mit mutierten zur Kupferbindung nicht mehr fähigen Prionprotein-Mutanten, daß die eingeführten Mutationen keine Auswirkungen auf die zelluläre Spaltung hatten.

Die Erzeugung der Spaltprodukte in verschiedenen Systemen war erfolgreich. Damit ist die Grundlage für spätere funktionelle Untersuchungen dieser Proteinfragmente gelegt.

## 7 DISKUSSION

Ausgangspunkte für die in dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen waren eine Reihe von Hinweisen auf eine mögliche proteolytische Spaltung des Prionproteins, die in der vorliegenden Arbeit analysiert und charakterisiert wurde. So ergaben sich erste Indizien für die zelluläre Spaltung des Proteins bei der Aufreinigung von PrP<sup>c</sup> aus Hirnen des Syrischen Hamsters (SHa). Hierbei waren zwei sich im Molekulargewicht deutlich unterscheidende SHaPrP<sup>c</sup>-Formen identifiziert worden: Das 28 kDa Protein PrP-I und das 18 kDa Protein PrP-II. Weitere Untersuchungen ergaben, daß es sich bei PrP-II um ein *N*-terminal verkürztes PrP-Fragment handelte. Dieses könnte aus einer proteolytischen Spaltung von PrP-I im Bereich der Aminosäuren Met 112 bis Met 138 resultieren, gleichermaßen aber auch durch unspezifischen proteolytischen Abbau des Proteins vom *N*-Terminus her entstanden sein (Pan, K. M. *et al.*, 1992). Weitere Anhaltspunkte für eine punktuelle Spaltung des Prionproteins ergaben sich aus Untersuchungen von ChPrP<sup>c</sup>, dem dem zellulären Prionprotein der Säugetiere homologen Protein des Huhns (Ch). Immunologischen Analysen von ChPrP<sup>c</sup> aus stabil transfizierten Neuroblastoma-Zelllinien und aus Hirnhomogenaten ergaben, daß ein Großteil der an der Membran verankerten Prionproteine einer *N*-terminalen Spaltung distal der *octarepeat*-Region unterlegen war, die in einem *C*-terminalen Spaltprodukt von nach Abspaltung der Zuckerketten etwa 20 kDa resultierte. Das *N*-terminale Spaltprodukt von etwa 8,5 bis 11,5 kDa war sowohl in konditioniertem Medium als auch im Liquor nachweisbar. Die Spaltstelle wurde zwischen den Aminosäuren Thr 114 und Met 137 lokalisiert. Massenspektroskopische Untersuchungen zeigten, daß das vorwiegend auftretende *N*-terminale Spaltprodukt die Aminosäuren Lys 25 bis Met 137 umfaßt (Harris, D. A. *et al.*, 1993). Die zelluläre Spaltung des Prionproteins wurde letztlich auch unter Verwendung von humanem Material charakterisiert. Das bei diesen Analysen als C1 bezeichnete *C*-terminale Spaltprodukt wurde sowohl in normalen als auch in Hirnen CJD erkrankter Patienten sowie in humanen Neuroblastom-Zelllinien detektiert. Durch Sequenzierung des *C*-terminalen Spaltprodukts konnte die Spaltstelle am His 111 oder alternativ am Met 112 lokalisiert werden. Das *N*-terminale Spaltprodukt wurde nicht nachgewiesen (Chen, S. G. *et al.*, 1995).

Die Tatsache, daß Hinweise auf eine proteolytische Spaltung des Prionproteins in verschiedenen Spezies und unter zum Teil sehr unterschiedlichen experimentellen Bedingungen gefunden worden waren, wies darauf hin, daß die Spaltung von PrP<sup>c</sup> im zentralen Bereich des Proteins ein zum normalen Metabolismus des Prionproteins gehörender Prozeß ist und nicht einen unspezifischen proteolytischen Abbau des Proteins darstellt. Auch die Tatsache, daß die postulierte punktuelle Spaltung in einem engen Bereich in der unter allen bekannten PrP<sup>c</sup>-Sequenzen verschiedener Spezies hochkonservierten zentralen Region des Proteins stattfindet, konnte als Indiz für die Bedeutung der zellulären Spaltung des Proteins angesehen werden. Der konkrete Hinweis daß es sich

tatsächlich um eine Spaltung an einer genau definierten Spaltstelle handelt resultiert jedoch ausschließlich aus den Untersuchungen der Spaltung von chPrP<sup>c</sup>. Nur hier wurden beide Spaltprodukte nachgewiesen und charakterisiert. Alle anderen Untersuchungen beschränkten sich auf die Detektion der C-terminalen Spaltprodukts, welches auch aus einem unspezifischen Abbau des ungespaltenen Prionproteins vom N-Terminus her resultieren könnte.

## 7.1 DIE SPALTUNG DES PRIONPROTEINS IN TG81-MÄUSEN

Im ersten Teil der hier vorliegenden Arbeit wurde die Spaltung des Hamster-Prionproteins in Anlehnung an die genannten Publikationen durch immunologische Detektion des Proteins und seiner Spaltprodukte in Hirnhomogenaten nachgewiesen und gezeigt, daß es sich auch bei der spezifischen Spaltung des Prionproteins der Mammalier um einen *in vivo* ablaufenden Prozeß handelt. Weiterhin wurde ein System etabliert, das die genaue quantitative Analyse der zellulären Spaltung des Prionproteins erlaubte. Die Experimente wurden wegen guter Verfügbarkeit an anti-SHaPrP Antikörpern vorwiegend mit Hirnlysaten der SHaPrP überexprimierenden transgenen Mauslinie tg81 durchgeführt (Scott, M. *et al.*, 1989), die, wie zuvor überprüft wurde, bezüglich der proteolytischen Spaltung des Prionproteins keinerlei Unterschiede zu Hamstern oder unterschiedlichen anderen Mauslinien zeigt.

### 7.1.1 Detektion des N-terminalen Spaltprodukts

Das N-terminale 9 kDa Spaltprodukt konnte vor Anreicherung wenn überhaupt nur als schwache Bande detektiert werden, was die Vermutung nahelegte, das Proteinfragment könne möglicherweise einem raschen proteolytischen Abbau unterlegen sein. Die durchgeführte Überprüfung der Stabilität eines bakteriell erzeugten verkürzten N-terminalen PrP-Fragments moPrP23-98 (Brown, D. R. *et al.*, 1997) in Hirnhomogenaten bestätigte diese Annahme. Der N-Terminus des Prionproteins wurde schon nach kurzer Inkubation vollständig abgebaut. Auch der im letzten Teil der Arbeit bakteriell erzeugte N-Terminus des humanen Prionproteins huPrP23-112 erwies sich in verschiedenen Untersuchungen als instabil (S. Korte, persönliche Mitteilung). Desgleichen finden sich auch in der Literatur Hinweise auf die Instabilität des N-terminalen Proteinfragments. Inkubation bei saurem pH resultiert in einem vollständigem Abbau des N-terminalen Spaltprodukts rekombinant hergestellten murinen Prionproteins (Hornemann, S. und Glockshuber, R., 1996; Hornemann, S. *et al.*, 1997). Die damit zunächst im Widerspruch stehende leichte Nachweisbarkeit des N-terminalen Spaltprodukts von chPrP liegt vermutlich darin begründet, daß dieses sich schon von der Primärstruktur deutlich unterscheidende Protein-Fragment eine höhere Stabilität aufweist als der N-Terminus des Prionproteins der Säugetiere. Inzwischen wurde gezeigt, daß der N-Terminus von chPrP eine Domäne bildet, die gegenüber Proteasen verhältnismäßig stabil ist (Marcotte, E. M. und

Eisenberg, D., 1999) wohingegen das Homologon der Säugetiere ein unstrukturiertes Proteinfragment darstellt, das von Proteasen leicht abgebaut werden kann (Riek, R. *et al.*, 1997; Donne, D. G. *et al.*, 1997). Dennoch wurde das *N*-terminalen Spaltprodukt des murinen Prionproteins im Kulturüberstand moPrP überexprimierender N2a-Zellen nach Anreicherung durch Immunpräzipitation inzwischen gezeigt (Lehmann, S. *et al.*, 1999).

### 7.1.2 Detektion C-terminaler Spaltprodukte

Ein *C*-terminales Produkt der zellulären Spaltung des Prionproteins mit einem Molekulargewicht von 18 kDa, das dem bereits beschriebenen PrP<sup>II</sup> oder C1 entspricht (Pan, K. M. *et al.*, 1992; Chen, S. G. *et al.*, 1995), war in tg81 Hirnhomogenaten leicht nachweisbar. Die Detektion dieses *C*-terminalen Proteinfragments war erst nach Deglykosylierung der Proteine möglich. Ein Befund, der einen Hinweis auf eine artifizielle Natur des Spaltprodukts darstellen könnte. So könnte das detektierte Spaltprodukt nicht Resultat einer spezifischen *in vivo* ablaufenden Spaltung sein, sondern das Produkt eines erst *in vitro* im Verlauf der Experimente stattfindenden proteolytischen Abbaus darstellen. Zur Klärung dieser Frage wurden die Versuchsbedingungen einer eingehenden Prüfung unterzogen. Weder die in dieser Arbeit relevante Postmortalzeit der Tiere vor Präparation der Lysate noch die Anwesenheit unterschiedlicher Protease-Inhibitoren hatten einen Einfluß auf die Menge *C*-terminalen Spaltprodukts. In der Literatur finden sich jedoch Hinweise darauf, daß Postmortalzeiten von mehreren Tagen einen Einfluß auf die Menge detektierbaren *C*-terminalen Spaltprodukts zu haben scheinen und der beobachtete proteolytische Abbau während längerer Inkubation durch die Anwesenheit verschiedener Protease-Inhibitoren gehemmt werden kann (Jimenez-Huete, A. *et al.*, 1998). Bei den in dieser Arbeit durchgeführten kurzen Inkubationszeiten wurden derartige Effekte nicht beobachtet. Weiterhin wurde gezeigt, daß das Auftreten von Banden für das *C*-terminale Spaltprodukt erst nach Abspaltung der Glykosylierungen dadurch begründet ist, daß das glykosylierte Spaltprodukt aufgrund seines Laufverhaltens im SDS-PAG nicht oder nur schwer von unglykosyliertem ungespaltenem Prionprotein unterscheidbar ist. Dies zeigte sich beim Vergleich der auftretenden Bandenintensitäten für PrP<sup>c</sup> nach Analyse mit unterschiedlichen *N*- und *C*-terminalen Antikörpern. Zudem wurde im zweiten Teil der Arbeit gezeigt, daß ein mit *C*-terminalen Antikörpern nachweisbares Prionprotein-Fragment entsprechender Größe in Wildtyp PrP überexprimierenden Neuroblastoma Zellen auch dann auftrat, wenn die Glykosylierung *in vivo* durch Tunikamyzin inhibiert worden war.

Neben dem 18 kDa Spaltprodukt trat bei den verschiedenen Analysen immer auch ein zweites Spaltprodukt von etwa 20 kDa auf, das auch in Untersuchungen einer anderen Gruppe schon detektiert worden war (Jimenez-Huete, A. *et al.*, 1998). Der Nachweis dieses Spaltprodukts mit dem Antikörper Kan72 erlaubte eine

genauere Einschätzung der *N*-terminalen Ausdehnung des Proteinfragments, da dieses damit zumindest Teile des bei Aminosäure 90 lokalisierten Kan72 Epitops beinhalten muß. Da das Spaltprodukt vom Antikörper 3B5 nicht erkannt wurde kann geschlossen werden, daß die Spaltstelle *C*-terminal der Aminosäure 84 lokalisiert ist. Diese Befunde standen auch im Einklang mit der aus dem Molekulargewicht abgeleiteten Größe des 20 kDa Spaltprodukts, das demnach im Vergleich zum 18 kDa Spaltprodukt um etwa zwanzig Aminosäuren verlängert sein sollte. Auch für das zweite Spaltprodukt wurde keinerlei Einfluß durch die Postmortalzeit und die Anwesenheit verschiedener Protease-Inhibitoren festgestellt.

Zum Ausschluß der Möglichkeit, daß es sich bei den im Bereich von 18 und 20 kDa detektierten Banden um unspezifische Antikörperbindungen handelte, wurden die Analysen mit unterschiedlichen Antikörpern durchgeführt. Beide *C*-terminalen Spaltprodukte waren mit verschiedenen, gegen den *C*-Terminus des Prionproteins gerichteten Antikörpern detektierbar. Gegen den *N*-Terminus gerichtete Antikörper ergaben keine Signale. Interessanterweise stellten sich bei der quantitativen Auswertung dieser Analysen zum Teil erhebliche Schwankungen der Erkennungseffizienz beider Spaltprodukte im Vergleich zur Erkennung des ungespaltenen Prionproteins heraus. Die Erkennungseffizienzen für beide Spaltprodukte standen nicht im direkten Zusammenhang miteinander. So erkannte der Antikörper 13A5 das 18 kDa Spaltprodukt sehr effizient das 20 kDa Spaltprodukt hingegen nur mäßig gut. Auch konnte ein Zusammenhang zwischen der Affinität der Antikörper und Lage ihrer Epitope im Prionprotein nicht ermittelt werden. So zeigten die Antikörper 13A5 und 6H4 starke Unterschiede in der Erkennung beider Spaltprodukte obwohl ihre Epitope im Prionprotein nur wenige Aminosäuren voneinander entfernt lokalisiert sind. Auch in der Literatur wurden Antikörper beschrieben, die sich bezüglich ihrer Spezifität für Produkte des PrP Metabolismus zum Teil deutlich unterschieden (Zanusso, G. *et al.*, 1998). Eine Erklärung für die unterschiedlichen Affinitäten verschiedener Antikörper bleibt schwierig. Naheliegend wäre eine strukturelle Ursache, das heißt eine veränderte Struktur des Spaltprodukts im Vergleich zum ungespaltenen PrP<sup>c</sup> und dadurch bedingt eine veränderte Zugänglichkeit der verschiedenen Epitope. Da die Auftrennung der Proteine jedoch unter denaturierenden Bedingungen erfolgte, müßte hier postuliert werden, daß eine vollständige Denaturierung unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht stattgefunden hatte.

Als Fazit kann aus den durchgeführten Analysen gezogen werden, daß die Spaltung im zentralen Bereich des Prionproteins einen *in vivo* ablaufenden Prozeß darstellt. Auch die bezüglich der zweiten Spaltung des Proteins ermittelten Daten weisen darauf hin, daß diese ein zum normalen Metabolismus von PrP<sup>c</sup> gehörender Vorgang ist. Ob auch hier eine punktuelle Spaltung vorliegt kann aufgrund der vorliegenden Daten nicht geschlossen werden und bedarf weiterer Analysen. Insbesondere der Nachweis des *N*-terminalen Spaltprodukts von etwa 7 kDa ergäbe hier einen sicheren Nachweis.

