

**Zelluläre Funktionen und Interaktionen
des Translokations-assoziierten
Membranproteins 1 (TRAM1)**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Stephanie Grubenbecher

aus Münster

Januar 2008

Aus dem Institut für Neuropathologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: PD. Dr. C. Korth

Korreferent: Prof. Dr. D. Willbold

Tag der Abgabe: 11.01.2008

Tag der mündlichen Prüfung: 15.04.2008

Teile der Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Grubenbecher, S., Stüve, O., Hefter, H., Korth, C. 2005. Prion protein gene codon 129 modulates clinical course of neurological Wilson Disease. 2006. Neuroreport. 17(5):549-52

Inhaltsverzeichnis

I	Zelluläre Funktionen und Interaktionen des Tranlokations-assozierten Membranproteins 1 (TRAM1).....	5
1.	Einleitung	6
1.1.	Degenerative Hirnerkrankungen und Proteinfehlfaltung	6
1.1.1.	Das Prion Protein – die Prionenerkrankungen	8
1.1.2.	Das Amyloid Precursor Protein (APP) – die Alzheimer Krankheit.....	11
1.1.3.	Schizophrenie	13
1.2.	Konformationsmodulierende Proteine	14
1.3.	Das Translokations-assozierte Membranprotein 1 (TRAM1).....	15
1.4.	Ziele dieser Arbeit	19
2.	Material und Methoden	20
2.1.	SDS-PAGE	20
2.2.	Western Blot	21
2.3.	ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)	23
2.4.	ELIFA (Enzyme-linked Immunoflow Assay)	24
2.5.	Herstellung polyklonaler Antikörper	26
2.5.1.	Expression rekombinanter Proteine	27
2.6.	Zellkultur	31
2.6.1.	Zelllinien.....	31
2.6.2.	Transiente Transfektion	32
2.6.3.	Zellyse.....	37
2.6.4.	PrP ^{Sc} -Assay (Proteolytische Spaltung mittels Proteinase K)	38
2.6.5.	APP- und sAPP-Assay.....	39
2.7.	Dichtegradientenzentrifugation	42
2.8.	Pull Down und Co-Immunopräzipitation	44
2.8.1.	Pull Down Assay	45
2.8.2.	Co-Immunopräzipitation.....	46
3.	Ergebnisse.....	48
3.1.	Überexpression von TRAM1 in eukaryotischen Zelllinien.....	48
3.2.	Suppression von TRAM1 in eukaryotischen Zelllinien.....	49
3.3.	Auswirkungen der TRAM1-Expression auf die Prion Protein Expression und Konversion	51
3.4.	Einfluss der TRAM1-Suppression auf die APP-Prozessierung.....	54
3.5.	Einfluss von TRAM1 auf die Proteinsekretion.....	57
3.6.	TRAM1-Suppression und Zellvitalität	59
3.7.	Schizophrenie und TRAM1	60
3.8.	Expression von rekombinantem TRAM1 in <i>E. coli</i>	63
3.8.1.	Expression von rekombinantem Protein in <i>E. coli</i>	65
3.8.2.	Aufreinigung über Kationen-Austausch-Chromatographie.....	67
3.8.3.	Aufreinigung über Affinitäts-Chromatographie	68
3.8.4.	Aufreinigung über differentielle Löslichkeit.....	69
3.9.	TRAM1-Liganden	71
3.9.1.	Kandidatenliganden aus dem Translokon.....	71
3.9.2.	Neue TRAM1-Interaktionspartner	75

Inhaltsverzeichnis

4.	Diskussion	82
5.	Zusammenfassung.....	91
6.	Abstract (English)	93
II	Der Polymorphismus am Codon 129 des Prion Protein Gens (PRNP) beeinflusst den klinisch-neurologischen Verlauf von Wilson Disease	95
7.	Einleitung	96
8.	Material und Methoden	99
8.1.	Bestimmung des PrP-Polymorphismus M129V aus humanem Blut ...	99
9.	Ergebnisse	102
10.	Diskussion	106
11.	Zusammenfassung.....	109
12.	Abstract (English)	110
13.	Abkürzungsverzeichnis	111
14.	Literaturverzeichnis	114

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich zum einen mit dem Einfluss des Translokations-assoziierten Membranproteins 1 (TRAM1) auf zelluläre Prozesse und Interaktionen, die mit verschiedenen neuronalen und neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden können. Zum anderen wurde untersucht, wie sich der Polymorphismus am Codon 129 des Prion Protein Gens (*PRNP*) auf die neuronale Symptomatik der Kupferstoffwechselkrankheit Wilson Disease auswirkt. Da diese beiden Thematiken getrennt voneinander untersucht wurden, sollen sie auch in der vorliegenden Arbeit getrennt dargestellt werden.

I

**Zelluläre Funktionen und Interaktionen
des Translokations-assoziierten
Membranproteins1 (TRAM1)**

1. Einleitung

1.1. Degenerative Hirnerkrankungen und Proteinfehlfaltung

Degenerative Hirnerkrankungen sind gekennzeichnet durch massiven neuronalen Abbau im Gehirn. Dieser führt, meistens einhergehend mit der starken Abnahme geistiger Fähigkeiten, letztendlich zum Tod. Zu den bekanntesten degenerativen Hirnerkrankungen zählen die Alzheimer Krankheit, die Parkinson Erkrankung, die Huntington Erkrankung und die Prionenerkrankungen. Eine Gemeinsamkeit dieser Krankheiten ist die Aggregation bestimmter Proteine. So kommt es bei der Alzheimer Krankheit zu Ablagerungen aggregierten Amyloid β -Peptids ($A\beta$). Kennzeichnend für die Parkinson Erkrankung ist die Bildung der Lewy-Körperchen, hervorgerufen durch übermäßige Bildung des Proteins α -Synuclein.

Die Ursache der Huntington Erkrankung ist die Aggregation des Proteins Huntingtin, der Prionenerkrankungen die des Prion Proteins. Der mit den Proteinaggregationen einhergehende Zelltod führt im Gehirn zu Verlust von Nervengewebe. Die Erforschung degenerativer Hirnerkrankungen ist gesellschaftlich bedeutend. So sind derzeit etwa 6-8 % der über 65-Jährigen und etwa jeder Dritte der über 85-Jährigen von neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere der Alzheimer Krankheit betroffen.

Meistens führen Proteinfehlfaltungen oder Proteinfehlprozessierungen zur Bildung der Neurodegeneration-verursachenden Proteinaggregate. Proteinfehlfaltungen stellen bei der Proteinbiosynthese in Zellen ein normales und ständig auftretendes Ereignis dar. Daher haben Zellen verschiedene Mechanismen entwickelt, um fehlgefaltete Proteine umzufalten oder – sollte dieses nicht möglich sein – abzubauen. Ein solcher Mechanismus dieser Korrektur, der besonders bei zellulärem Stress angeschaltet wird, ist die ungefaltete Protein Antwort („Unfolded Protein Response“, UPR). Durch das erhöhte Vorhandensein ungefalteter oder fehlgefalteter

Proteine erfolgt zur Erhöhung der Faltungskapazität eine Umstrukturierung des endoplasmatischen Reticulums (ER) (SCHRODER und KAUFMAN, 2005).

Ein weiterer Mechanismus ist die ER-assoziierte Degradation (ERAD). Hier werden Proteine mit Hilfe von Chaperonen, Helferproteinen zur Kontrolle der Faltung und Oligomerisierung anderer Proteine, zunächst umgefaltet. Ist eine korrekte Faltung der Proteine nicht möglich, erfolgt die Retranslokation der Proteine in das Cytosol, wo sie durch das Peptid Ubiquitin markiert werden. Anschließend erfolgt der Abbau in Proteasomen. Letztere sind Proteinkomplexe im Cytosol oder im Nukleus der Zelle zur enzymatischen Zersetzung von Proteinen (ROMISCH, 2005). Wird das Gleichgewicht zwischen Proteinsynthese, Proteinfaltung und -degradation gestört, kann es in der Zelle zur Aggregation der Proteine kommen. Dieses stellt vor allem für neuronale Zellen ein Problem dar, da diese dank ihrer post-mitotischen Natur nicht auf die Beseitigung zellulären Schrotts über das System der Zellteilung und des damit verbundenen Zellsterbens zurückgreifen können.

Es konnte gezeigt werden, dass Proteinaggregate meistens eine Markierung mit Ubiquitin aufweisen. Allerdings scheint der Abbau vieler Proteinaggregate nicht über Proteasomen zu erfolgen. Tatsächlich scheinen bestimmte Proteinaggregate sogar den proteasomalen Abbau zu inhibieren (BENCE *et al.*, 2001; BENNETT *et al.*, 2005). In diesem Fall wird ein weiterer Mechanismus der Proteinbereinigung angeregt: der Abbau über das autophagosomale/ lysosomale System. Autophagie beinhaltet das Erkennen und die Aufnahme bestimmter cytosolischer Proteine oder Organellen in Autophagosomen. Diese fusionieren mit Lysosomen, in denen der Abbau erfolgt (LEVINE und KLIONSKY, 2004). Kommt es bei der Autophagie zu Störungen, zum Beispiel durch eine Überladung des Systems mit fehlgefalteten Proteinen oder durch Defekte des autophagosomalen Abbauweges, werden neurodegenerative Erkrankungen begünstigt. Am Beispiel der Autophagieproteine Atg5 und Atg7 konnte gezeigt werden, dass ein Ausschalten dieser Komponenten – und somit ein Ausschalten der Autophagie – zu Proteinaggregation und neurodegenerativen Erkrankungen führte (WOJCIK *et al.*, 2004; HARA *et al.*, 2006; KOMATSU *et al.*, 2006).

Bei neurodegenerativen Erkrankungen wird allgemein zwischen genetischen und sporadischen Formen unterschieden. Die genetischen Formen der Erkrankungen zeichnen sich durch bestimmte vererbare Mutationen der betreffenden Proteine aus, durch die es zu Fehlfaltungen und Aggregation kommt. Die meisten Fälle neurodegenerativer Erkrankungen sind jedoch sporadisch. Die fehlgefalteten Proteine weisen keine Mutationen auf, die deren Neigung zur Aggregation erklären können, obwohl dieselben Proteine in genetischen Formen dieser Krankheit aggregieren (PRUSINER, 2001; TAYLOR *et al.*, 2002). Ein Grund für sporadische neurodegenerative Erkrankungen könnte eine altersabhängige Abnahme der Chaperon-Funktion (PROCTOR *et al.*, 2005) und/ oder eine altersabhängige Beeinträchtigung der Proteinclearance sein.

1.1.1. Das Prion Protein – die Prionenerkrankungen

Prionenerkrankungen sind übertragbare, spongiforme, neurodegenerative Erkrankungen. Die bekanntesten Formen sind Scrapie bei Schafen, bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) bei Rindern und die Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung (CJD) sowie das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) bei Menschen. Symptome dieser Erkrankungen sind vor allem neurologischer Natur wie Demenz, Ataxie und Tremor. Hervorgerufen wird die Erkrankung durch die fehlgefaltete Isoform des Prion Proteins, PrP^{Sc}. Das Prion Protein ist ein 33-35 kDa großes Glykoprotein, welches hauptsächlich in Neuronen im Gehirn und im lymphatischen System gebildet wird.

In seiner normalen zellulären Form (PrP^C) liegt es vorwiegend in α -helikaler Struktur vor und ist über einen Glykosylphosphatidylinositol-(GPI-)Anker an die Zellmembran gebunden. In dieser Form ist das Protein Protease-sensitiv. Seine Funktion im gesunden Organismus ist derzeit noch weitgehend ungeklärt, einige Theorien vermuten eine Beteiligung an Signaltransduktion, Apoptose oder eine Rolle im Kupferstoffwechsel. In seiner Krankheits-assoziierten Form (PrP^{Sc}) liegt das Protein vorwiegend in β -Faltblatt-Form vor und aggregiert. Eine partielle Proteolyse mit Proteinase K führt nur zu einer N-Terminalen Verkürzung des Proteins auf 27-

30 kDa, wobei die Infektiösität des Proteins erhalten bleibt. PrP^C und PrP^{Sc} sind konformationelle Isoformen und weisen keinerlei Unterschiede in der Aminosäuresequenz auf (STAHL *et al.*, 1993). Die Unterschiede zwischen dem normalen Prion Protein (PrP^C) und dem Krankheits-assoziierten PrP^{Sc} sind allein in deren Konformation begründet.

Das Besondere an den Prionenerkrankungen ist die Tatsache, dass es sich um übertragbare neurodegenerative Erkrankungen handelt. Die Infektiösität wird hier allein der fehlgefalteten Prion-Protein-Form zugeschrieben, ohne Beteiligung viraler Nukleinsäuren (SAFAR *et al.*, 2005). Die an der Krankheit beteiligten fehlgefalteten Prion Proteine (PrP^{Sc}) werden als infektiöse Agentia als Prionen bezeichnet (PRUSINER, 1982). Die Umwandlung von PrP^C zu PrP^{Sc} erfolgt durch das infektiöse PrP^{Sc} selbst. Das so neu gebildete PrP^{Sc} katalysiert wiederum die Konversion weiterer zellulärer Prion Proteine. Dieses führt letztendlich zu einer Kettenreaktion-gleichen Replikation der Infektiösität (Abb. 1) (PRUSINER, 1998).

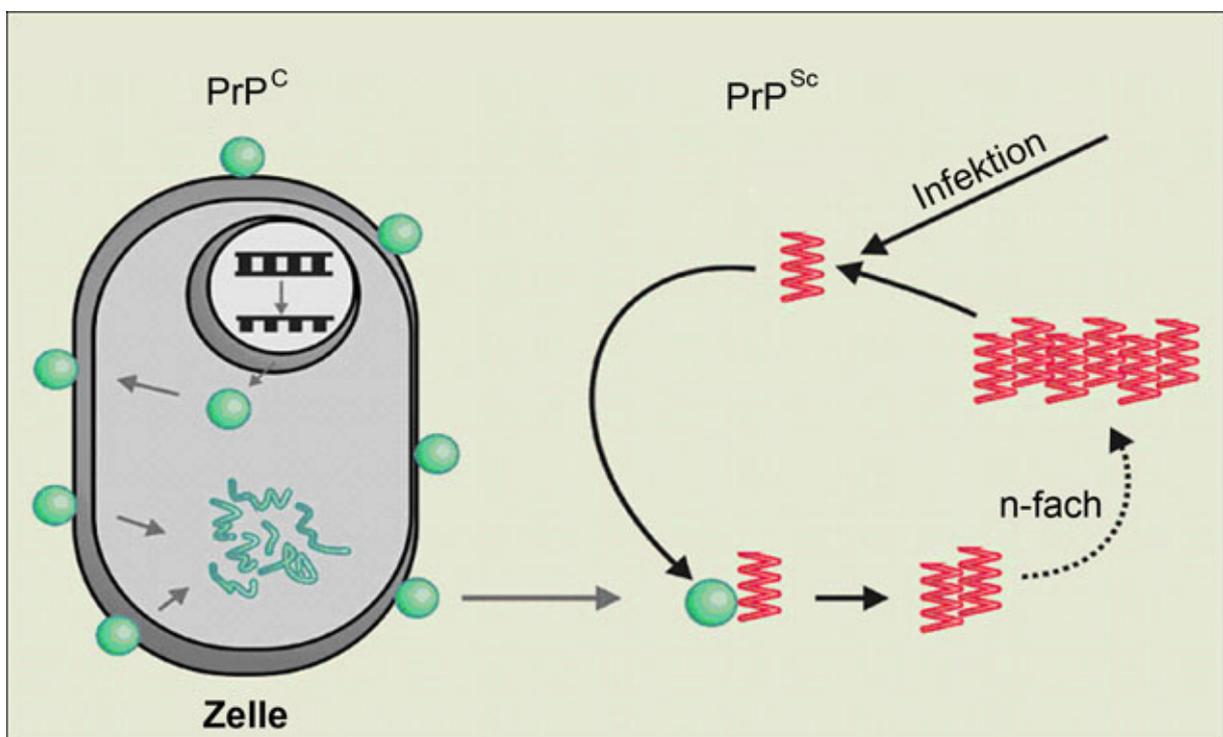


Abb. 1 Die Prionen-Replikation. Zelleigenes PrP^C wird durch eine Infektion mit PrP^{Sc} in die pathogene Isoform umgefaltet. Das so neu gebildete PrP^{Sc} katalysiert wiederum die Konversion weiterer zellulärer Prion Proteine. (Abbildung aus DUMPITAK und RIESNER, 2005)

Einleitung I

Die zelluläre Form des Prion Proteins (PrP^{C}) liegt in drei topologischen, konformationellen Isoformen vor. Neben der normalen sekretorischen, GPI-verankerten und vollständig translozierten Form ($^{\text{sec}}\text{PrP}$) existieren zwei Transmembranformen: $^{\text{CTM}}\text{PrP}$ und $^{\text{NTM}}\text{PrP}$ (HEGDE *et al.*, 1998b). Bei der CTM-Form des Prion Proteins befindet sich der C-Terminus, bei der NTM-Form der N-Terminus im ER-Lumen (Abb. 2).