## 7.2 DIE SPALTUNG DES PRIONPROTEINS IN EUKARYONTISCHEN ZELLINIEN

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die zelluläre Spaltung des Prionproteins ausgehend von schon veröffentlichten Untersuchungen an eukaryontischen Zellkulturen (Harris, D. A. *et al.*, 1993; Chen, S. G. *et al.*, 1995) in das Protein überexprimierenden Zelllinien untersucht werden. Insbesondere zur Charakterisierung der Spaltstelle bot sich hier die Möglichkeit, auf Aminosäuresequenzebene veränderte Prionproteine überzuexprimieren und die Auswirkungen der eingeführten Veränderungen *in vivo* studieren zu können. Eukaryontische Zellen stellten dabei ein Expressionssystem dar, in dem die Proteine einen weitestgehend normalen Metabolismus vollziehen und damit über alle posttranslationalen Modifikationen verfügen sollten. Die als Zelllinie für die Überexpression des Prionproteins und verschiedener Prionprotein-Mutanten gewählte murine Neuroblastoma Zelllinie (N2a-Zellen), war schon in verschiedenen Untersuchungen zur Funktion von PrP<sup>c</sup> und PrP<sup>c</sup>-Mutanten verwendet worden und hatte sich auch für die Infektion mit PrP<sup>Sc</sup> als geeignet erwiesen (Butler, D. A. *et al.*, 1988; Tatzelt, J. *et al.*, 1995; Rieger, R. *et al.*, 1998). Da N2a-Zellen eine geringe endogene PrP-Expression aufweisen, schienen sie für Untersuchungen der Prionproteinspaltung besonders geeignet. Aufgrund der endogenen PrP-Expression konnte davon ausgegangen werden, daß auch die an Metabolismus und Funktion des Prionproteins beteiligten Proteine in den Zellen exprimiert werden. Die Übertragbarkeit ermittelter Resultate auf Vorgänge im lebenden Organismus war damit gegeben.

### 7.2.1 Die mögliche Bedeutung der Spaltung

Ziel der durchgeführten Untersuchungen war die Charakterisierung der Spaltstelle im zentralen Bereich des Prionproteins insbesondere im Hinblick auf die von Callebaut *et al.* aufgestellte Hypothese, der zentrale Bereich des Prionproteins könne eine vergleichbare Funktion ausüben wie die Fusionspeptide verschiedener viraler Oberflächenvorläuferproteine (Callebaut, I. *et al.*, 1994). Basis dieser Hypothese war die auffällige Sequenzhomologie zwischen dem evolutionär hochkonservierten zentralen Bereich des Prionproteins und Fusionsproteinen verschiedener Viren.

Virale Oberflächenvorläuferproteine sind zumeist transmembrane Glykoproteine, die, häufig erst nach Aktivierung durch proteolytische Spaltung die Membranfusion zwischen der Membran umhüllter Viren und zu infizierenden Zellen initiieren. Innerhalb ihrer Aminosäuresequenz tragen diese Proteine einen als Fusionspeptid bezeichneten Bereich von etwa 20 bis 30 Aminosäuren, der sich durch ausgeprägte Hydrophobizität auszeichnet und zumeist eine Akkumulation kleiner hydrophober Aminosäuren aufweist. N-terminal dieser Region findet sich bei vielen viralen Vorläuferproteinen eine Region mit basischem Charakter, die eine proteolytische Spaltstelle determiniert. Nach der Spaltung durch spezifische

Proteasen ist das räumlich und strukturell flexible Fusionspeptid am *N*-Terminus des zumeist an der Membran verknüpften *C*-terminalen Spaltprodukts lokalisiert. Im Verlauf einer viralen Infektion inseriert das Fusionspeptid in die Membran der zu infizierenden Zelle, destabilisiert diese und ermöglicht damit die Fusion mit der Membran des Viruspartikels und letztlich die Infektion (Weissenhorn, W. *et al.*, 1999; Pecheur, E. I. *et al.*, 1999).

In seiner zentralen Region zeigt das Prionprotein deutliche Sequenzhomologien zu viralen Fusionsproteinen. *N*-terminal der zellulären Spaltstelle von PrP<sup>c</sup> findet sich eine Anhäufung basischer Aminosäuren wie Lysin und Histidin und *C*-terminal der Spaltstelle ein 24 Aminosäuren umfassender hydrophober Bereich mit einer Akkumulation kleiner unpolarer Aminosäuren wie Glycin und Alanin. Nach der Spaltung findet sich die hydrophobe Region des Prionproteins in Analogie zu den Fusionspeptiden am *N*-Terminus des *C*-terminalen Spaltprodukts welches über seinen GPI-Anker an der Zellmembran verknüpft bleibt. Eine weitere Homologie zwischen Fusionspeptiden und der hydrophoben Region von PrP<sup>c</sup> ist die für Fusionspeptide mehrfach experimentell gezeigte strukturelle und räumliche Flexibilität (White, J. M., 1992). Diese basiert vermutlich auf der außergewöhnlichen Aminosäurezusammensetzung mit einer gleichzeitigen Anhäufung von Alaninen, die bevorzugt in  $\alpha$ -helikalen Strukturen zu finden sind und Glycinen, die vorwiegend in  $\beta$ -Schleifen von Proteinen lokalisiert sind (Chakrabarty A. *et al.*, 1991; Kyte, J., 1995). Eine derartige strukturelle Flexibilität liegt auch der Funktionsweise aktiver Zentren von Serpinen (Serin Protease Inhibitoren) zugrunde (Lawrence, D. A., 1997), die eine den Fusionspeptiden ähnliche Aminosäurezusammensetzung aufweisen (Callebaut, I. *et al.*, 1994). Auch der *N*-Terminus des Prionproteins einschließlich eines Teils der zentralen Region des Proteins (Aminosäuren 23 bis 120) zeichnet sich durch eine starke strukturelle Flexibilität aus (Riek, R. *et al.*, 1997). Interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, daß die hydrophobe Region des Prionproteins auch für die Umfaltung von PrP<sup>c</sup> in die pathogene Isoform PrP<sup>Sc</sup> von entscheidender Bedeutung zu sein scheint, da die Deletion dieses Bereichs (Aminosäuren 114 bis 121) die Umfaltung inhibiert (Hölscher, C. *et al.*, 1998). Weitere im Einklang mit der Hypothese von Callebaut *et al.* stehende Erkenntnisse basieren auf verschiedenen Untersuchungen mit unterschiedlichen aus der Aminosäuresequenz des Prionproteins definierten Peptiden. So wirkt ein sowohl einen Teil der basischen als auch einen Teil der hydrophoben Region umfassendes Peptid (huPrP106-126) toxisch auf kultivierte cerebrale Neuronen wohingegen ein Peptid mit gleicher Aminosäurezusammensetzung jedoch zufälliger Reihenfolge keine derartige Toxizität aufweist (Forloni, G. *et al.*, 1993). Weiterhin wurde gezeigt, daß ein nahezu die gesamte hydrophobe Region umfassendes Peptid (huPrP118-135) Lipidvesikel destabilisiert und die liposomale Fusion stimuliert (Pillot, T. *et al.*, 1997).

## 7.2.2 Charakterisierung der Spaltstelle im zentralen Bereich des Prionproteins

Die bekannten Befunde weisen auf eine grundlegende Bedeutung der zellulären Spaltung des Prionproteins für die Funktion von PrP<sup>c</sup> oder auch die Pathologie von PrP<sup>Sc</sup> hin. Zur Erlangung genauere Erkenntnisse bezüglich der proteolytischen Spaltung des Proteins wurden daher verschiedene Aminosäuresequenzveränderungen in der zentralen Region des Proteins vorgenommen und deren Wirkungen auf die Spaltungseffizienz in die Konstrukte überexprimierenden N2a-Zellen untersucht. Zur Unterscheidung der PrP-Konstrukte von endogen in den Zellen exprimiertem PrP<sup>c</sup> wurden die Mutanten mit einem Hamster-spezifischen C-terminalen Epitop markiert. Diese Markierung durch den Austausch von Isoleucin an der Position 138 gegen Methionin hatte keinerlei Auswirkungen auf den Metabolismus des Proteins. Durch Immunfluoreszenzmikroskopie wurde die vorwiegende Lokalisation des Proteins an der Zelloberfläche gezeigt und durch *Western Blot-Analysen* die korrekte posttranslationale Prozessierung. Auch bezüglich der proteolytischen Spaltung des mit dem 13A5 Epitop markierten Proteins ergaben sich keinerlei Unterschiede zum unmarkierten murinen PrP<sup>c</sup>. Als einziger Effekt der eingeführten Aminosäuresequenzveränderung ist in der Literatur die Inhibition der Konversion zu PrP<sup>Sc</sup> in Scrapie-infizierten murinen Neuroblastomazellen belegt (Priola, S. A. und Chesebro, B., 1995), was auf die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen keinen Einfluß hatte.

Da die Determination proteolytischer Spaltstellen häufig durch basische Reste erfolgt und die Akkumulation von basischen Aminosäuren N-terminal der hydrophoben Region des Prionproteins in Analogie zur Spaltstelle verschiedener viraler Oberflächenvorläuferproteine auf eine Bedeutung dieser Aminosäuren hinwies, wurden zunächst verschiedene Veränderungen in diesem Bereich vorgenommen. Da einzelne Austausche basischer Aminosäuren im Bereich von Fusionspeptiden, wie am Beispiel der HIV Typ1 Oberflächenglykoprotein-vorläufers gp160 gezeigt ist, nicht immer Auswirkungen auf die Spaltungseffizienz haben (Freed, E. O. *et al.*, 1989; Dubay, J. W. *et al.*, 1995), multiple Austausche in der gleichen Region jedoch durchaus Auswirkungen zeigen (McCune, J. M. *et al.*, 1988) wurden sowohl einzelne als auch multiple Austausche vorgenommen. Wie durch *Western Blot-Analysen* dargestellt, waren alle erzeugten Konstrukte mit Änderungen im hochkonservierten basischen Bereich in N2a-Zellen gut überzuexprimieren und lagen in verschiedenen Glykosylierungsstufen vor. Da in den Konstrukten 3S105 und 5S100 ein zusätzliches Glykosylierungssignal eingeführt worden war zeigten diese ein entsprechend von der Wildtyp-Kontrolle abweichendes Glykosylierungsmuster. Durch Immunfluoreszenzmikroskopie ließ sich für alle PrP-Mutanten die für PrP typische vorwiegende Lokalisation an der Zelloberfläche nachweisen. Diese



Beobachtungen ergaben keinerlei Hinweis auf eine generell veränderte Prozessierung der Mutanten oder einen vom murinen Wildtyp-PrP<sup>c</sup> abweichenden Metabolismus bis zum Erreichen der Zelloberfläche. Die Analyse der proteolytischen Spaltung der Konstrukte über die Quantifizierung des 18 kDa Spaltprodukts führte hingegen zu vom Wildtyp abweichenden Ergebnissen. Die Austausche einzelner basischer Aminosäuren gegen Glycin an den Positionen -1, -2 und -6 bezüglich der Spaltstelle (Konstrukte H110G, K109G und K105G) führten jeweils zur deutlichen Reduktion an detektierbarem Spaltprodukt. Der stärkste Effekt wurde durch den Austausch des direkt der Spaltstelle benachbarten Histidins verursacht. Der Austausch aller drei basischen Aminosäuren gegen Glycin gleichzeitig (Konstrukt 3G105) führte ebenfalls zu einer Inhibition der Spaltung, zeigte jedoch einen weniger starken Effekt als zwei der genannten Einzelmutationen. Aus diesen Beobachtungen ließ sich schlußfolgern, daß die drei an den Positionen -1, -2 und -6 bezüglich der Spaltstelle lokalisierten basischen Aminosäuren für die Determination der Spaltstelle von großer Bedeutung sind. Überraschend war allerdings die Feststellung, daß die verschiedenen Mutationen sich im multiplen Konstrukt nicht gegenseitig verstärkt oder zumindest die stärkste Hemmung der Spaltung gezeigt hatten. Aus den Analysen der verschiedenen multiplen Austausche basischer Aminosäuren gegen Serin ergaben sich abweichende Schlußfolgerungen. Sowohl die Austausche von jeweils drei basischen Aminosäuren gegen die unpolare aber strukturell sehr ähnliche Aminosäure Serin an den Positionen -6, -8 und -11 beziehungsweise -1, -2 und -6 in Bezug auf die Spaltstelle (Konstrukte 3S100 und 3S105) als auch der Austausch aller fünf polaren Aminosäuren an den Positionen -1, -2, -6, -8 und -11 (Konstrukt 5S100) bewirkten nur eine schwache bis mäßige Hemmung der zellulären Spaltung. Die stärkste Inhibition war bei Austauschen an den Positionen -1, -2 und -6 (Konstrukt 3S105) festzustellen. Allerdings wurde diese Mutante deutlich besser gespalten als das Konstrukt mit Austauschen gegen Glycin an den gleichen Positionen (Konstrukt 3G105). Die die basischen Aminosäuren an den Positionen -1, -2 und -6 beinhaltende Deletion von sechs Aminosäuren führte nur zu einer mäßigen Hemmung der Spaltung (Konstrukt  $\Delta$ 105-110). Hier gelangten allerdings die ursprünglich -8 und -11 lokalisierten basischen Reste in direkte Nähe zur Spaltstelle was die beobachteten Resultate beeinflussen haben könnte. Bei einer vergleichenden Betrachtung der Daten zeigte sich in allen Fällen der Substitution oder Entfernung basischer Aminosäuren ein negativer Effekt auf die Spaltbarkeit des jeweiligen Konstrukts, dessen Stärke allerdings von der jeweils eingeführten Aminosäure abhängig war. Folglich scheint es sich bei den beobachteten Auswirkungen nicht ausschließlich um durch die Entfernung der Basizität ausgelöste Effekte gehandelt zu haben. Hier könnten auch strukturelle Veränderungen innerhalb der mutierten Proteine, die zur Unzugänglichkeit der Konstrukte für das prozessierende Protein geführt haben ursächlich gewesen sein. Dies wäre auch eine Erklärung dafür, daß Austausche gegen die kleine stark hydrophobe Aminosäure Glycin stärkere inhibitorische Wirkung hatten als

Austausche gegen die größere, aufgrund seiner aliphatischen Hydroxylgruppe weniger hydrophobe Aminosäure Serin. Eine Beeinflussung der proteolytischen Spaltung von Oberflächenvorläuferproteinen durch strukturelle Veränderungen der Spaltstelle ist auch in der Literatur belegt. Beispielsweise führt der Austausch einer basischen Aminosäure gegen einen anderen basischen Rest an der Spaltstelle des murinen Leukemia Virus zu einer fast vollständigen Inhibition der Spaltung (Freed, E. O. und Risser, R., 1987). Die Einführung einer zusätzlichen Glykosylierungsstelle an Position -4 und somit in direkter Nähe zur Spaltstelle des Prionproteins (Konstrukte 3S105 und 5S100) hatte demgegenüber keinen meßbaren Einfluß auf die Spaltbarkeit der entsprechenden Proteine. Diese Erkenntnis könnte zur Annahme führen, daß ausschließlich nicht oder nicht vollständig glykosyliertes Prionprotein der zellulären Spaltung unterläge. Da aber bei Detektion nicht deglykosylierten Prionproteins mit C-terminalen Antikörpern zweifach glykosyliertes Spaltprodukt in erheblichen Mengen nachweisbar ist, wurde diese Möglichkeit ausgeschlossen. Anhand des Molekulargewichts des C-terminalen Spaltprodukts wurde bei allen analysierten Konstrukten davon ausgegangen, daß die beobachtete Spaltung an der exakten Position (Codon 110 oder 111) der natürlichen Spaltstelle des Prionproteins stattfindet. Eine durch die eingeführten Mutationen bewirkte abweichende Position der Spaltung, wie sie durch Substitution einer basischen Aminosäure beim Masern Virus Vorläuferprotein gezeigt ist (Alkhatib, G. *et al.*, 1994) kann jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden. Hierzu bedürfte es der N-terminalen Sequenzierung der jeweiligen Spaltprodukte.

Zur weiteren Charakterisierung der zentralen Spaltstelle des Prionproteins wurden verschiedene Aminosäuresequenzveränderungen im hydrophoben Bereich des Proteins vorgenommen. Daß auch Aminosäuren C-terminal proteolytischer Spaltstellen diese determinieren können ist in der Literatur beispielsweise am Influenza Virus gezeigt (Horimoto, T. und Kawaoka, Y., 1995), wurde bislang allerdings eher selten beobachtet. Wie durch *Western Blot*-Untersuchungen belegt ließen sich abgesehen von dem Konstrukt mit insgesamt acht Austauschen von Alaninen oder Glycinen gegen Isoleucine an den Positionen +2 bis +9 (Konstrukt AG/I) alle Mutanten in N2a-Zellen exprimieren. Zum Teil ergaben sich jedoch deutliche Unterschiede im Expressionslevel einiger mutierter Prionproteine. So führten Austausche kleiner hydrophober Reste gegen Isoleucin generell zu einer deutlich verminderten Expressionsrate (Konstrukte A/I und G/I). Die Ursache dafür könnte in einem prinzipiell fehlgeleiteten Metabolismus dieser Prionprotein-Konstrukte zu sehen sein. Sowohl Austausche an den Positionen +3 und +8 (Konstrukt G/I) als auch Austausche an den Positionen +2, +4 bis +7 und +9 (Konstrukt A/I) zeigten ein ungewöhnliches Glykosylierungsmuster und weiterhin eine nicht der Wildtyp-Kontrolle entsprechende Lokalisation innerhalb der Zelle. Alle anderen Aminosäureaustausche in der hydrophoben Region führten, wie durch *Western Blot*-Analysen und Immunfluoreszenzmikroskopie gezeigt wurde, weder zu einer Veränderung des Glykosylierungsmusters noch zu einer

veränderten Lokalisation der Proteine. Folglich ergaben sich keinerlei Hinweise auf eine inkorrekte Prozessierung der Mehrzahl der mutierten Prionproteine. Die Analyse der zellulären Spaltung der verschiedenen Prionprotein-Mutanten, die über Quantifizierung des 18 kDa Spaltprodukts erfolgte, ergab hingegen zum Teil deutliche Unterschiede in der Spaltungseffizienz verschiedener Konstrukte. Austausch des an Position +1 der Spaltstelle lokalisierten Valins gegen Glycin oder Isoleucin (Konstrukte V111G und V111I) bewirkten eine Inhibition der Spaltung, was auf eine mögliche Beteiligung dieser Aminosäure an der Determination der Spaltstelle hinwies. Obwohl der Austausch Valin gegen Isoleucin keine entscheidende Veränderung der Proteinstruktur zur Folge haben sollte (Bordo, D. und Argos, P., 1991), ergab sich hier eine signifikante Verringerung der Spaltungseffizienz. Das im Prionprotein des Menschen und einiger anderer Spezies an gleicher Position vorliegende Methionin hingegen scheint die Spaltbarkeit dieser Proteine nicht zu beeinflussen. Ob dies auch im murinen Sequenzkontext der Fall wäre, ist nicht geklärt. Die Substitution des Valins des murinen Prionproteins durch Glycin ergab einen deutlich ausgeprägteren negativen Effekt auf die proteolytische Spaltung als der Austausch gegen Isoleucin. Dies könnte auf stärkere strukturelle Veränderungen durch die Einführung der kleinen aliphatischen Aminosäure Glycin im Bereich der Spaltstelle zurückzuführen sein (Bordo, D. und Argos, P., 1991). Die Austausche in der an Alaninen und Glycinen reichen Region (Aminosäuren 112 bis 119) ließen keine eindeutigen Schlüsse bezüglich der Determination der Spaltstelle zu. Der Austausch von zwei Glycinen an den Positionen +3 und +8 nach Alanin (Konstrukt G/A) führte zu einer nicht signifikanten aber als deutlichen Trend erkennbaren Steigerung der Spaltaktivität. Der Austausch von sechs Alaninen an den Positionen +2, +4 bis +7 und +9 gegen Glycine hingegen (Konstrukt A/G) führte zu einer nahezu vollständigen Inhibition der Spaltung. Wurden jeweils nur zwei Alanine in der gleichen Region gegen Glycine an den Positionen +2 und +4, +5 und +6 oder +7 und +9 ersetzt (Konstrukte A112/114G, A115/116G und A117/119G), zeigte sich wenn nur ein geringfügig negativer Effekt auf die Spaltbarkeit des Prionproteins. Hierbei war die stärkste Auswirkung bei Substitutionen an den Positionen +2 und +4 zu beobachten. Diese Feststellungen weisen darauf hin, daß der Inhibition der Spaltung im Konstrukt A/G kein aminosäuresequenzspezifischer Effekt zugrunde liegt, sondern eher eine strukturelle Veränderung des Proteins im Bereich der Spaltstelle, die dazu führt, daß die Spaltstelle für die verantwortliche Protease nicht mehr zugänglich ist. Dementgegen steht der Befund, daß der *N*-Terminus des Prionproteins räumlich sehr flexibel und unstrukturiert ist (Riek, R. *et al.*, 1997; Donne, D. G. *et al.*, 1997). Neuere Untersuchungen haben jedoch Hinweise dafür geliefert, daß das Motiv AGAAAGA metastabil in mehreren unterschiedlichen Sekundärstrukturen vorliegen kann (Liu, H. *et al.*, 1999). Aminosäuresubstitutionen in diesem Bereich könnten folglich zur Bevorzugung der einen oder anderen Struktur führen und damit auch die Erkennung der Spaltstelle durch die Protease

strukturbedingt

beeinflussen. Da Anhäufungen von Alanin-Resten eine deutliche Tendenz zur Ausbildung  $\alpha$ -helikaler Strukturen bewirken wohingegen Glycine bevorzugt in  $\beta$ -Schleifen auftreten (Chakrabarty A. *et al.*, 1991), ist eine umfangreiche strukturelle Veränderung durch den Austausch von sechs Alaninen gegen Glycine sehr wahrscheinlich. Die beobachtete Inhibition der Spaltung durch im gleichen Bereich eingeführte Isoleucin-Reste (Konstrukte G/I und A/I) kann für die Analyse der Bedeutung dieser Region für die proteolytische Spaltung nicht herangezogen werden, da die entsprechenden Proteinkonstrukte einem offenbar grundsätzlich fehlgeleiteten Metabolismus unterlegen waren. Da davon ausgegangen wird, daß die Spaltung des Prionproteins erst nach der Wiederaufnahme ins Zellinnere, mutmaßlich innerhalb von Endosomen stattfindet (Shyng, S. L. *et al.*, 1993) ist eine Inhibition der Spaltung bei diesen Konstrukten zu fordern, da sie nicht an die Zelloberfläche gelangen und damit auch der Spaltung nicht zugänglich sind. Die Auswirkungen der eingeführten humanpathogenen Mutation (Windl, O. und Kretzschmar, H.-A., 2000) an Position +6 bezüglich der Spaltstelle (Konstrukt A116V) lieferten nur einen sehr vagen Hinweis auf eine mögliche Beteiligung der proteolytischen Spaltung des Prionproteins auf die Ausprägung der durch diese Mutation bedingten Prionerkrankung. Die festgestellte mäßige Inhibition der Spaltung erwies sich jedoch als signifikant. Ob hier ein direkter Zusammenhang besteht bleibt zu prüfen. Die Inhibition der Spaltung durch Deletionen in der hydrophoben Region des Proteins deutete eine Funktion dieser Domäne bei der Determination der Spaltstelle zwar an, allerdings sollte auch hier nicht außer Acht gelassen werden, daß die eingeführten Modifikationen zu deutlichen Veränderungen der Proteinstruktur geführt haben dürften. Dennoch deutet der Vergleich der Spaltungseffizienzen der verschiedenen Deletions-Mutanten (Konstrukte  $\Delta 112-119$ ,  $\Delta 111-125$  und  $\Delta 105-125$ ), die eine ähnlich starke Hemmung der Spaltung zeigten an, daß insbesondere die an kleinen hydrophoben Aminosäuren reiche Region für die Spaltung des Prionproteins von Bedeutung zu sein scheint.

Insgesamt lassen die ermittelten Daten keine sicheren Rückschlüsse bezüglich der Determination der zentralen Spaltstelle durch einzelne Aminosäuren zu. Zwar hatten Veränderungen in der basischen Region des Proteins Einflüsse auf die Spaltung, aber gleichzeitig ergaben sich auch Hinweise darauf, daß nicht die Basizität der Reste allein hierfür entscheidend war. Auch viele Mutationen im hydrophoben Teil des Proteins zeigten Einflüsse auf die proteolytische Spaltung. Allerdings bleibt zu bedenken, daß hier ausschließlich umfangreiche Aminosäuresequenzveränderungen beziehungsweise Deletionen Wirkung zeigten. Dies ist als Hinweis dafür anzusehen, daß die beobachteten Effekte eher allgemein struktureller als spezifischer Natur sind. Die Ausprägung definierter Sekundärstrukturen in diesem unstrukturierten Bereich des Prionproteins durch verschiedene Mutationen könnte die ermittelten Daten begründen.

Ein interessanter Aspekt der ermittelten Ergebnisse ist die Tatsache, daß ausgeprägte Aminosäuresequenzveränderungen im hydrophoben Bereich von PrP<sup>c</sup>

die Spaltung deutlicher beeinflussen als Sequenzveränderungen in der basischen Region, eine Feststellung, die nicht im Einklang mit zahlreichen Untersuchungen bezüglich der Spaltung viraler Oberflächenvorläuferproteine steht, bei denen die Spaltstelle vorwiegend durch *N*-terminal der Spaltstelle lokalisierte basische Reste determiniert wird (Freed, E. O. und Risser, R., 1987; McCune, J. M. *et al.*, 1988; Hindiyeh, M. *et al.*, 1999) und Austausch im hydrophoben Bereich wenig Auswirkungen auf die Spaltungseffizienz haben (Delahunty, M. D. *et al.*, 1996). Auch auf die Spaltung der viralen Vorläuferproteinen der Fusionspeptide sowohl strukturell als auch auf Basis der Aminosäuresequenz homologen Serpine haben Austausch im hydrophoben Bereich keinen Einfluß (Hopkins, P. C. *et al.*, 1993). Dennoch kann eine diesen Proteinen homologe Funktion des Prionproteins und seiner Spaltprodukte nicht ausgeschlossen werden. Inwieweit die Spaltung des Prionproteins mit dem Vorkommen nachgewiesener transmembraner PrP<sup>c</sup>-Formen (Hegde, R. S. *et al.*, 1998; Hegde, R. S. *et al.*, 1998) in Zusammenhang steht, ist unklar. Der Einfluß von Mutationen in der hydrophoben Region des Proteins könnte auf einen derartigen Zusammenhang hindeuten, da die hochkonservierte zentrale Region bei diesen je nach Orientierung als Ctm und Ntm bezeichneten transmembranen Formen des Proteins als transmembrane Domäne identifiziert wurde. Ein weiterer Hinweis ergibt sich aus der Inhibition der Spaltung durch Einführung der humanpathogenen Aminosäuresubstitution A116V. Diese Mutation bewirkt neben der in dieser Arbeit festgestellten moderaten Inhibition der Spaltung ein vermehrtes Auftreten von CtmPrP<sup>c</sup> (Hegde, R. S. *et al.*, 1999). Ob ein direkter Zusammenhang zwischen transmembraner Lokalisation, proteolytischer Spaltung und Ausprägung der Erkrankung besteht muß in zukünftige Untersuchungen gezeigt werden. Für die Beantwortung der zahlreichen offenen Fragen bezüglich der physiologischen Bedeutung und der Funktionsweise der proteolytischen Spaltung des Prionproteins wird die Identifikation der für diesen Prozeß verantwortlichen Protease, die hier in Anlehnung an die Nomenklatur der im Alzheimerfeld identifizierten Proteasen á- â- und ã-Sekretase (Haass, C., 1999) als  $\alpha$ -Priase ( $\alpha$ -PRIon ProteASE) bezeichnet werden soll, von entscheidender Bedeutung sein.

### **7.2.3 Einflüsse der eingeführten Aminosäuresequenzveränderungen auf die *N*-terminal lokalisierte Spaltung des Prionproteins**

Auch auf die Effizienz der zweiten weiter *N*-terminal stattfindende Spaltung des Prionproteins zeigten sich Einflüsse durch die eingeführten Mutationen. Die Quantifizierung des 20 kDa Spaltprodukts ergab, daß alle im basischen Bereich des Proteins eingeführten Veränderungen trotz der räumlichen Entfernung in der Primärstruktur zu signifikanten Abnahmen an detektierbarem Spaltprodukt führten. Ob die Inhibition der Spaltung des Proteins an dieser Stelle auf einer Strukturveränderung des Proteins basiert oder aber einen spezifischen Effekt darstellt, ist ungeklärt. Eine strukturelle Veränderung erscheint jedoch aufgrund

der Beobachtung, daß unterschiedliche Mutationen in diesem Bereich zu ähnlichen Auswirkungen führten, unwahrscheinlich. Zudem finden sich auch in der Literatur Hinweise darauf, daß in der Primärstruktur weiter entfernte basische Reste zur Determination einer Spaltstelle entscheidend beitragen können (Zavorotinskaya, T. und Albritton, L. M., 1999). Da der *N*-Terminus des Prionproteins flexibel und wenig strukturiert ist (Riek, R. *et al.*, 1997), kann eine zumindest zeitweise, möglicherweise durch die Bindung der Protease selbst bedingte räumliche Nähe der Spaltstelle zu den basischen Resten der zentralen Spaltstelle nicht ausgeschlossen werden.

Die Mehrzahl der in der hydrophoben Region des Prionproteins eingeführten, zum Teil umfangreichen Aminosäuresubstitutionen hatten keinerlei signifikante Auswirkung auf die Menge an detektierbarem 20 kDa Spaltprodukt. Austausch gegen Isoleucin führten zu einer Inhibition der Spaltung, was allerdings wie oben schon für die Spaltung im zentralen Bereich beschrieben auf einen generell fehlgesteuerten Metabolismus dieser Konstrukte zurückzuführen ist. Einen interessanten Befund stellt die festgestellte Reduktion an Spaltaktivität des Konstrukts A116V dar. Ob die Inhibition der Spaltung durch die der humanpathogenen Mutation A117V homologe Aminosäuresubstitution in direktem Zusammenhang mit der Ausprägung einer Prionerkrankung steht bleibt zu prüfen und die Beantwortung dieser Frage sollte Ziel zukünftiger Analysen sein. Deletionen im Bereich der hydrophoben Region führten zur fast vollständigen Inhibition der Spaltung, was eine wichtige Bedeutung dieses Bereichs für die zweite Spaltung des Prionproteins belegt.