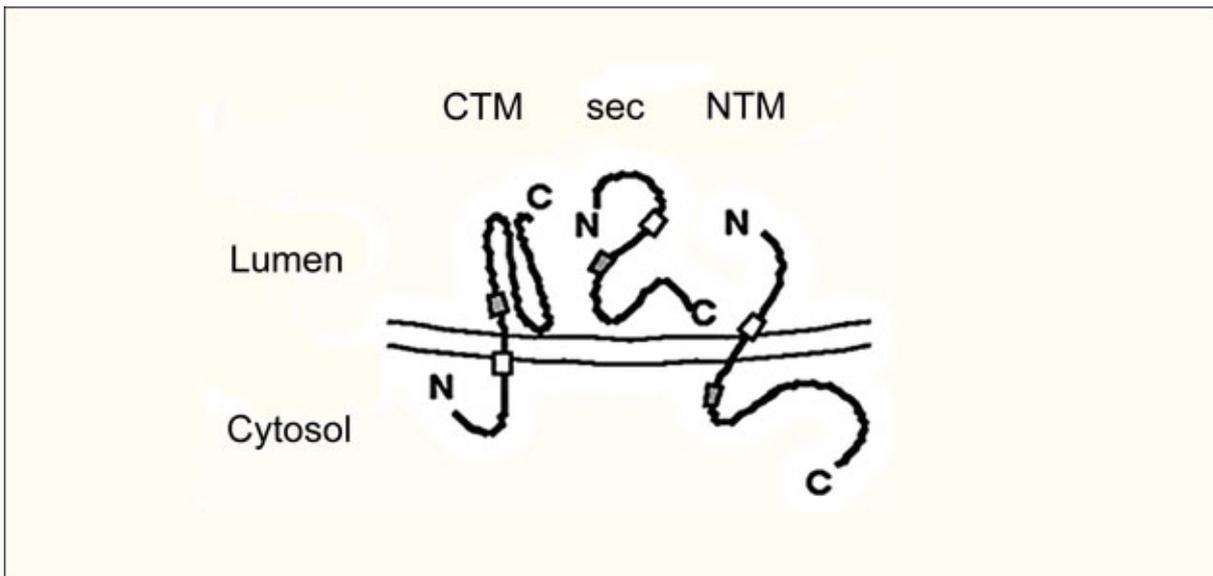


Abb. 2 Die verschiedenen PrP-Topologien. PrP^{C} liegt in drei verschiedenen Topologien vor. Die häufigste Topologie *in vivo* ist die sekretorische Form des PrP ($^{\text{sec}}\text{PrP}$). Das Protein wird vollständig transloziert und ist nach der Sekretion über einen GPI-Anker mit der Zellmembran verbunden. Die zwei anderen Formen des PrP stellen Transmembranproteine dar. Diese Proteine durchspannen die ER-Membran einmal. Ihre Unterscheidung liegt in der Orientierung dieser Insertion. Bei $^{\text{CTM}}\text{PrP}$ befindet sich der C-Terminus, bei $^{\text{NTM}}\text{PrP}$ der N-Terminus im ER-Lumen. (Abbildung aus HEGDE *et al.*, 1998a)

$^{\text{sec}}\text{PrP}$ und $^{\text{CTM}}\text{PrP}$ wurden *in vivo* nachgewiesen. Dabei wurde das Vorhandensein der cytotoxischen CTM-Isoform mit der Entwicklung der Prionenerkrankung und dem Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom in Verbindung gebracht (HEGDE *et al.*, 1998a; HEGDE *et al.*, 1999). Einen Einfluss auf die Bildung von $^{\text{CTM}}\text{PrP}$ scheint der PrP Polymorphismus M129V auszuüben, der zu einem Aminosäure-Austausch von Methonin zu Valin führt (OTT *et al.*, 2007).

1.1.2. Das Amyloid Precursor Protein (APP) – die Alzheimer Krankheit

Eine weitere neurodegenerative Erkrankung ist die Alzheimer Krankheit. Die Alzheimer Krankheit ist die weltweit häufigste Demenzerkrankung, gekennzeichnet durch den fortschreitenden Verlust mentaler Fähigkeiten. Auch hier wird der neuronale Zelltod durch die Aggregation eines Proteins, beziehungsweise eines Peptids hervorgerufen. Im Gegensatz zu den Prionenerkrankungen wird die Aggregation jedoch nicht durch eine Fehlfaltung des betroffenen Proteins hervorgerufen, sondern durch eine alternative Prozessierung des Amyloid Precursor Proteins (APP). APP ist ein integrales Membranprotein mit einer großen extrazellulären und einer kleineren intrazellulären Domäne. Die Prozessierung dieses Proteins erfolgt durch seine Spaltung durch Sekretasen (Abb. 3) (SELKOE, 1994). Hierbei gibt es zwei unterschiedliche Wege der Prozessierung, einen amyloidogenen und einen nicht-amyloidogenen, hervorgerufen durch die initiale Spaltung zweier unterschiedlicher Sekretasen. Der nicht-amyloidogene Weg wird durch die Spaltung von APP durch die α -Sekretase eingeleitet. Diese membrangebundene Metalloprotease (BUXBAUM *et al.*, 1998; LAMMICH *et al.*, 1999) schneidet APP innerhalb der A β -Domäne, wodurch lösliches APP (sAPP α) freigesetzt wird. Membranassoziiert verbleibt das 83 Aminosäuren große C-terminale Fragment (C83). Die Initiation des amyloidogenen Weges erfolgt durch die Spaltung des APP durch die β -Sekretase. Diese membrangebundene Aspartylprotease (SINHA *et al.*, 1999; VASSAR *et al.*, 1999; YAN *et al.*, 1999) schneidet APP außerhalb der Membran, wodurch lösliches sAPP β und das Membran gebundene C-terminale Fragment C99 entstehen.

Die weitere Prozessierung der C-terminalen Fragmente erfolgt durch die γ -Sekretase. Diese Aspartyl-Protease schneidet die beiden C-terminalen Fragmente innerhalb der Membrandomäne des APP (SELKOE und WOLFE, 2000). Wird das C99-Fragment durch die Sekretase geschnitten, so erhält man das für die Amyloid-Plaques verantwortliche 4 kDa große A β -Peptid. Die Prozessierung des C83-Fragment ergibt p3, eine kürzere, 3 kDa große Form des A β -Peptids, welche nicht zur Aggregation neigt. Übrig bleibt in beiden Fällen die intrazelluläre Domäne von APP (AICD – APP

intrazelluläre Domäne), dem eine Rolle als Signalmolekül bei der Genexpression nachgesagt wird (CAO und SUDHOF, 2001; BAEK *et al.*, 2002).

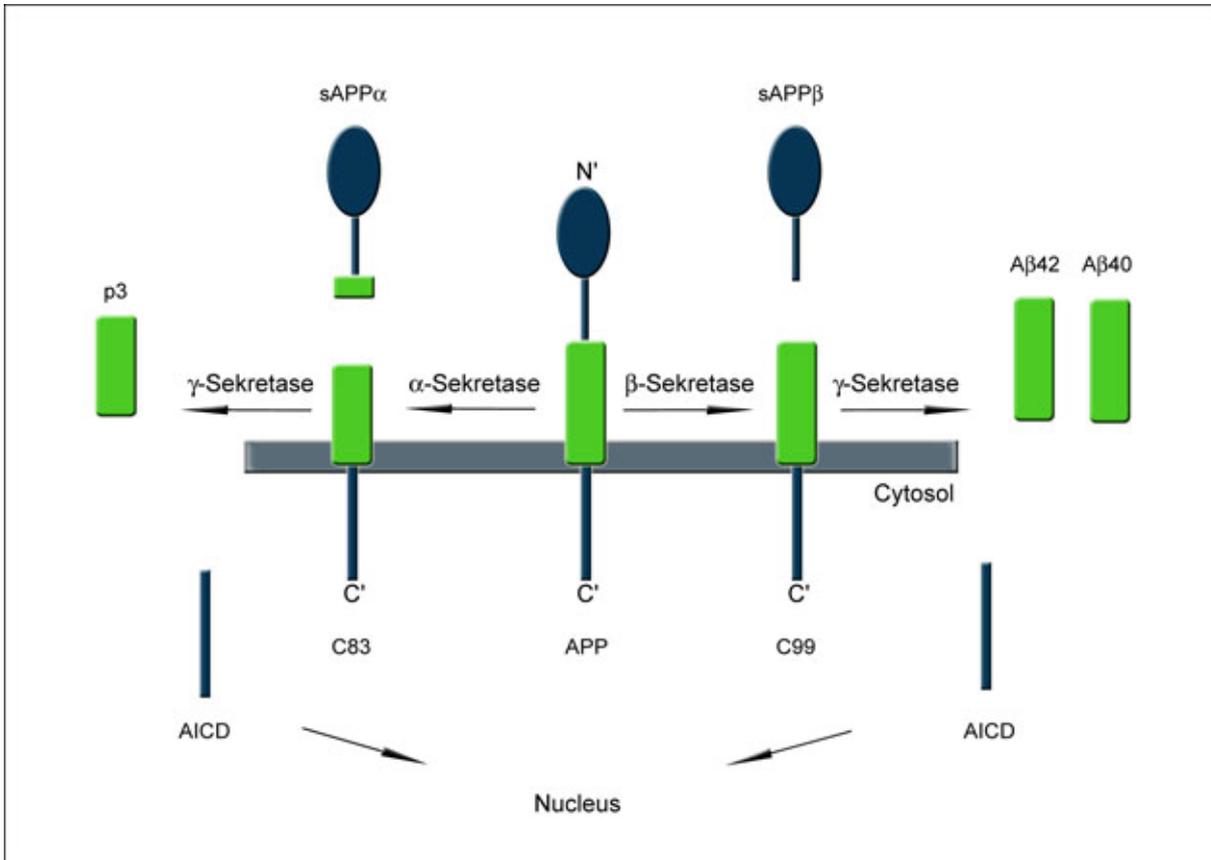


Abb. 3 APP-Prozessierung. Das Membranprotein APP wird durch die α - oder β -Sekretase gespalten, wodurch die löslichen Proteine sAPP α bzw. sAPP β sekretiert werden. Membranständig verbleiben die Peptide C83 bzw. C99, welche durch eine weitere Sekretase (γ) zu p3 bzw. A β gespalten werden. Diese werden ebenfalls sezerniert.

Die durch die β -Sekretase initiierte Prozessierung von APP resultiert hauptsächlich in zwei verschiedenen Formen des A β Peptids: A β_{1-40} und A β_{1-42} . Diese beiden Peptide sind auch unabhängig von der Alzheimer Krankheit im Gehirn zu finden, ihre Funktion ist jedoch nicht bekannt (SEUBERT *et al.*, 1992). Allerdings wird der A β_{1-42} -Form des Peptids eine höhere Pathogenität zugeschrieben, da es eine stärkere Tendenz hat, mit sich selbst zu assoziieren (BITAN *et al.*, 2003). Normalerweise ist das Verhältnis von A β_{1-40} zu A β_{1-42} etwa 10: 1, wodurch die Vermutung nahe liegt, dass eine Verschiebung zugunsten von A β_{1-42} die Entwicklung der Alzheimer Krankheit begünstigen könnte. Tatsächlich erhöhen Mutationen von APP und der

beteiligten Sekretasen, die zur genetischen Form der Alzheimer Krankheit führen, die Produktion von $A\beta_{1-42}$ und sein Verhältnis zu $A\beta_{1-40}$.