Weitere Erkenntnisse zur zweiten proteolytischen Spaltung des Prionproteins könnten durch die genaue Lokalisation der Spaltung über Ansequenzierung des 20 kDa Spaltprodukts und die Einführung verschiedener Aminosäuresequenz-veränderungen in dieser Region gewonnen werden. Zudem wäre der Nachweis einer definierten Spaltung über die Detektion des dann zu erwartenden *N*-terminalen Spaltprodukts wünschenswert. Schließlich würde auch die Identifizierung der für die Spaltung verantwortlichen Protease, die hier in Analogie zur  $\alpha$ -Priase als  $\beta$ -Priase bezeichnet werden soll, wichtige Erkenntnisse liefern.

#### **7.2.4 Einflüsse der eingeführten Aminosäuresequenzveränderungen auf die Sensibilität der PrP<sup>c</sup>-Konstrukte gegenüber Proteinase K**

Ein interessanter Aspekt der Analyse der proteolytischen Spaltung in der zentralen Region des Prionproteins war die Tatsache, daß die Spaltung am Aminosäure-Rest 110 oder 111 den Protease-resistenten Kern von PrP<sup>S<sup>c</sup></sup> zerstört. Weiterhin schließt die die Spaltstelle beinhaltende hochkonservierte zentrale Region (AS 100-127) die sich aus den Aminosäuren 106 bis 126 des humanen PrP<sup>c</sup> zusammensetzende sogenannte neurotoxische Domäne des Prionproteins (AS 105-125) ein (Forloni,

G. *et al.*, 1993). Somit besteht auch die Möglichkeit, daß die Spaltung des zellulären Prionproteins eine Bedeutung für die Entstehung und Ausprägung von Prionerkrankungen hat. Um Hinweise auf eine derartige Bedeutung der Spaltung auf die Entstehung proteaseresistenten Prionproteins zu erhalten, wurden alle erzeugten Konstrukte einem Verdau mit Proteinase K unterworfen. Hierbei ergab sich, daß eine der eingeführten, die Spaltung inhibierenden Mutationen die Ausprägung von partieller Proteinase K Resistenz zur Folge hatte. Das Konstrukt A/G mit einem Austausch von sechs Alaninen gegen Glycine zeigte als einzige Mutante diesen Phänotyp. Bei dessen Bewertung bleiben jedoch einige Faktoren zu bedenken. So waren die hier gewählten Versuchsbedingungen deutlich milder, als die zur Detektion von PrP<sup>Sc</sup> in Hirnhomogenaten erkrankter Tiere und Menschen üblicherweise angewandten (Büeler, H. *et al.*, 1994). Milde Reaktionsbedingungen wurden jedoch auch schon zur Analyse verschiedener humanpathogener Mutationen herangezogen (Lehmann, S. und Harris, D. A., 1997; Singh, N. *et al.*, 1997; Priola, S. A. und Chesebro, B., 1998). Hier wurde gezeigt, daß verschiedene ins murine Prionprotein eingeführte humanpathogene Mutationen im eukaryontischen Expressionssystem eine Resistenz gegenüber Proteinase K nur bei geringen Konzentrationen des Enzyms aufweisen. Ob diese beobachtete partielle Resistenz gegenüber Proteinase K mit dem Vorliegen geringer Konzentrationen an PrP<sup>Sc</sup> gleichzusetzen ist oder einen Befund darstellt der nicht im Zusammenhang mit der Infektiosität steht, ist noch ungeklärt. Auch ob ein direkter oder indirekter Zusammenhang zwischen der Inhibition der Spaltung und dem Auftreten der Protease Resistenz besteht, ist bislang unklar, da andere die Spaltung fast vollständig inhibierende Mutationen wie  $\Delta 112-119$ ,  $\Delta 111-125$  und  $\Delta 105-125$  nicht zur Ausbildung einer Resistenz geführt haben. Bei diesen Mutationen bleibt jedoch zu bemerken, daß das Fehlen der Aminosäuren 114 bis 121 die Umfaltung des Prionproteins an sich zu inhibieren scheint (Hölscher, C. *et al.*, 1998). Auch die Inhibition der Spaltung durch in der hydrophoben eingefügte Isoleucin-Reste ist wegen der inkorrekten Metabolisierung dieser Konstrukte hier nicht in die Diskussion einzubeziehen. Über diese die Spaltung nahezu vollständig inhibierenden Mutationen hinaus bleiben die Mutationen mit einer moderaten Inhibition der Spaltung zu diskutieren. Hier fand sich in keinem Fall das Auftreten einer partiellen Proteinase K Resistenz. Generell kann folglich geschlossen werden, daß die fehlende Prozessierung des Proteins in dessen zentraler Region nicht im direkten Zusammenhang mit der Ausbildung der Resistenz gegenüber Proteinase K steht. Weiterhin belegt das Auftreten der Proteinase K Resistenz des A/G-Konstrukts, daß dies ein Effekt ist, der offenbar nicht allein auf humanpathogene Mutationen begrenzt ist. Und drittens zeigt sich hier erneut, daß Veränderungen in der zentralen Region des Prionproteins zu umfangreichen Veränderungen in Struktur oder Prozessierung der Proteine führten. Eine Schlußfolgerung, die auch durch Studien an verschiedenen anderen Mutationen in diesem Bereich des Proteins belegt werden kann (Muramoto, T. *et al.*, 1996; Hölscher, C. *et al.*, 1998; Hegde,

R. S. *et al.*, 1998). Allerdings sind diese Beobachtungen schwer mit den aus verschiedenen Strukturanalysen rekombinanten Prionproteins ermittelten Resultaten in Einklang zu bringen (Riek, R. *et al.*, 1997; Donne, D. G. *et al.*, 1997). Diese Studien definieren die *N*-terminale Hälfte des Prionproteins (moPrP(23-120) und SHaPrP(23-124)) als unstrukturiert und räumlich sehr flexibel. Während die *N*-terminal lokalisierte *octarepeat*-Region durch die Bindung von Kupfer strukturell stabilisiert zu werden scheint (Viles, J. H. *et al.*, 1999), wird für den *C*-terminalen Bereich der unstrukturierten *N*-terminalen Domäne keine reguläre Sekundärstruktur angenommen. Vielmehr ergaben genauere Strukturanalysen dieses Bereiches Hinweise auf die Möglichkeit der Ausbildung mehrerer verschiedener Konformationen speziell für die an Alaninen und Glycinen reiche hydrophobe Region (Liu, H. *et al.*, 1999). Daraus wurde eine Metastabilität dieser Region postulieren, die ihrerseits in direktem Zusammenhang mit der Umfaltung von PrP<sup>c</sup> zu PrP<sup>Sc</sup> stehen könnte. Der die partielle Proteinase K Resistenz bewirkende, in diesem Bereich eingeführte Austausch von Alaninen gegen Glycine könnte dieser Hypothese folgend zur Stabilisierung einer zumindest PrP<sup>Sc</sup> ähnlichen Struktur geführt haben. Ob dabei tatsächlich Infektiosität *de novo* in Zellkultur generiert wurde, werden bereits initiierte Infektionsstudien und geplante transgene Untersuchungen aufzeigen.

### 7.3 DER AUTOKATALYTISCHE CHARAKTER DER PROTEOLYTISCHEN SPALTUNG DES PRIONPROTEINS

Nach den umfangreichen Studien zur zentralen Spaltstelle des Prionproteins wurden im folgenden Teil der Arbeit Untersuchungen zu einer möglichen autokatalytischen Spaltaktivität des Prionproteins durchgeführt. Hinweise auf eine derartige Aktivität des Prionproteins ergaben sich aus der beobachteten Fragmentierung rekombinant hergestellten murinen Prionproteins unter den für NMR-spektroskopische Untersuchungen notwendigen Bedingungen (Hornemann, S. und Glockshuber, R., 1996; Hornemann, S. *et al.*, 1997). Vergleichende Untersuchungen der Primärstruktur des murinen Prionproteins und verschiedener Proteasen ergaben deutliche Aminosäuresequenzhomologien zwischen der strukturierten *C*-terminalen Domäne des Prionproteins und verschiedenen bakteriellen und eukaryontischen Signal-Peptidasen. Der Aminosäuresequenzvergleich zwischen den Resten 121 bis 217 des Prionproteins und der mutmaßlichen katalytisch aktiven Domäne der Signal-Peptidase der Ratte ergab eine etwa 23 %ige Aminosäuresequenzidentität und eine etwa 41 %ige Ähnlichkeit der Aminosäurezusammensetzung (Glockshuber, R. *et al.*, 1998). Die Signal-Peptidase der Ratte gehört einer Gruppe bakterieller und eukaryontischer Peptidasen an, deren aktives Zentrum sich aus Serin/Lysin oder Serin/Histidin zusammensetzt (Barrett, A. J. und Rawlings, N. D., 1995; Paetzel, M. und Dalbey, R. E., 1997). Mitglieder dieser Peptidase-Familie sind beispielsweise die an der SOS-Mutagenese beteiligte *E. coli* Peptidase umuD', das an der Kontrolle der



DNA-Reparatur beteiligte bakterielle LexA Protein sowie verschiedene weitere Signal-Peptidasen, die *N*-terminale Peptide von sekretorischen oder in Organellen lokalisierten Proteinen abspalten. Sowohl LexA als auch umuD' unterliegen einer Autokatalyse (Little, J. W., 1984). Die Mitglieder dieser Protein-Familie tragen in ihrem katalytischen Zentrum einen nukleophilen Serin-Rest und zur Erhöhung der Nukleophilie des Serins einen basischen Rest wie Lysin oder Histidin. In der *Pseudomonas* 7A Glutaminase-Asparaginase und im *Thermoplasma acidophilum* 20 S Proteasom ist das reaktive Serin durch ein Threonin ersetzt (Paetzel, M. und Dalbey, R. E., 1997). Die in Prionproteinen verschiedener Spezies hochkonservierten Reste Tyrosin 127 und Histidin 176, die sich in der dreidimensionalen Struktur des murinen Prionproteins in direkter räumlicher Nähe zueinander befinden und Wasserstoff-Brücken miteinander ausbilden können, könnten den das aktive Zentrum der Signal-Peptidasen bildenden Resten entsprechen. Das Serin wäre hier durch einen anderen hydroxylierten Rest (Tyr 127) ersetzt (Glockshuber, R. *et al.*, 1998).

Zur Überprüfung der von Glockshuber *et al.* aufgestellten Hypothese, daß die Reste Tyrosin 127 und Histidin 176 an der postulierten autokatalytische Spaltung des Prionproteins beteiligt sein könnten, wurden auf Basis des das 13A5 Epitop tragenden murinen Prionproteins verschiedene Mutanten mit Aminosäureaustauschen dieser Reste erzeugt, in N2a-Zellen überexprimiert und hinsichtlich ihrer Prozessierung untersucht. Im Konstrukt T127F wurde das Tyrosin durch Phenylalanin ersetzt und damit die für die Katalyse mutmaßlich entscheidende Hydroxylgruppe bei ansonsten identischer Struktur entfernt. In den Konstrukten Y127G und H176G wurden die entsprechenden Reste jeweils durch die kleine hydrophobe Aminosäure Glycin ersetzt. Wie durch *Western Blot*-Untersuchungen gezeigt ließen sich die verschiedenen Konstrukte in N2a-Zellen überexprimieren und es ergaben sich keinerlei Hinweise auf einen fehlerhaften Metabolismus. Die Analyse der proteolytischen Spaltung der verschiedenen PrP-Konstrukte durch Quantifizierung des 18 kDa Spaltprodukts zeigte auf, daß die eingeführten Aminosäuresubstitutionen keinen Einfluß auf die proteolytische Prozessierung hatten. Somit wurde die Hypothese, die Spaltung des Prionproteins könne ein autokatalytischer Prozeß sein und die Aminosäuren Tyrosin 127 und Histidin 176 stellten wichtige Reste des für diesen Prozeß verantwortlichen katalytischen Zentrums dar, experimentell unter der Annahme eines intramolekularen Vorganges widerlegt. Zu vergleichbaren Resultaten gelangte auch eine andere Gruppe, die den Metabolismus entsprechender Mutanten des murinen Prionproteins in humanen Neuroblastomzellen untersucht hatte (Sumudhu, W. *et al.*, 1999). Dennoch bleibt die festgestellte Homologie des Prionproteins zu verschiedenen Signal-Peptidasen ein interessanter Ansatz und könnte für die Aufklärung der bislang nicht bekannten Funktion des Prionproteins von Bedeutung sein. Möglicherweise hat das Prionprotein proteolytische Aktivität gegenüber einem bislang nicht bekannten Substrat. Mit Untersuchungen verschiedener chromogener Protease-Substrate spezifisch für Trypsin-,

Chymotrypsin- und Elastase-ähnliche Proteasen war eine proteolytische Aktivität von PrP<sup>c</sup> bislang jedoch nicht nachweisbar (Glockshuber, R. *et al.*, 1998). Da die zur Überexpression der Mutanten verwendete Zelllinie eine geringe endogene PrP-Expression zeigt, bleibt auch die Möglichkeit, daß PrP<sup>c</sup> zwar nicht intramolekular aber möglicherweise intermolekular sein eigenes Substrat darstellt.