1.1.3. Schizophrenie

Im Gegensatz zu den degenerativen Hirnerkrankungen ist die Neurobiologie chronischer psychiatrischer Erkrankungen wie der Schizophrenie weitgehend unbekannt und steht erst am Anfang der Erforschung. Mit bis zu 1 % Prävalenz ist Schizophrenie eine weit verbreitete psychiatrische Erkrankung. Die Symptome dieser Krankheit sind Halluzinationen, Wahnvorstellungen, Verwirrung und kognitive Defizite. Die Abwesenheit spezifischer und eindeutiger biologischer Zusammenhänge dieser verbreiteten Störung führt dazu, dass derzeit eine Diagnose ausschließlich anhand klinischer Befragungen erfolgt. Die Identifizierung beteiligter Proteine wie in anderen chronischen Hirnerkrankungen, zum Beispiel dem Amyloid Precursor Protein bei der Alzheimer-Krankheit oder dem Prion Protein bei Prionenerkrankungen, steht noch aus.

Chronische psychiatrische Störungen zeigen eine starke phänotypische Heterogenität. Genetische Studien an Familien mit chronischen psychiatrischen Störungen gaben jedoch Hinweise auf molekulare neurobiologische Ursachen. Genetische Untersuchungen einer großen schottischen Familie zeigten, dass eine genetische Deletionsmutation im Gen des Proteins Disrupted in Schizophrenia 1 (*DISC 1*) unter anderem mit Schizophrenie oder affektiven Erkrankungen in Verbindung gebracht werden konnte (MILLAR *et al.*, 2000; MILLAR *et al.*, 2001). Zudem wurden noch weitere Proteine wie Dysbindin 1 und Neuregulin 1 anhand genetischer Studien als potentiell beteiligte Faktoren der Schizophrenie entdeckt (STEFANSSON *et al.*, 2002; STRAUB *et al.*, 2002). Von vielen dieser Gene wird vermutet, dass sie Änderungen der synaptischen Plastizität beeinflussen können, vor allem der NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) Rezeptor-vermittelten glutaminergen Transmission, was bei Schizophrenie zu Störungen des Glutamatstoffwechsels führen könnte (HARRISON und WEINBERGER, 2005). Trotz dieser starken Hinweise auf mögliche molekulare Ursachen psychiatrischer Erkrankungen fehlt derzeit noch der Beweis einer einheitlichen Neuropathologie.

1.2. Konformationsmodulierende Proteine

Die allgemeine Theorie der Proteinbiosynthese besagt, dass die Struktur von Proteinen durch ihre Primärstruktur, also die Aminosäuresequenz, bestimmt wird (ANFINSEN, 1973). Somit gäbe es nur eine korrekte Faltung (Konformation) und Membran-Orientierung (Topologie) der Proteine. Dennoch sind verschiedene Beispiele gefunden worden, in denen Proteine in zwei oder mehreren unterschiedlichen Topologien oder Konformationen vorliegen können (SKACH *et al.*, 1993; DUNLOP *et al.*, 1995; ZHANG und LING, 1995; LEVY, 1996). Konformere sind unterschiedliche, stabile Faltungen einer Polypeptidkette. Die Variationen sind unabhängig von Mutationen oder krankheitsbedingten Fehlfaltungen. Ein Beispiel für ein Protein mit unterschiedlichen Topologien ist das Prion Protein (1.1.1) (YOST *et al.*, 1990; HEGDE *et al.*, 1998a).

Ein möglicher Faktor für die Regulation dieser unterschiedlichen Topologien und Konformationen sind Chaperone. Diese sind an der Proteinfaltung direkt zu Beginn der Proteinbiosynthese beteiligt. Durch die Bindung von Chaperonen an die sich bildende Aminosäurekette, werden bestimmte Teile des Proteins daran gehindert, miteinander zu interagieren. So wird die Bildung der korrekten und finalen Faltung der Proteine erleichtert. Auch die physikalische Umgebung, der die Proteine während ihrer Bildung ausgesetzt sind, kann einen Einfluss auf die Faltung haben. Dieses wird gestützt durch Beobachtungen *in vitro*, dass sich verschiedene Lösungsmittel auf die Sekundärstruktur von Polypeptidketten auswirken (BUCK, 1998).

Es gilt derzeit als wahrscheinlich, dass neben den Chaperonen noch weitere Proteine an der Bildung verschiedener Protein-Konformationen oder -Topologien beteiligt sind. In Frage kommen Translokations-assoziierte Faktoren (TraF), Glykoproteine unbekannter Identität, deren Beteiligung an der Biogenese der verschiedenen PrP-Isoformen (^{sec}PrP, ^{CTM}PrP, ^{NTM}PrP) *in vitro* gezeigt werden konnte (HEGDE *et al.*, 1998b). Nach Depletion derartiger Glykoproteine in einem zellfreien Proteinsynthese-System wurde beobachtet, dass vermehrt das cytotoxische ^{CTM}PrP gebildet wurde. Nach Zugabe der zuvor depletierten Glykoproteine verschob sich das

Verhältnis zugunsten von ^{NTM}PrP und der sekretorischen Form (^{sec}PrP) (Abb. 4) (HEGDE *et al.*, 1998b). Somit ist eine Beteiligung der TraF an der Bildung verschiedener Protein-Konformationen beziehungsweise ihrer Topologien auch *in vivo* wahrscheinlich.

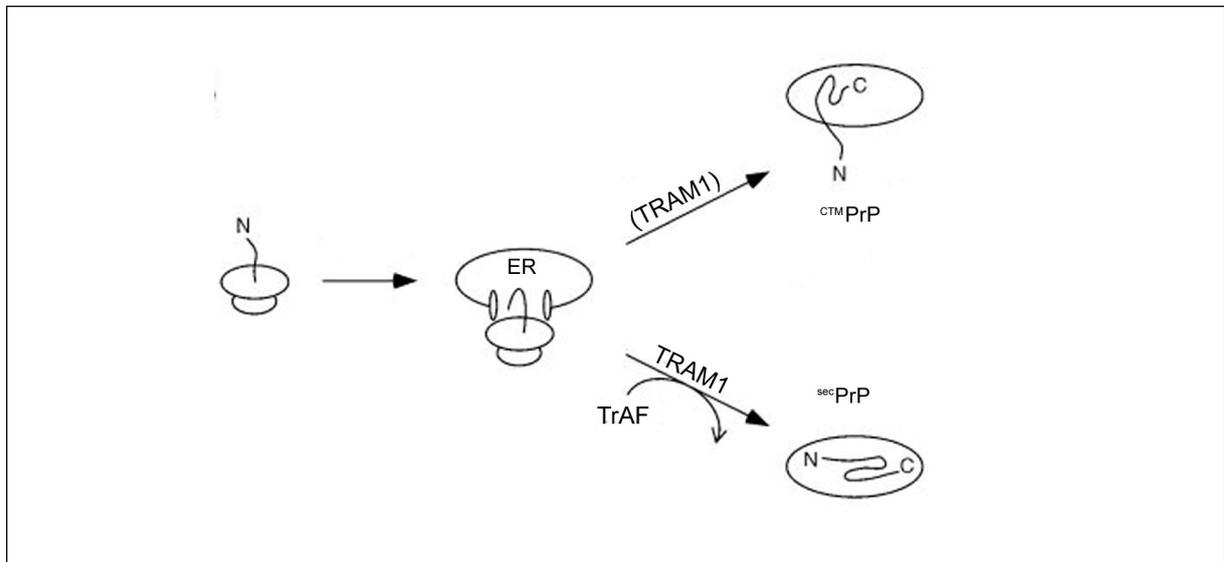


Abb. 4 Beteiligung von TraF an der Ausbildung verschiedener Topologien von PrP. In der Anwesenheit Translokations-assoziiierter Faktoren (TraF) wird die sekretorische Form des Prion Proteins (^{sec}PrP) gebildet. Die Depletion von TraF aus einem zellfreien Rekonstitutionssystem hat eine ausschließliche Bildung des transmembranen ^{CTM}PrP zur Folge. Die Bildung von ^{NTM}PrP ist hier nicht abgebildet, diese würde ebenfalls nur in Anwesenheit von TraF erfolgen. (Abbildung nach HEGDE *et al.*, 1998b)

1.3. Das Translokations-assoziierte Membranprotein1 (TRAM1)

Das Translokations-assoziierte Membranprotein1 (TRAM1, **TR**anslocating chain-**A**ssociating **M**embrane protein1) ist ein 36 kDa großes Glykoprotein (GORLICH *et al.*, 1992). Es durchspannt das endoplasmatische Retikulum (ER) mit acht (GORLICH *et al.*, 1992) beziehungsweise neun Transmembrandomänen (nach einem Programm zur Klassifikation und Sekundärstruktur-Vorhersage von Membranproteinen; <http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp>) (Abb. 5). Die Transmembrandomänen von TRAM1 weisen Homologien zu den Transmembrandomänen der Proteine Sphingosin N-Acyltransferase Lag1 (Bestandteil der Ceramidsynthese und Regulator

Einleitung I

der Lebensdauer und des Alterns in Hefen) und humanem CLN8, welches als Ursache der neuronalen Ceroid-Lipofuszinose 8 gilt, auf (WINTER und PONTING, 2002).

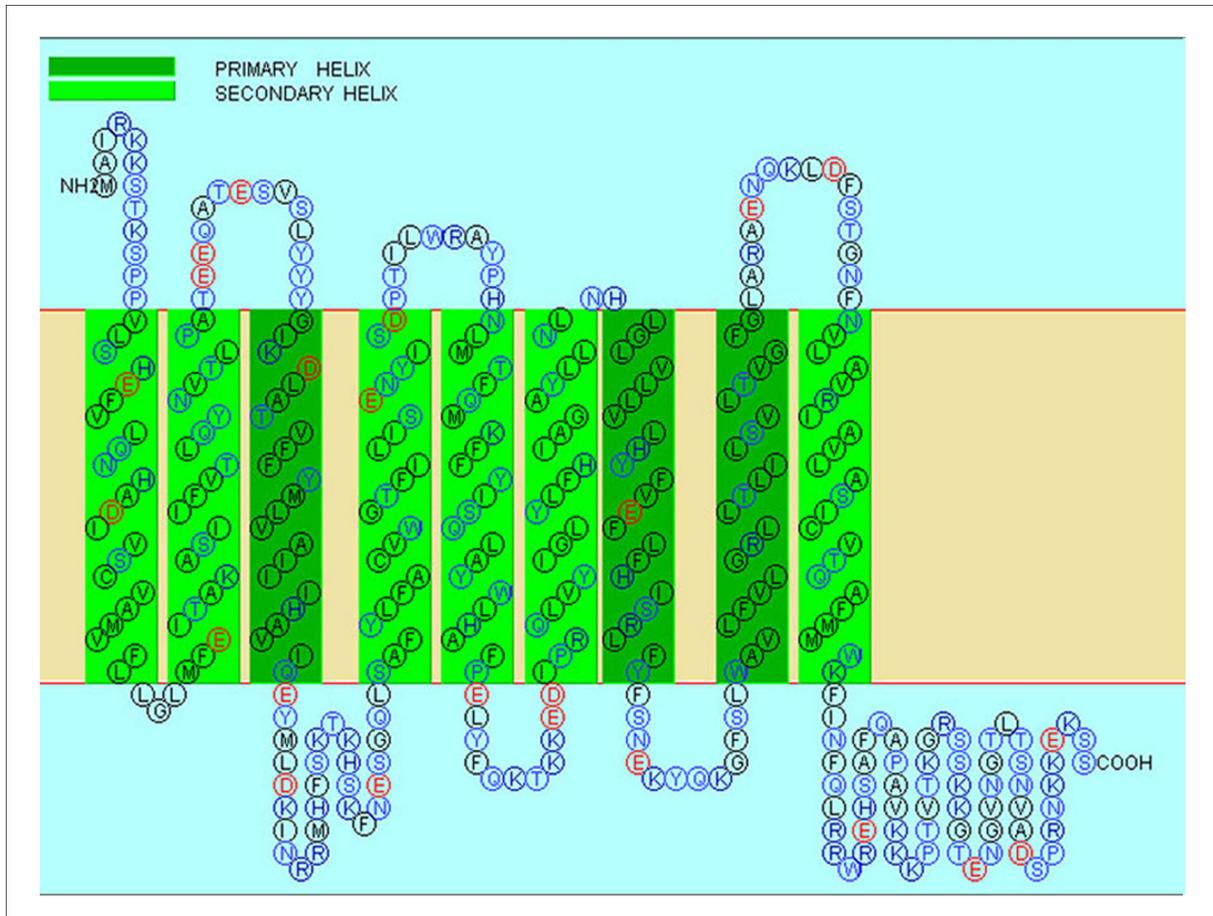


Abb. 5 Aminosäurestruktur von TRAM1. Abbildung nach einem Programm zur Klassifikation und Sekundärstruktur-Vorhersage von Membranproteinen (<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp>).

Zusammen mit dem Sec61p Komplex und dem Signalerkennungs-Partikelrezeptor (SRP, Signal Recognition Particle Receptor) bildet TRAM1 das Grundgerüst für den Proteintransport in das ER (GORLICH und RAPOPORT, 1993; OLIVER *et al.*, 1995; VOIGT *et al.*, 1996). Während Sec61p und SRP für die Translokation vieler sekretorischer und membrangebundener Proteine ausreichend sind, benötigen einige sekretorische Proteine TRAM1 für den Übergang in das endoplasmatische Reticulum (GORLICH *et al.*, 1992; VOIGT *et al.*, 1996). Der Unterschied zwischen TRAM1-abhängigen und -unabhängigen Proteinen wird begründet durch Unterschiede in der Struktur ihrer Signalsequenzen. Hierbei sind die geladene NH₂-terminale Region und der

hydrophobe Kern der Signalsequenz wichtige Determinanten der TRAM1-Abhängigkeit (VOIGT *et al.*, 1996).

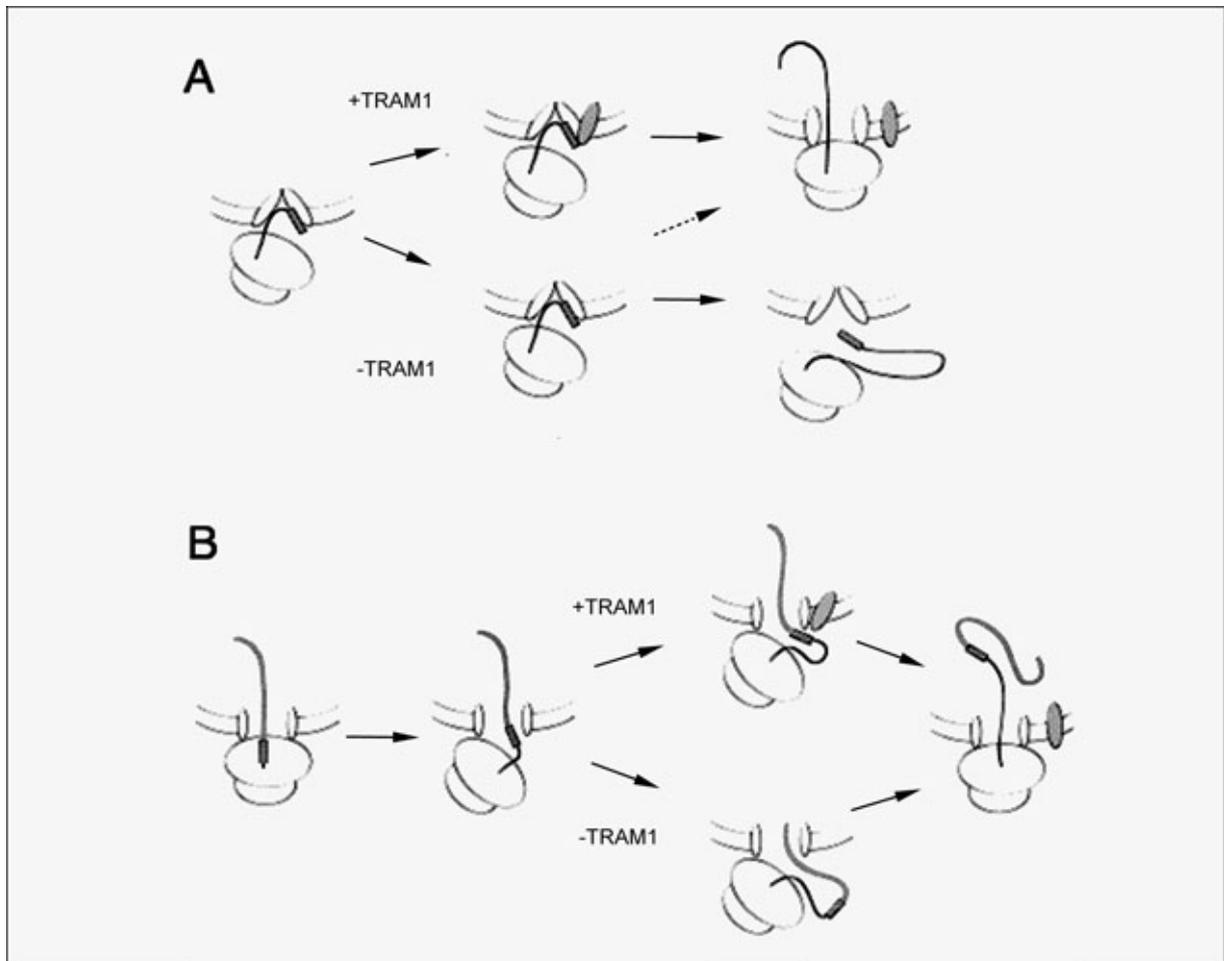


Abb. 6 Die Rolle von TRAM1 während der Translokation naszierender Peptide. A: In Anwesenheit von TRAM1 (+TRAM1) wird die Signalsequenz gebunden, es entsteht eine enge Bindung von Ribosom und Translokon. Die Aminosäurekette wird transloziert. In Abwesenheit von TRAM1 (-TRAM1) kann in manchen Fällen die Bindung des Ribosoms an das Translokon nicht korrekt erfolgen, wodurch eine Translokation nicht stattfindet. **B:** Bei Erscheinen einer Signalsequenz wird diese in Anwesenheit von TRAM1 (+TRAM1) gebunden und die enge Bindung zwischen Ribosom und Translokon bleibt bestehen. Nur ein geringer Teil der naszierenden Kette wird dem Cytosol ausgesetzt. In Abwesenheit von TRAM1 (-TRAM1) bindet die Pausen-Sequenz nicht und die Aminosäurekette wird unkontrolliert dem reduzierenden Milieu des Cytosols ausgesetzt. (Abbildung aus HEGDE *et al.*, 1998c)