#### 7.4 DIE BIOLOGISCHE FUNKTION DER ZELLULÄREN SPALTUNG DES PRIONPROTEINS

Im letzten Teil der Arbeit wurden verschiedene Untersuchungen zur möglichen physiologischen Funktion der Spaltung des Prionproteins durchgeführt. Da aufgrund der bisher dargestellten Befunde davon auszugehen war, daß die Spaltung von PrP<sup>c</sup> einen in allen Spezies ablaufenden regulierten Prozeß darstellt, lag eine biologische Bedeutung dieses Vorganges für die bislang nicht aufgeklärte Funktion des Proteins nahe. Postuliert und durch verschiedene Daten gestützt wird eine Rolle des Prionproteins beim Kupfermetabolismus und dadurch bedingt im Stoffwechsel von Sauerstoffradikalen. Die Bindung von Kupfer an PrP<sup>c</sup> ist nachgewiesen und die *N*-terminale Histidin-haltige *octarepeat*-Region als Bindungsstelle lokalisiert (Hornshaw, M. P. *et al.*, 1995). Weiterhin ist bekannt, daß Gehirne von *Prn-p*<sup>0/0</sup>-Mäusen weniger membrangebundenes Kupfer enthalten als Gehirne von *Prn-p*<sup>+/+</sup>-Mäusen (Brown, D. R. *et al.*, 1997) und daß kultivierte Neurone von *Prn-p*<sup>0/0</sup>-Mäusen durch eine verringerte Aktivität der kupferabhängigen Superoxiddismutase (Brown, D. R. *et al.*, 1997) oder durch eine erhöhte Konzentration an freiem Kupfer (Brown, D. R. *et al.*, 1998) empfindlicher auf oxidativen Streß reagieren. Zellbiologische Studien belegen, daß die Endozytose ungespaltenen Prionproteins durch Kupfer-Bindung stimuliert wird (Pauly, P. C. und Harris, D. A., 1998) wohingegen das zur Kupfer-Bindung nicht fähige *C*-terminale Produkt der zellulären Spaltung nur langsam wieder in die Zelle aufgenommen wird (Shyng, S.-L. *et al.*, 1995). Faßt man diese Erkenntnisse zusammen liegt die Vermutung nahe, daß das Prionprotein zentraler Bestandteil eines Kupfertransportsystems zur Aufnahme von Kupfer in die Zelle ist und die zelluläre Spaltung möglicherweise zur Regulation dieses Transportes dient. Um die Frage nach einem direkten Zusammenhang zwischen der vermuteten Funktion des Prionproteins im Kupfer-Metabolismus und der zellulären Spaltung des Proteins zu beantworten, wurde der Einfluß der Cu<sup>2+</sup>-Bindung auf die Spaltung des Prionproteins untersucht. In *in vitro* Studien wurde mikrobiell erzeugtes Prionprotein (moPrP23-231) in Anwesenheit freien oder gebundenen Kupfers in der zentralen Region unter Bildung der entsprechenden Spaltprodukte gespalten. In Abwesenheit von Kupfer war dieser Effekt nicht zu beobachten, was einen Kausalzusammenhang zwischen Kupfer-Bindung und proteolytischer Spaltung nahe legte. *In vivo* Untersuchungen der Spaltung von durch Aminosäuresequenzveränderungen in der *octarepeat*-Region nicht mehr zur Kupfer-Bindung fähigen Prionprotein-Konstrukten ergaben hingegen keine

eindeutigen Hinweise auf einen derartigen Zusammenhang. Eine mögliche Ursache für diese unterschiedlichen Resultate ist die Beteiligung von einem oder mehreren weiteren Faktoren am Prozeß der postulierten Regulation der proteolytischen Spaltung durch Kupfer-Ionen. So ist denkbar, daß die für die Spaltung verantwortliche postulierte  $\alpha$ -Priase eine von Kupfer abhängige Metalloprotease ist und die Spaltung des Prionproteins über die Affinität dieses Enzyms zu Kupfer-Ionen reguliert wird. Hinweise auf eine Abhängigkeit der Spaltung von Kupfer-Ionen finden sich auch in der Literatur (Jimenez-Huete, A. *et al.*, 1998). Eine andere Möglichkeit ist die Regulation der Expression der  $\alpha$ -Priase über die Kupfer-Konzentration. In beiden Fällen könnte eine erhöhte Kupfer-Konzentration zu einer verstärkten proteolytischen Spaltung des Prionproteins und damit letztlich einem verringerten Transport von Kupfer ins Innere der Zelle führen. Zur Aufklärung derartiger Mechanismen wird die Identifikation und Isolation der  $\alpha$ -Priase von entscheidender Bedeutung sein.

Neben dieser denkbaren Rolle der zellulären Spaltung als Regulator der physiologischen Funktion des Prionproteins ist auch eine physiologische Bedeutung der beiden Spaltprodukte selbst nicht ausgeschlossen. Das *N*-terminale Spaltprodukt von etwa neun Kilodalton könnte beispielsweise einen biologisch aktiven Liganden mit Signalfunktion darstellen. Die mögliche Rolle des *C*-terminalen Spaltprodukts bei der Zell-Zell-Interaktion oder der Membranfusion wurde bereits diskutiert (Callebaut, I. *et al.*, 1994). Es ist auch nicht ausgeschlossen, daß die zelluläre Spaltung des Prionproteins einen frühen Schritt bei der Degradation des Proteins im Verlauf seines normalen Katabolismus darstellt. Um genaueren Analysen bezüglich der Funktion der Spaltprodukte zu erlauben, wurden innerhalb der vorliegenden Arbeit sowohl das *N*- als auch das *C*-terminale Spaltprodukt in unterschiedlichen Systemen erfolgreich überexprimiert. Damit ist die Grundlage für zukünftige funktionelle Analysen der Spaltprodukte gelegt.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

**Alkhatib, G., Roder, J., Richardson, C., Briedis, D., Weinberg, R., Smith, D., Taylor, J., Paoletti, E. und Shen, S. H.** Characterisation of a cleavage mutant of the measles virus fusion protein defective in syncytium formation. *Journal of Virology* 68, 6770-6774. 1994.

**Alper, T, Haig, D. A. und Clarke, M. C.** The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 22, 278-284. 1966.

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

**Anderson, R. G. W.** Plasmalemmal caveolae and GPI-anchored membrane proteins. *Current Opinion in Cell Biology* 5, 647-652. 1993.

**Ansorge, W., Sproat, B, Stegemann, J., Schwager, C. und Zenke, M.** Automated DNA sequencing: ultrasensitive detection of fluorescent bands during electrophoresis. *Nucleic Acids Research*. 15, 4539-4602. 1987.

**Barrett, A. J. und Rawlings, N. D.** Families and clans of serine peptidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 318, 247-250. 1995.

**Barry, R. A. und Prusiner, S. B.** Monoclonal antibodies to the cellular and scrapie prion proteins. *Journal of Infectious Diseases* 154, 518-521. 1986.

**Bartz, J. C., McKenzie, D. I., Bessen, R. A., Marsh, R. F. und Aiken, J. M.** Transmissible mink encephalopathy species barrier effect between ferret and mink: PrP gene and protein analysis. *Journal of General Virology* 75, 2947-2953. 1994.

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

**Behrens, C.** Charakterisierung von PrP-Mutanten. Diplomarbeit, Institut für Neuropathologie, Georg-August-Universität zu Göttingen, 1998

**Birnboim, H. C. und Doly, J. A.** rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7, 1513-1522. 1979.

**Borchelt, D. R., Rogers, M., Stahl, N., Telling, G. und Prusiner, S. B.** Release of the cellular prion protein from cultured cells after loss of its glycoinositol phospholipid anchor. *Glycobiology* 3, 319-330. 1993.

**Bordo, D. und Argos, P.** Suggestions for "save" residue substitutions in site-directed mutagenesis. *Journal of Molecular Biology* 217, 721-729. 1991.

**Bradley, R.** An overview of the BSE epidemic in the UK. 65-72. 1998. Basil, Karger.

**Brandner, S., Isenmann, S., Raeber, A., Fischer, M., Sailer, A., Kobayashi, Y., Marino, S., Weissmann, C. und Aguzzi, A.** Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature (London)* 379, 339-343. 1996a.

**Brandner, S., Raeber, A., Sailer, A., Blättler, T., Fischer, M., Weissmann, C. und Aguzzi, A.** Normal host prion protein (PrP<sup>C</sup>) is required for scrapie spread within the central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 93, 13148-13151. 1996b.

**Brown, D. R., Schmidt, B. und Kretzschmar, H. A.** A neurotoxic prion protein fragment enhances proliferation of microglia but not astrocytes in culture. *Glia* 18, 59-67. 1996.

**Brown, D. R., Qin, K., Herms, J. W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D. und Kretzschmar, H.** The cellular prion protein binds copper *in vivo*. *Nature (London)* 390, 684-687. 1997a.

**Brown, D. R., Schulz-Schaeffer, W. J., Schmidt, B. und Kretzschmar, H. A.** Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Experimental Neurology* 146, 104-112. 1997b.

**Brown, D. R., Besinger, A., Herms, J. W. und Kretzschmar, H. A.** Microglial expression of the prion protein. *Neuroreport* 9, 1425-1429. 1998a.

**Brown, D. R., Schmidt, B. und Kretzschmar, H. A.** Effects of copper on survival of prion protein knockout neurons and glia. *Journal of Neurochemistry* 70, 1686-1693. 1998b.

**Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardie, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H. und Bostock, C. J.** Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature (London)* 398, 489-501. 1997.

**Butler, D. A., Scott, M. R. D., Bockman, J. M., Borchelt, D. R., Taraboulos, A., Hsiao, K. K., Kingsbury, D. T. und Prusiner, S. B.** Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins. *Journal of Virology* 62, 1558-1564. 1988.

**Büeler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H.-P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Aguet, M. und Weissmann, C.** Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature (London)* 356, 577-582. 1992.

**Büeler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M. und Weissmann, C.** Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73, 1339-1348. 1993.

**Büeler, H., Raeber, A., Sailer, A., Fischer, M., Aguzzi, A. und Weissmann, C.** High prion and PrP<sup>Sc</sup> levels but delayed onset of disease in scrapie-

inoculated mice heterozygous for a disrupted PrP gene. *Molecular Medicine* 1, 19-30. 1994.

**Callebaut, I., Tasso, A., Brasseur, R., Burny, A., Portetelle, D. und Mornon, J. P.** Common prevalence of alanine and glycine in mobile reactive centre loops of serpins and viral fusion peptides: Do prions possess a fusion peptide? *Journal of Computer-aided Molecular Design* 8, 175-191. 1994.

**Cashman, N. R., Loertscher, R., Nalbantoglu, J., Shaw, I., Kascsak, R. J., Bolton, D. C. und Bendheim, P. E.** Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell* 61, 185-192. 1990.

**Caughey, B., Race, R. E., Ernst, D., Buchmeier, M. J. und Chesebro, B.** Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. *Journal of Virology* 63, 175-181. 1989.

**Caughey, B. W., Dong, A., Bhat, K. S., Ernst, D., Hayes, S. F. und Caughey, W. S.** Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP<sup>Sc</sup> 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry* 30, 7672-7679. 1991a.

**Caughey, B., Raymond, G. J., Ernst, D. und Race, R. E.** N-terminal truncation of the scrapie-associated form of PrP by lysosomal protease(s): implications regarding the site of conversion of PrP to the protease-resistant state. *Journal of Virology* 65, 6597-6603. 1991b.

**Caughey, B. und Chesebro, B.** Prion protein and the transmissible spongiform encephalopathies. *Trends in Cell Biology* 7, 56-63. 1997.

**Chakrabartty A., Schellmann, J. A und Baldwin, R. L.** Large differences in the helix propensities of alanine and glycine. *Nature (London)* 351, 586-588. 1991.

**Chang, W.-J., Ying, Y.-S., Rothberg, K. G., Hooper, N. M., Turner, A. J., Gambliel, H. A., DeGunzburg J., Mumby, S. M., Gilman, A. G. und Anderson, R. G. W.** Purification and characterisation of smooth muscle caveolae. *J. Cell Biol.* 126, 127-138. 1994.

**Chen, S. G., Teplow, D. B., Parchi, P., Teller, J. K. und Gambetti, P.** Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases. *Journal of Biological Chemistry* 270, 19173-19180. 1995.

**Chesebro, B.** Prion diseases - BSE and prions: Uncertainties about the agent. *Science* 279, 42-43. 1998.

**Cohen, F. E., Pan, K. M., Huang, Z., Baldwin, M., Fletterick, R. J. und Prusiner, S. B.** Structural clues to prion replication. *Science* 264, 530-531. 1994.

**Colling, S. B., Collinge, J. und Jefferys, J. G. R.** Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca<sup>2+</sup> activated K<sup>+</sup> currents. *Neuroscience Letters* 209, 49-52. 1996.

- Colling, S. B., Khana, M., Collinge, J. und Jefferys, J. G. R.** Mossy fibre reorganization in the hippocampus of prion protein null mice. *Brain Research* 755, 28-35. 1997.
- Collinge, J., Whittington, M. A., Sidle, K. C. L., Smith, C. J., Palmer, M. S., Clarke, A. R. und Jefferys, J. G. R.** Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature (London)* 370, 295-297. 1994.
- Collinge, J., Sidle, K. C. L., Meads, J., Ironside, J. und Hill, A. F.** Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature (London)* 383, 685-690. 1996.
- Come, J. H., Fraser, P. E. und Lansbury, P. T., Jr.** A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: Importance of seeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 90, 5959-5963. 1993.
- Creutzfeldt, H. G.** Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie* 57, 1-18. 1920.
- Cuillé, J. und Chelle, P.-L.** La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences.Serie III.* 203, 1552-1554. 1936.
- DeArmond, S. J. und Prusiner, S. B.** Prion diseases. 1521-1530. 1995. New York, Raven Press, Ltd.
- Delahunty, M. D., Rhee, I., Freed, E. O. und Boni´facino, J. S.** Mutational analysis of the fusion peptide of the human immunodeficiency virus type 1: identification of critical glycine residues. *Virology* 218, 94-102. 1996.
- Donne, D. G., Viles, J. H., Groth, D., Mehlhorn, I., James, T. L., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., Wright, P. E. und Dyson, H. J.** Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): The N terminus is highly flexible. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 94, 13452-13457. 1997.
- Dubay, J. W., Dubay, S. R., Shin, H. J. und Hunter, E.** Analysis of the cleavage site of the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein: requirement of precursor cleavage for glycoprotein incorporation. *Journal of Virology* 69, 4675-4682. 1995.
- Dubendorff, J. W. und Studier, F. W.** Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *Journal of Molecular Biology* 219, 45-59. 1991.
- Edenhofer, F., Rieger, R., Famulok, M., Wendler, W., Weiss, S. und Winnacker, E.-L.** Prion protein PrP<sup>C</sup> interacts with molecular chaperones of the Hsp60 family. *Journal of Virology* 70, 4724-4728. 1996.
- Eigen, M.** Prionics or the kinetic basis of prion diseases. *Biophysical Chemistry* 63, A1-A18. 1996.

- Endo, T., Groth, D., Prusiner, S. B. und Kobata, A.** Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. *Biochemistry* 28, 8380-8388. 1989.
- Forloni, G., Angeretti, N., Chiesa, R., Monzani, E., Salmona, M., Bugiani, O. und Tagliavini, F.** Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature (London)* 362, 543-546. 1993.
- Freed, E. O., Myers, D. J. und Risser, R.** Mutational analysis of the cleavage sequence of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein precursor gp160. *Journal of Virology* 63, 4670-4675. 1989.
- Freed, E. O. und Risser, R.** The role of envelope glycoprotein processing in murine leukemia virus infection. *Journal of Virology* 61, 2852-2856. 1987.
- Gajdusek, D. C., Gibbs, C. J. und Alpers, M.** Experimental transmission of a kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature (London)* 209, 794-796. 1966.
- Gerstmann, J., Strüssler, E. und Scheinker, I.** Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems. Zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns. *Zeitschrift für Neurologie* 154, 736-762. 1936.
- Glockshuber, R., Hornemann, S., Billeter, M., Riek, R., Wider, G. und Wüthrich, K.** Prion protein structural features indicate possible relations to signal peptidases. *FEBS Letters* 426, 291-296. 1998.
- Gorodinsky, A. und Harris, D. A.** Glycolipid-anchored proteins in neuroblastoma cells form detergent-resistant complexes without caveolin. *Journal of Cell Biology* 129, 619-627. 1995.
- Gouill, C., Parent, J.-L., Rola-Pleszczynski, M. und Stankova, J.** Analysis of recombinant plasmids by a modified alkaline lysis method. *Analytical Biochemistry* 219, 164. 1994.
- Griffith, J. S.** Self-replication and scrapie. *Nature (London)* 215, 1043-1044. 1967.
- Haass, C.** Molekulare Mechanismen der Alzheimer Erkrankung in: *Alzheimer Demenz. Grundlagen, Klinik und Therapie.* Hrsg. Förstel, H., Bickel, H. und Kurz, A. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York. 1999.
- Hadlow, W. J.** Scrapie and kuru. *Lancet* 2, 289-290. 1959.
- Hanahan, D.** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166, 557-580. 1983.
- Haraguchi, T., Fisher, S., Olofsson, S., Endo, T., Groth, D., Tarentino, A., Borchelt, D. R., Teplow, D., Hood, L., Burlingame, A., Lycke, E., Kobata, A. und Prusiner, S. B.** Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 274, 1-13. 1989.



**Harlow, E. und Lane, D.** Antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA. 1988. Cold Spring Harbor, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Harmey, J. H., Doyle, D., Brown, V. und Rogers, M. S.** The cellular isoform of the prion protein, PrP<sup>c</sup>, is associated with caveolae in mouse neuroblastoma (N<sub>2</sub>a) cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 210, 753-759. 1995.

**Harris, D. A., Huber, M. T., Vandijken, P., Shyng, S. L., Chait, B. T. und Wang, R.** Processing of a cellular prion protein - identification of N-terminal and C-terminal cleavage sites. *Biochemistry* 32, 1009-1016. 1993.

**Harris, D. A., Gorodinsky, A., Lehmann, S., Moulder, K. und Shyng, S. L.** Cell biology of the prion protein. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 207, 77-93. 1996.

**Harris, D. A.** Cellular biology of prion diseases. *Clinical Microbiology Reviews* 12, 429-444. 1999.

**Hegde, R. S., Mastrianni, J. A., Scott, M. R., DeFea, K. A., Tremblay, P., Torchia, M., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B. und Lingappa, V. R.** A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science* 279, 827-834. 1998a.

**Hegde, R. S., Voigt, S. und Lingappa, V. R.** Regulation of protein topology by trans-acting factors at the endoplasmic reticulum. *Molecular Cell* 2, 85-91. 1998b.

**Hegde, R. S., Tremblay, P., Groth, D., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B. und Lingappa, V. R.** Transmissible and genetic prion diseases share a common pathway of neurodegeneration. *Nature (London)* 402, 822-826. 1999.

**Herms, J. W., Kretzschmar, H. A., Titz, S. und Keller, B. U.** Patch-clamp analysis of synaptic transmission to cerebellar Purkinje cells of prion protein knockout mice. *European Journal of Neuroscience* 7, 2508-2512. 1995.

**Herms, J., Tings, T., Gall, S., Madlung, A., Siebert, H., Schürmann, P., Windl, O., Brose, N. und Kretzschmar, H.** Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *The Journal of Neuroscience* 19, 8866-8875. 1999.

**Hindiyeh, M., Li, Q. H., Basavappa, R., Hogle, J. M. und Chow, M.** Poliovirus mutants at histidine 195 of VP2 do not cleave VP0 into VP2 and VP4. *Journal of Virology* 73, 9072-9079. 1999.

**Hope, J., Morton, L. J. D., Farquhar, C. F., Multhaup, G., Beyreuther, K. und Kimberlin, R. H.** The major polypeptide of scrapie-associated fibrils (SAF) has the same size, charge distribution and B-terminal protein sequence as predicted for the normal brain protein (PrP). *EMBO Journal* 5, 2591-2597. 1986.

**Hopkins, P. C., Carrell, R. W. und Stone, S. R.** Effects of mutations in the hinge region of serpins. *Biochemistry* 32, 7650-7657. 1993.

- Horimoto, T. und Kawaoka, Y.** The hemagglutinin cleavability of a virulent avian influenza virus by subtilisin-like endoproteinases is influenced by the amino acid immediately downstream of the cleavage site. *Virology* 210, 466-470. 1995.
- Hornemann, S. und Glockshuber, R.** Autonomous and reversible folding of a soluble amino-terminally truncated segment of the mouse prion protein. *Journal of Molecular Biology* 261, 614-619. 1996.
- Hornemann, S., Korth, C., Oesch, B., Riek, R., Wider, G., Wüthrich, K. und Glockshuber, R.** Recombinant full-length murine prion protein, mPrP(23-231): purification and spectroscopic characterization. *FEBS Letters* 413, 277-281. 1997.
- Hornshaw, M. P., McDermott, J. R. und Candy, J. M.** Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 207, 621-629. 1995a.
- Hornshaw, M. P., McDermott, J. R., Candy, J. M. und Lakey, J. H.** Copper binding to the N-terminal tandem repeat region of mammalian and avian prion protein: Structural studies using synthetic peptides. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 214, 993-999. 1995b.
- Horwich, A. L. und Weissman, J. S.** Deadly conformations- Protein misfolding in prion disease. *Cell* 89, 499-510. 1997.
- Hölscher, C., Delius, H. und Bürkle, A.** Overexpression of nonconvertible PrP<sup>c</sup> Ä114-121 in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells leads to *trans*-dominant inhibition of wild-type PrP<sup>Sc</sup> accumulation. *Journal of Virology* 72, 1153-1159. 1998.
- Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H.** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28. 1990.
- Jakob, A.** Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem Befunde (spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde* 70, 132-146. 1921.
- Jarrett, J. T. und Lansbury, P. T.** Seeding one-dimensional crystallization of amyloid - a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie. *Cell* 73, 1055-1058. 1993.
- Jeffrey, M., Goodsir, C. M., Fowler, N., Hope, J., Bruce, M. E. und McBride, P. A.** Ultrastructural immuno-localization of synthetic prion protein peptide antibodies in 87V murine scrapie. *Neurodegeneration* 5, 101-109. 1996.
- Jimenez-Huete, A., Lievens, P. M. J., Vidal, R., Piccardo, P., Ghetti, B., Tagliavini, F., Frangione, B. und Prelli, F.** Endogenous proteolytic cleavage of normal and disease-associated isoforms of the human prion protein in neural and non-neural tissues. *American Journal of Pathology* 153, 1561-1572. 1998.
- Kascsak, R. J., Rubenstein, R., Merz, P. A., Tonna-DeMasi, M., Fersko, R., Carp, R. I., Wisniewski, H. M. und Diringer, H.** Mouse polyclonal and

monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins. *Journal of Virology* 61, 3688-3693. 1987.

**Kascsak, R. J., Fersko, R., Pulgiano, D., Rubenstein, R. und Carp, R. I.** Immunodiagnosis of prion disease. *Immunological Investigation* 26, 259-268. 1997.

**Kellings, K., Meyer, N., Mirenda, C., Prusiner, S. B. und Riesner, D.** Further analysis of nucleic acids in purified scrapie prion preparations by improved return refocusing gel electrophoresis. *Journal of General Virology* 73, 1025-1029. 1992.

**Kellings, K., Meyer, N., Mirenda, C., Prusiner, S. B. und Riesner, D.** Analysis of nucleic acids in purified scrapie prion preparations. 215-226. 1993. Vienna, Springer-Verlag.

**Klatzo, I., Gajdusek, D. C. und Zigas, V.** Pathology of the kuru. *Laboratory Investigation* 8, 799-847. 1959.

**Krasemann, S., Groschup, M. H., Harmeyer, S., Hunsmann, G. und Bodemer, W.** Generation of monoclonal antibodies against human prion proteins in PrP0/0 mice. *Molecular Medicine* 2, 725-734. 1996.

**Kretzschmar, H. A., Prusiner, S. B., Stowring, L. E. und DeArmond, S. J.** Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *American Journal of Pathology* 122, 1-5. 1986.

**Kretzschmar, H. A.** Human prion diseases (spongiform encephalopathies). *Archives of Virology (Supplement)* 7, 261-293. 1993.

**Kretzschmar, H. A., Ironside, J. W., DeArmond, S. J. und Tateishi, J.** Diagnostic criteria for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Archives of Neurology* 53, 913-920. 1996.

**Kretzschmar, H. A., Giese, A., Brown, D. R., Herms, J., Keller, B., Schmidt, B. und Groschup, M.** Cell death in prion disease. *Journal of Neural Transmission (Supplement)* 50, 191-210. 1997.

**Kurschner, C. und Morgan, J. I.** The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system. *Molecular Brain Research* 30, 165-167. 1995.

**Kyte, J.** *Structure in Protein Chemistry*. 1995. Garland Publishing, New York und London.

**Laemli, U. K.** Cleavage and structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227, 680-685. 1970.

**Lasmézas, C. I., Deslys, J.-P., Demalmay, R., Adjou, K. T., Lamoury, F., Dormont, D., Robain, O., Ironside, J. und Hauw, J.-J.** BSE transmission to macaques. *Nature (London)* 381, 743-744. 1996.

**Lawrence, D. A.** The role of reactive-center loop mobility in the serpin inhibitory mechanism. *Advanced Experimental Medical Biology* 425, 99-108. 1997.

- Lehmann, S. und Harris, D. A.** Blockade of glycosylation promotes acquisition of scrapie-like properties by the prion protein in cultured cells. *Journal of Biological Chemistry* 272, 21479-21487. 1997.
- Lehmann, S., Milhavet, O. und Mangé, A.** Trafficking of the cellular isoform of the prion protein. *Biomed.Pharmacotherapy* 53, 39-46. 1999.
- Little, J. W.** Autodigestion of *lexA* and phage lambda repressors. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*. 81, 1375-1379. 1984.
- Liu, H., Farr-Jones, S., Ulyanov, N. B., Llinas, M., Marqusee, S., Groth, D., Cohen, F. E., Prusiner, S. B. und James, T. L.** Solution structure of Syrian hamster prion protein rPrP (90-231). *Biochemistry* 38, 5362-5377. 1999.
- Lledo, P. M., Tremblay, P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B. und Nicoll, R. A.** Mice deficient for prion protein exhibit normal neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 93, 2403-2407. 1996.
- Low, M. G.** The glycosyl-phosphatidyl anchor of membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 988, 427-454. 1989.
- Manson, J., West, J. D., Thomson, V., McBride, P., Kaufman, M. H. und Hope, J.** The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development* 115, 117-122. 1992.
- Manson, J. C., Hope, J., Clarke, A. R., Johnston, A., Black, C. und MacLeod, N.** PrP gene dosage and long term potentiation. *Neurodegeneration* 4, 113-115. 1995.
- Marcotte, E. M. und Eisenberg, D.** Chicken prion tandem repeats form a stable, protease-resistant domain. *Biochemistry* 38, 667-676. 1999.
- Martins, V. R., Graner, E., Garcia-Abreu, J., deSouza, S. J., Mercadante, A. F., Veiga, S. S., Zanata, S. M., Neto, V. M. und Brentani, R. R.** Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor. *Nature Medicine* 3, 1376-1382. 1998.
- McCune, J. M., Rabin, L. B., Feinberg, M. B., Lieberman, M., Kosek, J. C., Reyes, G. R. und Weissman, I. L.** Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell* 53, 55-67. 1988.
- Medori, R., Montagna, P., Tritschler, H. J., LeBlanc, A, Cortelli, P., Tinuper, P., Lugaresi, E. und Gambetti, P.** Fatal familial insomnia: a second kindred with mutation of prion protein gene at codon 178. *Neurology* 42, 669-670. 1992.
- Meyer, N., Rosenbaum, V., Schmidt, B., Gilles, K., Mirinda, C., Groth, D., Prusiner, S. B. und Riesner, D.** Search for a putative scrapie genome in purified prion fractions reveals a paucity of nucleic acids. *Journal of General Virology* 72, 37-49. 1991.

- Moser, M., Colello, R. J., Pott, U. und Oesch, B.** Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron* 14, 509-517. 1995.
- Muramoto, T., Scott, M., Cohen, F. E. und Prusiner, S. B.** Recombinant scrapie-like prion protein of 106 amino acids is soluble. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 93, 15457-15462. 1996.
- Nishida, N., Katamine, S., Shigematsu, K., Nakatani, A., Sakamoto, N., Hasegawa, S., Nakaoka, R., Atarashi, R., Kataoka, Y. und Miyamoto, T.** Prion protein is necessary for latent learning and long-term memory retention. *Cellular and Molecular Neurobiology* 17, 537-545. 1997.
- Nishimura, A., Morita, M. und Sugino, Y.** A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Research* 18, 6169. 1990.
- Oesch, B., Westaway, D., Wälchli, M., McKinley, M. P., Kent, S. B., Aebersold, R., Barry, R. A., Tempst, P., Teplow, D. B., Hood, L. E., Prusiner, S. B. und Weissmann, C.** A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40, 735-746. 1985.
- Oesch, B., Teplow, T. B., Stahl, N., Serban, D., Hood, L. E. und Prusiner, S. B.** Identification of cellular proteins binding to the scrapie prion protein. *Biochemistry* 29, 5848-5855. 1990.
- Paetzel, M. und Dalbey, R. E.** Catalytic hydroxyl/amine dyads within serine proteases. *Trends in Biochemical Science* 22, 28-31. 1997.
- Pan, K. M., Stahl, N. und Prusiner, S. B.** Purification and properties of the cellular prion protein from Syrian hamster brain. *Protein Science* 1, 1343-1352. 1992.
- Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., Cohen, F. E. und Prusiner, S. B.** Conversion of  $\alpha$ -helices into  $\beta$ -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 90, 10962-10966. 1993.
- Parry, H. B.** Scrapie disease in sheep. 1-192. 1983. New York, Academic Press.
- Pauly, P. C. und Harris, D. A.** Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *Journal of Biological Chemistry* 273, 33107-33110. 1998.
- Pecher, E. I., Sainte-Marie, J., Bienven, E. A. und Hoekstra, D.** Peptides and membrane fusion: towards an understanding of the molecular mechanism of protein-induced fusion. *Molecular Membrane Biology* 167, 1-17. 1999.
- Pillot, T., Lins, L., Goethals, M., Vanloo, B., Baert, J., Vandekerckhove, J., Rosseneu, M. und Brasseur, R.** The 118-135 peptide of the human prion protein forms amyloid fibrils and induces liposome fusion. *Journal of Molecular Biology* 274, 381-393. 1997.

**Priola, S. A. und Chesebro, B.** A single hamster PrP amino acid blocks conversion to protease-resistant PrP in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells. *Journal of Virology* 69, 7754-7758. 1995.

**Priola, S. A. und Chesebro, B.** Abnormal properties of prion protein with insertional mutations in different cell types. *Journal of Biological Chemistry* 273, 11980-11985. 1998.

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

**Prusiner, S. B., Scott, M., Foster, D., Pan, K.-M., Groth, D., Mirenda, C., Torchia, M., Yang, S.-L., Serban, D., Carlson, G. A., Hoppe, P. C., Westaway, D. und DeArmond, S. J.** Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell* 63, 673-686. 1990.

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

**Prusiner, S. B. und DeArmond, S. J.** Prion diseases and neurodegeneration. *Annual Review of Neuroscience* 17, 311-339. 1994.