Eine wichtige Funktion von TRAM1 scheint die zeitliche Kontrolle zu sein, wie lange die naszierende Kette während der Translokation dem Cytosol ausgesetzt ist. Zu Beginn der Translokation wird dieses durch die Bindung der Signalsequenz an TRAM1 erreicht, wodurch das Ribosom eng an die Translokationsseite gebunden

wird. Die Aminosäurekette tritt direkt vom Ribosom in das ER über, ohne der reduzierenden Umgebung des Cytosols ausgesetzt zu sein (Abb. 6A) (HEGDE *et al.*, 1998c). Ein weiterer Zeitpunkt, zu dem die naszierende Kette in Kontakt mit dem Cytosol kommen kann, ist während bestimmter Translokations-Pausen. Zusätzlich zu den initiiierenden Signalsequenzen beinhalten die Aminosäureketten einiger Proteine sogenannte Pausen-Sequenzen (CHUCK und LINGAPPA, 1992). Diese wurden zuerst bei dem ungewöhnlich langen und hydrophoben sekretorischen Protein Apolipoprotein B entdeckt (CHUCK *et al.*, 1990).

Während dieser Translokations-Pausen erfolgt zwar die weitere Bildung der Aminosäurekette, die Translokation in das ER ist jedoch unterbrochen. TRAM1 bindet an die Pausen-Sequenzen, wodurch das Ribosom weiterhin eng an das Translokation gebunden bleibt. Entfällt diese Bindung, wird ein Teil der schon translozierten Kette dem Cytosol ausgesetzt (Abb. 6B) (HEGDE *et al.*, 1998c). Somit hilft TRAM1, die Cytosol-Exposition der pausierenden sekretorischen Proteine auf spezifische Domänen zu limitieren und die anderen Regionen der Kette davor zu schützen, dem reduzierenden Milieu des Cytosol ausgesetzt zu sein. Diese Eigenschaften von TRAM1 machen seine Rolle als Konformations-regulierendes Protein wahrscheinlich.

1.4. Ziele dieser Arbeit

In vitro-Studien und zahlreiche Modelle haben gezeigt, dass TRAM1 eine entscheidende Rolle in der Translokation einiger Proteine spielt. Zudem könnte TRAM1 ein Faktor der Proteinfaltung und bei der Bildung verschiedener Proteinkonformeren sein. Dieses würde eine Rolle in der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen wahrscheinlich machen. Studien zu diesem Protein erfolgten bisher ausschließlich in zellfreien Rekonstitutionssystemen. Hier sollte die Funktion des TRAM1 Proteins auch in Zusammenhang mit verschiedenen Modellen neurodegenerativer Erkrankungen in der lebenden Zelle untersucht werden. Speziell sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Hat TRAM1 einen Einfluss auf die Bildung von ^{CTM}PrP und somit auf die Bildung von PrP^{Sc} im Zellkulturmodell?
- Hat TRAM1 eine Auswirkung auf die APP-Prozessierung?
- Wird die Antikörpersekretion in Zellen von TRAM1 beeinflusst?
- Hat TRAM1 Einfluss auf die Expression von Proteinen, die mit Schizophrenie in Zusammenhang gebracht werden?
- Welche Interaktionspartner von TRAM1 gibt es?

2. Material und Methoden

2.1. SDS-PAGE

Material und Chemikalien

Name	Reinheitsgrad	Firma
Bromphenolblau für Elektrophorese		Sigma # B5525
Criterion Tris-HCl Gel 4–20 %		BioRad # 345-0033
Criterion Tris-HCl Gel 7,5 %		BioRad # 345-0006
Glycerol UltraPure™ Glycerol	≥ 99,5 %	Invitrogen # 15514
Glycin für Elektrophorese	≥ 99 %	Sigma # G8898
β -Mercaptoethanol für Molekularbiologie	≥ 98 %	Sigma # M3148
PageRuler Prestained Protein Ladder		Fermentas #SM0671
Rotiphorese® Gel 30 Acrylamid- und Bisacrylamidstammlösung (37,5:1)		Roth # 3029
SDS Natriumdodecylsulfat	≥ 99 %	Roth # CN30
TRIS Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	p.a.	Merck # 1.08382

Rezepte

Elektrophorese-Puffer		Proben-Puffer (4x)	
25mM Tris		100mM Tris-Cl pH6.8	
250mM Glycin		6 % SDS	
0,1 % SDS		40 % Glycerol	
		4 % β-Mercaptoethanol	
		0,1 % Bromphenolblau	

Zur Auftrennung von Proteinen hinsichtlich ihrer molekularen Größe wurde eine denaturierende diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI (1970) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll für Tris-Glycin SDS-PAGE von SAMBROOK und RUSSELL (2001). In manchen Fällen wurden fertig gegossene Gele der Firma BioRad (Criterion Precast) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100 V für ca. 2 h.

2.2. Western Blot

Material und Chemikalien

Name		Reinheitsgrad	Firma	
Blottingpapier	GB003 0,8mm		Whatman	# 10426890
ECL	Western Blotting Detection Reagents		Amersham	# RPN2209
Glycin	für die Elektrophorese	≥ 99 %	Sigma	# G8898
Hyperfilm ECL			Amersham	# RPN2209
KCl	Kaliumchlorid	≥ 99 %	Sigma	# P9541
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat	≥ 99 %	Sigma	# P0662
MeOH	Methanol	p.a.	Merck	# 1.06009
Milchpulver	Skim Milk Powder		OXOID	# LP0031
NaCl	Natriumchlorid	≥ 99,5 %	Fluka	# 71381
Na ₂ HPO ₄	Natriumdihydrogenphosphat	≥ 99 %	Sigma	# S0751
PVDF	Immobilon-P Transfer Membran 0,45µm		Millipore	# IPVH00010
SDS	Natriumdodecylsulfat	≥ 99 %	Roth	# CN30
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	p.a.	Merck	# 1.08382
TWEEN®20	Polyethylenglycol-Sorbitan- Monolaurat		Sigma	# P5927

Antikörper in PBS-T

rab α Actin	Sigma	# A2066	1: 5.000
m α sAPP(A β) (IC16)	(PRIKULIS und KORTH, unveröffentlicht)		1: 2.500 (TBS-T)
rab α APP (CT152Z)	SISODIA <i>et al.</i> , 1993		1: 3.500 (TBS-T)
rab α COMT	Chemicon	# AB5873	1: 10.000
rab α GST	Biozol	# ab21070	1: 500
rab α G-6-PDH	Sigma	# A9521	1: 10.000
m α His-Tag	Cell Signaling	# 2366	1: 1.000
rab α Neuregulin 1 HRG (C-20)	Santa Cruz	# sc-348	1: 5.000
rab α PSA	(KORTH <i>et al.</i> , unveröffentlicht)		1: 10.000
m α PrP (W226)	(PETSCH und STITZ, unveröffentlicht)		1: 10.000
polyklonale Hühnerantikörper	(LINGAPPA <i>et al.</i> , unveröffentlicht)		1: 10.000
ch α TRAMC	(LINGAPPA <i>et al.</i> , unveröffentlicht)		1: 10.000
m α Tyrosin Hydroxylase	Chemicon	# MAB318	1: 5.000
rab α chPOD	Pierce	# 31401	1: 50.000
goat α mPOD	Pierce	# 31444	1: 50.000
goat α rabPOD	Pierce	# 31460	1: 50.000
goat α mHRP (für APP-Assay)	Jackson ImmunoResearch	# 715-035-150	1: 5.000 (TBS-T)
donkey α rabHRP(für APP-Assay)	Jackson ImmunoResearch	# 711-035-152	1: 10.000 (TBS-T)

Rezepte

Transferpuffer		PBS-T		Milchpulver	
24 mM	Tris	137 mM	NaCl	5%	in PBS-T
192 mM	Glycin	2,7 mM	KCl	ECL-Lösung	
20%	MeOH	10 mM	Na ₂ HPO ₄		
		2 mM	KH ₂ PO ₄	1 ml	pro Blot
		0,05 %	TWEEN-20		

Zur spezifischen Detektion der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurde das Western Blot Verfahren angewandt. Hierbei werden die Proteine aus einem Gel durch ein elektrisches Feld auf eine Membran übertragen. Auf Grund hydrophober Wechselwirkungen und einer kleinen Porengröße bleiben die Proteine auf der Membranoberfläche haften und können mittels spezifischer Antikörper detektiert werden. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten.