**Prusiner, S. B.** Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 95, 13363-13383. 1998.

**Prusiner, S. B., Scott, M. R., DeArmond, S. J. und Cohen, F. E.** Prion Protein Biology - Review. *Cell* 93, 337-348. 1998.

**Raymond, G. J., Hope, J., Kocisko, D. A., Priola, S. A., Raymond, L. D., Bossers, A., Ironside, J., Will, R. G., Chen, S. G., Petersen, R. B. und et al.** Molecular assessment of the potential transmissibilities of BSE and scrapie to humans. *Nature (London)* 388, 285-288. 1997.

**Rieger, R., Edenhofer, F., Lasmézas, C. I. und Weiss, S.** The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *Nature Medicine* 3, 1383-1388. 1998.

**Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Glockshuber, R. und Wüthrich, K.** NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Letters* 413, 282-386. 1997.

**Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Ehrlich, H. A.** Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491. 1988.

**Sakaguchi, S., Katamine, S., Nishida, N., Moriuchi, R., Shigematsu, K., Sugimoto, T., Nakatani, A., Kataoka, Y., Houtani, T., Shirabe, S., Okada, H., Hasegawa, S., Miyamoto, T. und Noda, T.** Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature (London)* 380, 528-531. 1996.

**Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T.** Molecular Cloning; a Laboratory Manual. 2. 1989. New York, Cold Stream Harbour Laboratory Press.

**Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 74, 5463-5467. 1977.

**Schmid, S. L.** Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. Annual Review of Biochemistry 66, 511-548. 1997.

**Scott, M., Foster, D., Mirenda, C., Serban, D., Coufal, F., Wälchli, M., Torchia, M., Groth, D., Carlson, G., DeArmond, S. J., Westaway, D. und Prusiner, S. B.** Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. Cell 59, 847-857. 1989.

**Scott, M., Groth, D., Foster, D., Torchia, M., Yang, S. L., DeArmond, S. J. und Prusiner, S. B.** Propagation of prions with artificial properties in transgenic mice expressing chimeric PrP genes. Cell 73, 979-988. 1993.

**Scott, M. R., Will, R., Ironside, J., Nguyen, H.-O. B., Tremblay, P., DeArmond, S. J. und Prusiner, S. B.** Comelling transgenetic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. PNAS 96, 15137-15142. 1999.

**Shyng, S. L., Huber, M. T. und Harris, D. A.** A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. Journal of Biological Chemistry 268, 15922-15928. 1993.

**Shyng, S. L., Heuser, J. E. und Harris, D. A.** A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. Journal of Cell Biology 125, 1239-1250. 1994.

**Shyng, S.-L., Moulder, K. L., Lesko, A. und Harris, D. A.** The N-terminal domain of a glycolipid-anchored prion protein is essential for its endocytosis via clathrin-coated pits. The Journal of Biological Chemistry 270, 14793-14800. 1995.

**Singh, N., Zanusso, G., Chen, S. G., Fujioka, H., Richardson, S., Gambetti, P. und Petersen, R. B.** Prion protein aggregation reverted by low temperature in transfected cells carrying a prion protein gene mutation. Journal of Biological Chemistry 272, 28461-28470. 1997.

**Stahl, N., Borchelt, D. R., Hsiao, K. und Prusiner, S. B.** Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. Cell 51, 229-240. 1987.

**Stahl, N., Baldwin, M. A., Burlingame, A. L. und Prusiner, S. B.** Identification of glycoinositol phospholipid linked and truncated forms of the scrapie prion protein. Biochemistry 29, 8879-8885. 1990.

**Stahl, N., Baldwin, M. A., Hecker, R., Pan, K. M., Burlingame, A. L. und Prusiner, S. B.** Glycosylinositol phospholipid anchors of the scrapie and cellular prion proteins contain sialic acid. Biochemistry 31, 5043-5052. 1992.

- Studier, F. W. und Moffatt, B. A.** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology* 189, 113-130. 1986.
- Sumudhu, W., Perera, S. und Hooper, M.** Proteolytic fragmentation of the murine prion protein: role of Tyr-128 and His-177. *FEBBS Letters* 463, 273-276. 1999.
- Taraboulos, A., Raeber, A. J., Borchelt, D. R., Serban, D. und Prusiner, S. B.** Synthesis and trafficking of prion proteins in cultured cells. *Molecular Biology of the Cell* 3, 851-863. 1992.
- Taraboulos, A., Scott, M., Semenov, A., Avrahami, D., Laszlo, L. und Prusiner, S. B.** Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *Journal of Cell Biology* 129, 121-132. 1995.
- Tateishi, J. und Kitamoto, T.** Inherited prion diseases and transmission to rodents. *Brain Pathology* 5, 53-59. 1995.
- Tatzelt, J., Zuo, J., Voellmy, R., Scott, M., Hartl, U. und Prusiner, S. B.** Scrapie prions selectively modify the stress response in neuroblastoma cells. *Cell Biology* 92, 2944-2948. 1995.
- Telling, G. C., Scott, M., Hsiao, K., Foster, D., Yang, S. L., Torchia, M., Sidle, K. C. L., Collinge, J., DeArmond, S. J. und Prusiner, S. B.** Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from humans to transgenic mice expressing chimeric human-mouse prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 91, 9936-9940. 1994.
- Telling, G. C., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F. E., DeArmond, S. J. und Prusiner, S. B.** Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* 83, 79-90. 1995.
- Tobler, I., Gaus, S. E., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rülicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P. A. und Manson, J. C.** Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature (London)* 380, 639-642. 1996.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J.** Electrophoretic transfer of proteins from acrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 76, 4350-4354. 1979.
- Towbin, H. und Gordon, J.** Immunoblotting and dot immunoblotting current status and outlook. *Journal of Immunological Methods* 72, 313. 1984.
- Varadaraj, K. und Skinner, D. M.** Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G+C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases. *Gene* 140, 1-5. 1994.



- Vey, M., Pilkuhn, S., Wille, H., Nixon, R., DeArmond, S. J., Smart, E. J., Anderson, R. G. W., Taraboulos, A. und Prusiner, S. B.** Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 93, 14945-14949. 1996.
- Viles, J. H., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., Goodin, D. B., Wright, P. E. und Dyson, H. J.** Copper binding to the prion protein: Structural implications of four identical cooperative binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 96, 2042-2047. 1999.
- Weber, T., Poser, S. und Kretzschmar, H. A.** Prionkrankheiten - heutiger Wissensstand. *Deutsches Ärzteblatt* 44, 2226-2232. 1994.
- Weissenhorn, W., Dessen, A., Calder, L. J., Harrison, S. C., Skehel, J. J. und Wiley, D. C.** Structural basis for membrane fusion by enveloped viruses. *Molecular Membrane Biology* 16, 3-9. 1999.
- Westaway, D., Cooper, C., Turner, S., Da Costa, M., Carlson, G. A. und Prusiner, S. B.** Structure and polymorphism of the mouse prion protein gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 91, 6418-6495. 1994.
- White, J. M.** Membrane fusion. *Science* 258, 917-924. 1992.
- Whittington, M. A., Sidle, K. C. L., Gowland, I., Meads, J., Hill, A. F., Palmer, M. S., Jefferys, J. G. R. und Collinge, J.** Rescue of neurophysiological phenotype seen in PrP null mice by transgene encoding human prion protein. *Nature Genetics* 9, 197-207. 1995.
- Will, R. G., Ironside, J. W., Zeidler, M., Cousens, S. N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A. und Smith, P. G. A.** A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 347, 921-925. 1996.
- Windl, O., Dempster, M., Estibeiro, J. P., Lathe, R., De Silva, R., Esmonde, T., Will, R., Springbett, A., Campbell, T. A., Sidle, K. C. L., Palmer, M. S. und Collinge, J.** Genetic basis of Creutzfeldt-Jakob disease in the United Kingdom: a systematic analysis of predisposing mutations and allelic variations in the PRNP gene. *Human Genetics* 98, 259-264. 1996.
- Windl, O., Lorenz, H., Behrens, C., Römer, A. und Kretzschmar, H. A.** Construction and characterization of murine neuroblastoma cell clones allowing inducible and high expression of the prion protein. *Journal of General Virology* 80, 15-21. 1999.
- Windl, O. und Kretzschmar, H. A.** Prion Diseases in: Neurogenetics. ed. S.-M. Pulst. Oxford University Press. 2000.
- Wopfner, F., Weidenhöfer, G., Schneider, R., von Brunn, A., Gilch, S., Schwarz, T. F., Werner, T. und Schätzl, H. M.** Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *Journal of Molecular Biology* 289, 1163-1178. 1999.

**Yehiely, F., Bamborough, P., Da Costa M., Perry, B. J., Thinakaran, G., Cohen, F. E., Carlson, G. A. und Prusiner, S. B.** Identification of candidate proteins binding to prion protein. *Neurobiology of Disease*. 3, 339-355. 1997.

**Zanusso, G., Liu, D., Ferrari, S, Hegyi, I, Yin, X., Aguzzi, A., Hornemann, S., Liemann, S., Glockshuber, R., Manson, J., Brown, P., Petersen, R. B., Gambetti, P. und Sy, M.-S.** Prion protein expression in different species: analysis with a panel of new mAbs. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 95, 8812-8816. 1998.

**Zavorotinskaya, T. und Albritton, L. M.** Failure to cleave murine leukemia virus envelope protein does not preclude its incorporation in virions and productive virus-receptor interaction. *Journal of Virology* 73, 5621-5629. 1999.

## 9 ANHANG

### 9.1 DATENTABELLEN

	<b>13A5</b>	<b>1A8</b>	<b>6H4</b>	<b>7G5</b>
	<b>od18kDa/ od28kDa</b>	<b>od18kDa/ od28kDa</b>	<b>od18kDa/ od28kDa</b>	<b>od18kDa/ od28kDa</b>
	2,96	1,27	1,12	0,57
	2,91	1,23	1,02	0,56
	2,41	1,72	0,94	0,60
	3,57	0,87	1,39	0,51
<b>Mw</b>	2,96	1,28	1,11	0,56
<b>Stabw</b>	0,47	0,35	0,19	0,04

Tabelle 3: Quantifizierung des 18 kDa Spaltprodukts in tg81 Hirnhomogenaten im Verhältnis zu ungespaltenem Prionprotein nach Detektion mit den Antikörpern 13A5, 1A8, 6H4 und 7G5.

Bezeichnungen: od18kDa/od28kDa: Quotient  $[(\text{od18kDa-Bkg})/\text{mm}^2]/[(\text{od28kDa-Bkg})/\text{mm}^2]$  gerundet auf zwei Stellen hinter dem Komma; (od28kDa-Bkg)/mm<sup>2</sup> bzw. (od18kDa-Bkg)/mm<sup>2</sup>: Aufgezeichnete Lichtsignale für ungespaltenes Prionprotein bzw. 18 kDa Spaltprodukt abzüglich des lokalen Hintergrundes bezogen auf einen Quadratmillimeter Meßfläche; Mw: Mittelwert od18kDa/od28kDa; Stabw: Standardabweichung od18kDa/od28kDa.

	<b>Kan72</b>	<b>1A8</b>	<b>13A5</b>	<b>6H4</b>
	<b>od20kDa/ od28kDa</b>	<b>od20kDa/ od28kDa</b>	<b>od20kDa/ od28kDa</b>	<b>od20kDa/ od28kDa</b>
	0,69	0,66	0,55	0,27
	0,81	0,63	0,32	0,21
	0,86	0,80	0,41	0,14
	0,78	0,69	0,43	0,14
<b>Mw</b>	0,79	0,70	0,42	0,19
<b>Stabw</b>	0,07	0,07	0,09	0,06

Tabelle 4: Quantifizierung des 20 kDa Spaltprodukts in tg81 Hirnhomogenaten im Verhältnis zu ungespaltenem Prionprotein nach Detektion mit den Antikörpern Kan72, 1A8, 13A5 und 6H4.

Bezeichnungen: od18kDa/od28kDa: Quotient  $[(\text{od20kDa-Bkg})/\text{mm}^2]/[(\text{od28kDa-Bkg})/\text{mm}^2]$  gerundet auf zwei Stellen hinter dem Komma; (od28kDa-Bkg)/mm<sup>2</sup> bzw. (od20kDa-Bkg)/mm<sup>2</sup>: Aufgezeichnete Lichtsignale für ungespaltenes Prionprotein bzw. 20 kDa Spaltprodukt abzüglich des lokalen Hintergrundes bezogen auf einen Quadratmillimeter Meßfläche; Mw: Mittelwert od20kDa/od28kDa; Stabw: Standardabweichung od20kDa/od28kDa.

	od18kDa/od28kDa								Mw	Stabw
<b>13A5</b>	0,982	0,985	0,993	1,047	1,024	0,917	1,019	1,139	1,01	0,06
<b>K105G</b>	0,416	0,451	0,391	0,210	0,549	0,427	0,640		0,44	0,12
<b>K109G</b>	0,283	0,330	0,311	0,207	0,283	0,281	0,361	0,255	0,29	0,05
<b>H110G</b>	0,223	0,229	0,254	0,245	0,229	0,290	0,235	0,107	0,22	0,05
<b>3G105</b>	0,389	0,324	0,396	0,360	0,567	0,266			0,38	0,09
<b>3S100</b>	0,800	0,850	0,804	0,827	0,583	0,821	0,944		0,80	0,10
<b>3S105</b>	0,674	0,656	0,608	0,654	0,622	0,679	0,614		0,64	0,03
<b>5S100</b>	0,883	0,867	0,806	0,897	0,657	0,744	1,037		0,84	0,11
<b>A/G</b>	0,030	0,046	0,076	0,049	0,027	0,039	0,081	0,015	0,05	0,02
<b>G/A</b>	1,158	0,894	1,198	1,294	1,327	0,708	1,052	1,788	1,18	0,32
<b>D105-125</b>	0,045	0,040	0,031	0,066	0,002	0,096	0,060	0,008	0,04	0,03

Tabelle 5: Quantifizierung des 18 kDa Spaltprodukts in verschiedene Prionprotein-Konstrukte überexprimierenden N2a-Zellen im Verhältnis zu ungespaltenem Prionprotein nach Detektion mit dem Antikörper 6H4.