Zum Proteintransfer wurde das Nass-Blot-Verfahren angewandt. Hierbei wird das „Sandwich“ aus Membran, Gel und Filterpapieren vollständig in eine Kammer mit Transferpuffer eingetaucht, an die das elektrische Feld angelegt ist. Der Transfer erfolgte bei 180 mA und 4 °C über Nacht. Nach dem Transfer wurden die freien Protein-Bindungsstellen der Membran für 1 h mit 5 % Milchpulver in PBS-T blockiert. Dieses verhindert die unspezifische Bindung der verwendeten Antikörper an die Membran. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte in einer Verdünnung in PBS-T für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht. Die anschließenden Waschschrte in PBS-T (3 x 10 Minuten) entfernen überschüssige Antikörper von der Membran. Die Inkubation des Sekundärantikörpers erfolgte in einer Verdünnung von 1 : 50.000 in PBS-T für 1 h bei Raumtemperatur. Weitere Waschschrte (3 x 10 Minuten in PBS-T) sorgen für die Entfernung überschüssiger, unspezifisch gebundener Sekundärantikörper von der Membran. Zur Detektion des über den Primärantikörper gebundenen Sekundärantikörpers wurde die Membran mit ECL-Lösung inkubiert. Diese reagiert mit dem Enzym Peroxydase (POD), welches an den Sekundärantikörper gekoppelt ist. Das Signal wurde mittels Röntgenfilm detektiert.

2.3. ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Material und Chemikalien

Name		Reinheitsgrad	Firma	
KCl	Kaliumchlorid	≥ 99 %	Sigma	# P9541
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat	≥ 99 %	Sigma	# P0662
MaxiSorp	96-Well Platten		Nunc	# 456537
NaCl	Natriumchlorid	≥ 99,5 %	Fluka	# 71381
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat	≥ 99 %	Sigma	# S7795
NaHCO ₃	Natriumbicarbonat	≥ 99,5 %	Sigma	# S6297
Na ₂ HPO ₄	Natriumdihydrogenphosphat	≥ 99 %	Sigma	# S0751
Schwefelsäure		25 %	Merck	# 1007161000
TMB	Substrate Reagent Set BD OptEIA™		BD Biosciences	# 555214
TWEEN®20	Polyethylenglycol-Sorbitan-Monolaurat		Sigma	# P5927

Rezepte

PBS-T		Carbonatpuffer pH9,6	
137 mM	NaCl	0,05 M	Na ₂ CO ₃
2,7 mM	KCl	0,05 M	NaHCO ₃
10 mM	Na ₂ HPO ₄		
2 mM	KH ₂ PO ₄		
0,05 %	TWEEN-20		

Zur Bestimmung des Antikörpergehaltes in Hybridomazellüberständen wurde der indirekte ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) angewendet. Beim indirekten ELISA wird ein Antigen an eine feste Phase gebunden und mit einer antikörperhaltigen Lösung inkubiert. Der Nachweis erfolgt über einen Sekundärantikörper, der an den Primärantikörper bindet und mit einer Farbreaktion nachgewiesen werden kann.

96-Well Platten wurden mit rekombinantem Maus-PrP in Carbonatpuffer beschichtet und mit 5 % BSA geblockt. Anschließend wurde 50 µl Hybridomaüberstand pro Well

Material und Methoden I

hinzugegeben und bei Raumtemperatur für etwa zwei Stunden inkubiert. Nach drei Waschschritten mit PBS-T (200 µl pro Well) für jeweils 10 Minuten wurde 50 µl Sekundärantikörperlösung (goat α mousePOD, 1:1.000 in PBS-T) pro Well hinzugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem, gründlichem Waschen mit PBS-T erfolgte die Detektion mittels des TMB (Tetramethyl-benzidine) Substrates BD OptEIA™ (BD Biosciences) (100 µl pro Well). Die Reaktion des Substrates mit der Peroxidase des Sekundärantikörpers konnte über eine blaue Färbung beobachtet werden. Anschließend wurde die Reaktion mittels 100 µl 25 %iger Schwefelsäure gestoppt. Es erfolgte ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die Farbintensität wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

2.4. ELIFA (Enzyme-linked Immunoflow Assay)

Material und Chemikalien

Name	Reinheitsgrad	Firma
BSA ECL Easy-Titer Hyperfilm ECL	≥ 98%	Sigma # A7906 Amersham # RPN2209 Pierce # 77000 Amersham # RPN2209
KCl	≥ 99%	Sigma # P9541
KH ₂ PO ₄	≥ 99%	Sigma # P0662
NaCl	≥ 99,5%	Fluka # 71381
Na ₂ HPO ₄	≥ 99%	Sigma # S0751
PVDF TWEEN®20		Millipore # IPVH00010 Sigma # P5927

Rezepte

PBS-T	
137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
10 mM	Na ₂ HPO ₄
2 mM	KH ₂ PO ₄
0,05 %	TWEEN-20

Der ELIFA (Enzyme-linked Immunoflow Assay) ist eine Art Dot Blot Methode, bei der eine Nitrozellulose in eine 96-Well-Proben-Auftragsapparatur eingespannt wird. Zur Untersuchung der Bindung der Antikörper aus den Hybridomaüberständen an ihr Antigen wurde 1 µg rekombinantes PrP-Protein pro Well (jeweils 50 µl) mit der Dot Blot Apparatur (ELIFA, Pierce) auf eine Nitrocellulose-Membran gesogen (Abb. 7).

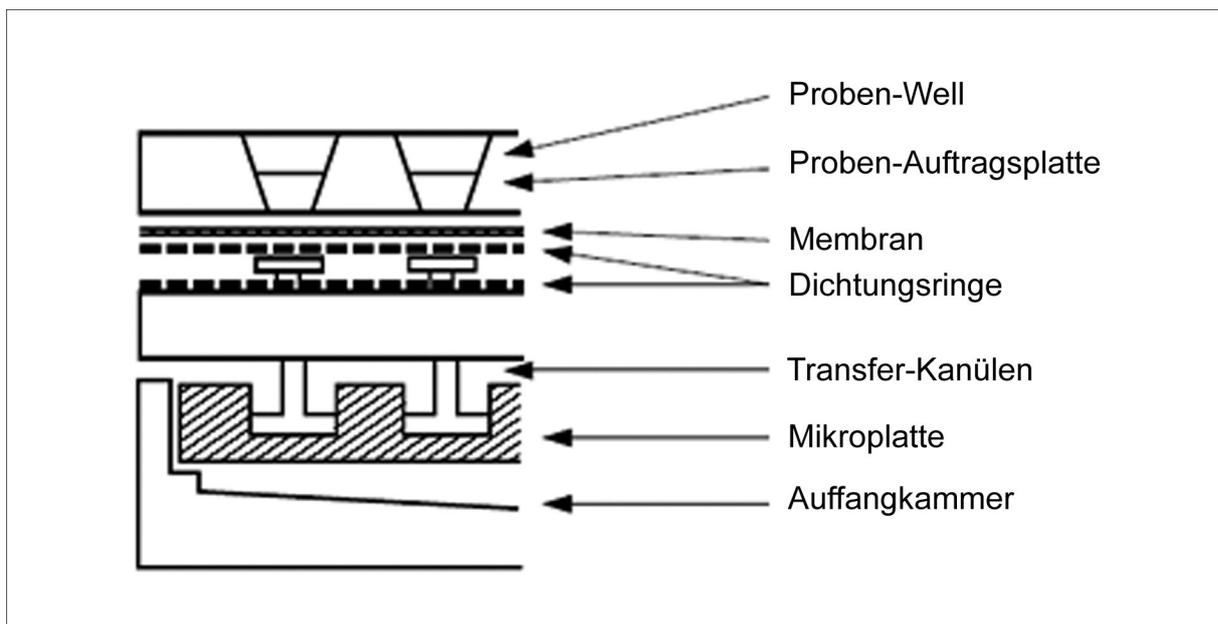


Abb. 7 Easy Titer ELIFA-Apparatur. (Abbildung nach Pierce)

Nach einem kurzen Waschschrift mit PBS-T wurde zum Blockieren der freien Bindungsstellen pro Well 200 µl 5 % BSA-Lösung aufgetragen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Hybridomaüberstände (50 µl/ Well) aufgetragen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach

drei gründlichen Waschsritten mit PBS-T wurde die Membran der Apparatur entnommen und erneut mit PBS-T gewaschen. Die Inkubation des Sekundärantikörpers (goat α mPOD, 1:50.000 in PBS-T) erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Nach weiteren Waschsritten (3 x 10 Minuten in PBS-T) zur Entfernung überschüssiger, unspezifisch gebundener Sekundärantikörper von der Membran, wurde die Membran zur Detektion des über den Primärantikörper gebundenen Sekundärantikörpers mit ECL-Lösung inkubiert. Diese reagiert mit dem Enzym Peroxydase (POD), welches an den Sekundärantikörper gekoppelt ist. Das Signal wurde mittels Röntgenfilm detektiert.

2.5. Herstellung polyklonaler Antikörper

Zur Herstellung von polyklonalem PSA-Antiserum wurde einem Kaninchen (New Zealand White Rabbit) nach der Abnahme des Präimmuserums 100 μ g PSA-Peptid (MYLTKFQQKNAATEDLWESLENAC), gekoppelt an KLH (keyhole limpet hemocyanin), subkutan injiziert. Die Immunisierung erfolgte zweimal in einem Abstand von vier Wochen. Die humorale, induzierte Immunantwort des Antigens wurde mittels Western Blot im Vergleich zum Präimmuserum analysiert.

Alle verwendeten polyklonalen Hühnerantikörper gegen Proteine des Translokons (Tabelle 1, Kapitel 3.9.1) wurden von der Arbeitsgruppe von Vishwanath R. Lingappa (MD, PhD) in San Francisco hergestellt. Ein Protokoll hierzu findet sich auch in KLINGENSTEIN *et al.* (2006).