Bezeichnungen: od18kDa/od28kDa: Quotient  $[(\text{od18kDa-Bkg})/\text{mm}^2]/[(\text{od28kDa-Bkg})/\text{mm}^2]$  gerundet auf drei Stellen hinter dem Komma; (od28kDa-Bkg)/mm<sup>2</sup> bzw. (od18kDa-Bkg)/mm<sup>2</sup>: Aufgezeichnete Lichtsignale für ungespaltenes Prionprotein bzw. 18 kDa Spaltprodukt abzüglich des lokalen Hintergrundes bezogen auf einen Quadratmillimeter Meßfläche; Mw: Mittelwert od18kDa/od28kDa; Stabw: Standardabweichung od18kDa/od28kDa.

	od18kDa/od28kDa								Mw	Stabw
<b>13A5</b>	0,972	0,955	0,983	1,067	1,074	0,937	1,019	1,099	1,01	0,06
<b>D105-110</b>	0,625	0,607	0,593	0,453	0,776	0,544	0,874		0,67	0,15
<b>V111G</b>	0,136	0,024	0,242	0,123	0,423	0,087			0,18	0,12
<b>V111I</b>	0,780	0,445	0,461	0,803	0,446	0,706			0,61	0,15
<b>A112/114G</b>	0,942	0,691	0,518	0,788					0,73	0,18
<b>A115/116G</b>	0,832	0,945	0,924	1,093					0,95	0,11
<b>A117/119G</b>	1,137	0,895	1,088	0,973					1,02	0,11
<b>A/I</b>	0,054	0,076	0,096	0,049	0,047	0,077			0,07	0,02
<b>G/I</b>	0,313	0,286	0,221	0,073	0,557	0,294			0,29	0,13
<b>A116V</b>	0,816	0,809	0,922	0,794	1,015	0,851	0,792	0,589	0,82	0,12
<b>D112-119</b>	0,116	0,150	0,130	0,112	0,091	0,129	0,019	0,332	0,13	0,09
<b>D111-125</b>	0,097	0,071	0,022	0,039	0,033	0,079	0,083		0,06	0,03

Tabelle 6: Quantifizierung des 18 kDa Spaltprodukts in verschiedene Prionprotein-Konstrukte überexprimierenden N2a-Zellen im Verhältnis zu ungespaltenem Prionprotein nach Detektion mit dem Antikörper 6H4.

Bezeichnungen: od18kDa/od28kDa: Quotient  $[(\text{od18kDa-Bkg})/\text{mm}^2]/[(\text{od28kDa-Bkg})/\text{mm}^2]$  gerundet auf drei Stellen hinter dem Komma; (od28kDa-Bkg)/mm<sup>2</sup> bzw. (od18kDa-Bkg)/mm<sup>2</sup>: Aufgezeichnete Lichtsignale für ungespaltenes Prionprotein bzw. 18 kDa Spaltprodukt abzüglich des lokalen Hintergrundes bezogen auf einen Quadratmillimeter Meßfläche; Mw: Mittelwert od18kDa/od28kDa; Stabw: Standardabweichung od18kDa/od28kDa.

	od20kDa/od28kDa							Mw	Stabw
<b>13A5</b>	0,884	0,722	0,853	0,762	0,880	0,883	0,775	0,82	0,07
<b>K105G</b>	0,416	0,427	0,388	0,459	0,424	0,398	0,387	0,41	0,03
<b>K109G</b>	0,595	0,626	0,600	0,620	0,619	0,557	0,506	0,59	0,04
<b>H110G</b>	0,571	0,301	0,357	0,298	0,413	0,344	0,314	0,37	0,10
<b>3G105</b>	0,571	0,584	0,573	0,593	0,624	0,630		0,60	0,02
<b>3S100</b>	0,548	0,535	0,510	0,494	0,510	0,507		0,52	0,02
<b>3S105</b>	0,613	0,446	0,548	0,566	0,540	0,491		0,53	0,05
<b>5S100</b>	0,411	0,441	0,548	0,498	0,494			0,48	0,04
<b>A/G</b>	1,024	0,975	0,548	0,998	0,954	1,133	1,116	0,96	0,20
<b>G/A</b>	0,668	0,901	0,748	0,911	0,822	0,886	0,823	0,82	0,09
<b>D105-125</b>	0,134	0,121	0,129	0,104	0,018	0,109	0,098	0,10	0,04

Tabelle 7: Quantifizierung des 20 kDa Spaltprodukts in verschiedene Prionprotein-Konstrukte überexprimierenden N2a-Zellen im Verhältnis zu ungespaltenem Prionprotein nach Detektion mit dem Antikörper Kan72.

Bezeichnungen: od20kDa/od28kDa: Quotient  $[(\text{od20kDa-Bkg})/\text{mm}^2]/[(\text{od28kDa-Bkg})/\text{mm}^2]$  gerundet auf drei Stellen hinter dem Komma; (od28kDa-Bkg)/mm<sup>2</sup> bzw. (od20kDa-Bkg)/mm<sup>2</sup>: Aufgezeichnete Lichtsignale für ungespaltenes Prionprotein bzw. 20 kDa Spaltprodukt abzüglich des lokalen Hintergrundes bezogen auf einen Quadratmillimeter Meßfläche; Mw: Mittelwert od20kDa/od28kDa; Stabw: Standardabweichung od20kDa/od28kDa.

	od20kDa/od28kDa							Mw	Stabw
<b>13A5</b>	0,884	0,722	0,853	0,762	0,880	0,883	0,775	0,82	0,07
<b>D105-110</b>	0,381	0,289	0,320	0,373	0,369	0,345	0,338	0,35	0,03
<b>V111G</b>	0,754	0,830	0,825	0,766	0,759			0,79	0,03
<b>V111I</b>	0,722	0,739	0,796	0,729	0,626	0,613		0,70	0,06
<b>A112/114G</b>	0,674							0,67	
<b>A115/116G</b>	0,698							0,70	
<b>A117/119G</b>	0,782							0,78	
<b>A/I</b>	0,333	0,317	0,403	0,386	0,287	0,489		0,37	0,07
<b>G/I</b>	0,414	0,320	0,387	0,412	0,422	0,508		0,41	0,06
<b>A116V</b>	0,460	0,399	0,458	0,424	0,535	0,398	0,520	0,46	0,05
<b>D112-119</b>	0,107	0,161	0,102	0,184	0,132	0,201	0,089	0,14	0,04
<b>D111-125</b>	0,171	0,241	0,093	0,094	0,118	0,063	0,100	0,13	0,06

Tabelle 8: Quantifizierung des 20 kDa Spaltprodukts in verschiedene Prionprotein-Konstrukte überexprimierenden N2a-Zellen im Verhältnis zu ungespaltenem Prionprotein nach Detektion mit dem Antikörper Kan72.

Bezeichnungen: od20kDa/od28kDa: Quotient  $[(\text{od20kDa-Bkg})/\text{mm}^2]/[(\text{od28kDa-Bkg})/\text{mm}^2]$  gerundet auf drei Stellen hinter dem Komma; (od28kDa-Bkg)/mm<sup>2</sup> bzw. (od20kDa-Bkg)/mm<sup>2</sup>: Aufgezeichnete Lichtsignale für ungespaltenes Prionprotein bzw. 20 kDa Spaltprodukt abzüglich des lokalen Hintergrundes bezogen auf einen Quadratmillimeter Meßfläche; Mw: Mittelwert od20kDa/od28kDa; Stabw: Standardabweichung od20kDa/od28kDa.

	od18kDa/od(x)kDa			Mw	Stabw
<b>PrP</b>	0,959	0,799	0,986	0,92	0,11
<b>D51-90</b>	0,568	0,751	0,802	0,69	0,12
<b>DNcoI</b>	0,892	1,454	0,918	1,09	0,32
<b>H/G</b>	0,679	0,943	0,985	0,87	0,17

Tabelle 9: Quantifizierung des 18 kDa Spaltprodukts in verschiedene Prionprotein-Konstrukte überexprimierenden N2a-Zellen im Verhältnis zu ungespaltenem Prionprotein nach Detektion mit dem Antikörper 6H4.

Bezeichnungen: od18kDa/od28kDa: Quotient  $[(\text{od18kDa-Bkg})/\text{mm}^2]/[(\text{od28kDa-Bkg})/\text{mm}^2]$  gerundet auf drei Stellen hinter dem Komma; (od28kDa-Bkg)/mm<sup>2</sup> bzw. (od18kDa-Bkg)/mm<sup>2</sup>: Aufgezeichnete Lichtsignale für ungespaltenes Prionprotein bzw. 18 kDa Spaltprodukt abzüglich des lokalen Hintergrundes bezogen auf einen Quadratmillimeter Meßfläche; Mw: Mittelwert od18kDa/od28kDa; Stabw: Standardabweichung od18kDa/od28kDa.

	od20kDa/od(x)kDa			Mw	Stabw
<b>PrP</b>	0,995	0,638	0,754	0,80	0,18
<b>D51-90</b>	0,699	0,646	1,000	0,75	0,22
<b>DNcoI</b>	0,812	0,725	0,995	0,84	0,14
<b>H/G</b>	0,865	0,700	0,877	0,81	0,10

Tabelle 10: Quantifizierung des 20 kDa Spaltprodukts in verschiedene Prionprotein-Konstrukte überexprimierenden N2a-Zellen im Verhältnis zu ungespaltenem Prionprotein nach Detektion mit dem Antikörper Kan72.

Bezeichnungen: od20kDa/od28kDa: Quotient  $[(\text{od20kDa-Bkg})/\text{mm}^2]/[(\text{od28kDa-Bkg})/\text{mm}^2]$  gerundet auf drei Stellen hinter dem Komma; (od28kDa-Bkg)/mm<sup>2</sup> bzw. (od20kDa-Bkg)/mm<sup>2</sup>: Aufgezeichnete Lichtsignale für ungespaltenes Prionprotein bzw. 20 kDa Spaltprodukt abzüglich des lokalen Hintergrundes bezogen auf einen Quadratmillimeter Meßfläche; Mw: Mittelwert od20kDa/od28kDa; Stabw: Standardabweichung od20kDa/od28kDa.

## 9.2 SEQUENZEN

```

1 / 1 31 / 11
atg AAG AAG CGC CCG AAG CCT GGA GGA TGG AAC ACT GGG GGC AGC CGA TAC CCG GGG CAG
met lys lys arg pro lys pro gly gly trp asn thr gly gly ser arg tyr pro gly gln
61 / 21 91 / 31
GGC AGC CCT GGA GGC AAC CGC TAC CCA CCT CAG GGC GGT GGT GGC TGG GGG CAG CCT CAT
gly ser pro gly gly asn arg tyr pro pro gln gly gly gly gly trp gly gln pro his
121 / 41 151 / 51
GGT GGT GGC TGG GGG CAG CCT CAT GGT GGT GGC TGG GGG CAG CCC CAT GGT GGT GGC TGG
gly gly gly trp gly gln pro his gly gly trp gly gln pro his gly gly gly trp
181 / 61 211 / 71
GGA CAG CCT CAT GGT GGT GGC TGG GGT CAA GGA GGT GGC ACC CAC AGT CAG TGG AAC AAG
gly gln pro his gly gly gly trp gly gln gly gly gly thr his ser gln trp asn lys
241 / 81 271 / 91
CCG AGT AAG CCA AAA ACC AAC ATG AAG CAC ATG tga taa
pro ser lys pro lys thr asn met lys his met OPA OCH

```

Abbildung 49: DNA- und Aminosäuresequenz des Konstrukts huPrP23-112.

```

1 / 1 31 / 11
atg gcg aac ctt ggc tac tgg ctg ctg gcc ctc ttt gtg act atg tgg act gat gtc ggc
met ala asn leu gly tyr trp leu leu ala leu phe val thr met trp thr asp val gly
61 / 21 91 / 31
ctc tgc gtg gca ggg gct gcg gca gct ggg gca gta gtg ggg ggc ctt ggt ggc tac atg
leu cys val ala gly ala ala ala ala gly ala val val gly gly leu gly gly tyr met
121 / 41 151 / 51
ctg ggg agc gcc gtg agc agg ccc atg atc cat ttt ggc aac gac tgg gag gac cgc tac
leu gly ser ala val ser arg pro met ile his phe gly asn asp trp glu asp arg tyr
181 / 61 211 / 71
tac cgt gaa aac atg tac cgc tac cct aac caa gtg tac tac agg cca gtg gat cag tac
tyr arg glu asn met tyr arg tyr pro asn gln val tyr tyr arg pro val asp gln tyr
241 / 81 271 / 91
agc aac cag aac aac ttc gtg cac gac tgc gtc aat atc acc atc aag cag cac acg gtc
ser asn gln asn asn phe val his asp cys val asn ile thr ile lys gln his thr val
301 / 101 331 / 111
acc acc acc acc aag ggg gag aac ttc acc gag acc gat gtg aag atg atg gag cgc gtg
thr thr thr thr lys gly glu asn phe thr glu thr asp val lys met met glu arg val
361 / 121 391 / 131
gtg gag cag atg tgc gtc acc cag tac cag aag gag tcc cag gcc tat tac gac ggg aga
val glu gln met cys val thr gln tyr gln lys glu ser gln ala tyr tyr asp gly arg
421 / 141 451 / 151
aga tcc agc agc acc gtg ctt ttc tcc tcc cct cct gtc atc ctc ctc atc tcc ttc ctc
arg ser ser ser thr val leu phe ser ser pro pro val ile leu leu ile ser phe leu
481 / 161
atc ttc ctg atc gtg gga tga
ile phe leu ile val gly OPA

```

Abbildung 50: DNA- und Aminosäuresequenz des Konstrukts moPrPSIG111-254.

### 9.3 ABKÜRZUNGEN

Die in dieser Arbeit verwendeten Ein- und Drei-Buchstaben-Notierungen für Aminosäuren sowie alle physikalischen Größen entsprechen der Konvention der *International Union for Biochemistry*.

A	Ampère
AA	Acrylamid
AS	Aminosäure
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chlor-3-indolylphosphat
Bkg	Hintergrund ( <i>Background</i> )
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
Ch	Hühnchen ( <i>Chicken</i> )
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> , und andere
FCS	fötale Kälberserum ( <i>Fetal Calf Serum</i> )
h	Stunden
hu	human
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	molar
μ	Mikro ( $10^{-6}$ )
min	Minuten
ml	Milliliter



---

n	Nano ( $10^{-9}$ )
neo	Neomycin
NBT	Nitroblautetrazolium
OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
od	optische Dichte Lichtemission
ORF	offener Leserahmen ( <i>Open Reading Frame</i> )
p	Pico ( $10^{-12}$ )
PAG	Polyacrylamidgel
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHa	Syrischer Hamster
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit(s), Enzymeinheit
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid

#### 9.4 DANKSAGUNG

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Kretzschmar für die freundliche Überlassung des Themas, den eingeräumten wissenschaftlichen Freiraum und die in jeder Hinsicht gewährte Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Jockusch danke ich für die freundliche und unkomplizierte Übernahme der externen Betreuung dieser Arbeit.

Dr. Otto Windl danke ich für viele wissenschaftliche Diskussionen und Anregungen zu dieser Arbeit und die wertvollen Vorschläge bei der Erstellung dieses Manuskripts.

Christiane Wegner und Christina Behrens danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit im Labor und die Bereitstellung verschiedener DNA-Konstrukte.

Weiterhin danke ich allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, insbesondere Otto Windl, Manuela Neumann, Armin Giese, Walter Schulz-Schaeffer, Jochen Herms, Cornelia Dörner-Ciossek, Malte Buchholz, Holger Lorenz, Stefan Korte, Ilka Schneider, Inga Böll, Christiane Wegner, Christina Behrens, Ulrike Nunnendorf, Meike Barche, Nicole Beikirch, Wolfgang Dröse und Stefanie Arendt für das gute Arbeitsklima, den regen Gedankenaustausch und den Spaß an der Zusammenarbeit.

Dank auch meinem Partner Gerold, meinem Bruder Alex und allen guten Freunden die immer für mich da waren.

Herzlicher Dank gilt auch meinen Eltern, ohne deren Hilfe mein Studium nicht möglich gewesen wäre und die mich in jeder Hinsicht immer unterstützt haben.