2.5.1. Expression rekombinanter Proteine

Material und Chemikalien

Plasmide		Firma	
pET-11a	prokaryotischer Expressionsvektor	Novagen	# 69436-3
pGEX-4T-3	prokaryotischer GST-Fusionsvektor	GE Healthcare	# 27-4583-01
Bakterienstämme		Firma	
BL21	Rosetta™(DE3) Competent <i>E. coli</i>	Novagen	# 70954-3
DH5α	Subcloning Efficiency™ DH5™ Competent Cells	Invitrogen	# 18265-017
PCR-Cycler		Firma	
T3	Thermocycler	Biometra	

Name		Reinheitsgrad	Firma	
<i>Bam</i> HI	Restriktionsenzym	20.000 u/ml	NEB	# R0136S
Carbenicillin	Carbenicillin Disodium	> 90 %	Duchefa	# C0109.0005
Chloramphenicol		> 98 %	Duchefa	# C0113.0025
dNTP-Mix	Deoxynucleosid-Triphosphat-Set		Roche	# 11969064001
<i>Eco</i> RI	Restriktionsenzym	20.000 u/ml	NEB	# R0101S
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure - Dinatriumsalz - Dihydrat	≥ 99 %	AppliChem	# A3553
Expand High Fidelity	PCR System/ DNA Polymerase für Mikrobiologie	3,5 u/μl	Roche	# 11732641001
Hefe-Extrakt			Fluka	# 70161
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid	> 99 %	Duchefa	# I1401.0001
Lysozym	aus Hühnereiweiß	~ 95 %	Sigma	# L6876
MaxiPrep Kit	HiSpeed Plasmid Maxi Kit für Molekularbiologie	≥ 98 %	QiaGen	# 12662
2-Mercaptoethanol		≥ 99,5 %	Sigma	# M3148
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure	≥ 99,5 %	Sigma	# M5162
NaCl	Natriumchlorid	≥ 99,5 %	Fluka	# 71381
<i>Nco</i> I	Restriktionsenzym	10.000 u/ml	NEB	# R0193S
<i>Nde</i> I	Restriktionsenzym	20.000 u/ml	NEB	# R0111S
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluorid	≥ 98,5 %	Sigma	# P7626
T4 DNA Ligase		400.000 u/ml	NEB	# M0202S
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	p.a.	Merck	# 1.08382
Triton®X-100	Polyethylenglycol- <i>tert</i> -octylphenylether		Sigma	# T9284
Trypton	enzymatisch verdaute Proteine aus Casein		Fluka	# 95039
Urea	Harnstoff	≥ 99,5 %	Fluka	# 51459
Vent _R ®	DNA Polymerase	2.000 u/ml	NEB	# M0254S
<i>Xho</i> I	Restriktionsenzym	20.000 u/ml	NEB	# R0146S

Material und Methoden I

Primer		Reinigung	Firma
A(5')	hTRM1(101-126)/ <i>BamHI</i> cgatccggatccatgttgataaaattaacagg cgaatgc	HPSF	MWG
A(3')	hTRM1(101-126)/ <i>EcoRI</i> cgatccgaattctattaactaagctgaccagatt cattaaacttg	HPSF	MWG
B(5')	hTRM1(317-374)/ <i>BamHI</i> cgatccggatccaatttcagctcgaaggtgga ggg	HPSF	MWG
B(3')	hTRM1(317-374)/ <i>EcoRI</i> cgatccgaattctcattatgaagatttctctttttatt ccggggag	HPSF	MWG
C(5')	HIS-myc-TRAM/ <i>NcoI/KpnI</i> catgga ccatgggggtacc catgcatcaccatca ccatcacgaacaaaaactcatctcagaagagg atctgatggcgattcgcaagaaaagc	PAGE	Biomers
C/D(3')	hu TRAM1/ <i>BamHI/XhoI</i> aaagcggatccctcgagttatgaagatttctctt ttttattccgg	HPSF	MWG
D(5')	Hm TRAM1/ <i>XbaI/NdeI</i> tttccctctagacatatgatgcatcaccatcacc	HPSF	MWG

Rezepte

PCR-Mix (25 µl)			PCR-Reaktionen	
GST-TRAM1 A	1 µl	60ng RNA-cDNA	95 °C	5'
GST-TRAM1 B	200 µM	dNTP-Mix	94 °C	15''
	0,4 µM	Primer (jeweils)	57 °C	30''
	1 x	Puffer 2 mit MgSO ₄	72 °C	1/2/3/4'
	1 u	Expand High Fidelity Enzym Mix	72 °C	5'
				je 10x
HIS ₆ mycTRAM1	2 µg	Plasmid (pBudCE4.1 TRAM1)	94 °C	2'
	200 µM	dNTP-Mix	94 °C	15''
	0,3 µM	Primer (jeweils)	60 °C	30''
	1 x	Puffer 2 mit MgSO ₄	72 °C	60''
	1,75 u	Expand High Fidelity Enzym Mix	94 °C	15''
			70 °C	30''
			72 °C	60''+ 5'' je Zyklus
			72 °C	7'
				25x
				10x

LB-Medium		Lysepuffer		IB-Denaturierungspuffer	
1 %	Trypton	50mM	Tris-Cl pH8	8M	Urea
0,5 %	Hefe-Extrakt	2mM	EDTA	20mM	MOPS pH8
1 %	NaCl	1 %	Triton X-100	20mM	2-Mercaptoethanol
		2mM	PMSF		
		100 µg/ml	Lysozym		

Expressionsvektoren

Zur Herstellung prokaryotischer Expressionsvektoren wurden die Plasmide pET-11a (Novagen) und pGEX-4T-3 (GE Healthcare) verwendet. Der pET-11a Vektor besitzt an 5' eine T7-Tag[®] Sequenz, die Expression erfolgt unter der Kontrolle des T7 Promotors. Der Vektor pGEX-2T besitzt eine N-terminale Sequenz für das Protein Gluthation-S-Transferase (GST) unter der Kontrolle des induzierbaren tac-Promotors. Dieses führt nach Zugabe von IPTG zur Bakterienkultur zur Expression von GST-Fusionsproteinen.

Für die Expression von TRAM1-GST-Fusionspeptiden wurden die Domänen TRAM1 A (Aminosäuren 101 - 126) und TRAM1 B (Aminosäuren 317 - 374) mittels PCR aus humaner cDNA amplifiziert. Durch entsprechende Überhänge am 5' Ende der Primer wurden hierbei die Restriktionsseiten *BamHI* und *EcoRI* an das Produkt angehängt (Primerpaare **A/ B**). Die Insertion in den Vektor pGEX-4T-3 erfolgte über diese Schnittstellen. Das Amplikon für die Herstellung eines Plasmids zur Expression von TRAM1 (volle Länge) erfolgte mittels PCR des eukaryotischen Expressionsvektors pBudCE4.1 TRAM1. Die Einbringung der N-terminalen Epitope HIS₆ und myc erfolgte über den 5'-Primer, der auch die Schnittstellen *KpnI* und *NcoI* beinhaltet (Primer **C(5')**). Die Schnittstellen *XhoI* und *BamHI* wurden über den 3'-Primer in das Konstrukt eingebracht. Die Insertion des Amplikons in den Vektor pET-22b(+) erfolgte über die Schnittstellen *NcoI* und *XhoI* mittels T4 Ligase. Da der pET-22b(+) Vektor eine N-terminale *pelB* Signalsequenz für die potentielle periplasmatische Lokalisation beinhaltet, ist dieser nicht für die Expression des stark hydrophoben Proteins TRAM1 geeignet. Daher wurde zur Expression in *E. coli* der Expressionsvektor pET-11a gewählt. Zur Umklonierung von HIS₆ myc TRAM1 in den Vektor pET-11a wurden mittels PCR die Restriktions-Seiten *XbaI* und *NdeI* über den 5'-Primer **D(5')** eingebracht. Die Klonierung in den Vektor pET-11a erfolgte über die Schnittstellen *NdeI* und *BamHI* mittels T4 Ligase. Die Vervielfältigung der Plasmide erfolgte in kompetenten *E. coli* DH5 α (Protokoll für die Herstellung kompetenter Bakterien aus SAMBROOK und RUSSELL, 2001), die Aufreinigung mittels des HiSpeed Plasmid Maxi Kit (QIAGEN).

Transformation

Zur Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* wurde der Bakterienstamm BL 21 rosetta mit Expressionsvektoren transformiert. Hierzu wurden 100 µl Calcium-kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut und etwa 1 ng Expressionsplasmid hinzugegeben. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock der Bakterien bei 42 °C für 45 Sekunden. Zur Expression des Resistenzgens wurde 900 µl LB-Medium zu den Zellen hinzugegeben und 1 h bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien auf selektive Agar-Platten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Expression

Eine einzelne Kolonie wurde gepickt und in zwei Vorkulturen von etwa 10 ml LB-Medium mit 200 µg/ml Carbenicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol über Nacht geschüttelt. Die Expressionskultur (LB-Medium, 100 µg/ml Carbenicillin, 34 µg/ml Chloramphenicol) wurde 1 : 50 mit der Vorkultur angeimpft und bei 37 °C geschüttelt. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 - 1,0 nach etwa 3 h wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Expression erfolgte unter Schütteln für weitere 3 h bei 37 °C. Anschließend wurden die Zellen für 15 Minuten bei 3000 g abzentrifugiert und der Überstand verworfen.

Extraktion

Das Zellpellet wurde in Lysepuffer sequenziell resuspendiert. Hierzu wurde das Pellet in 50 mM Tris pH 8 und 2 mM EDTA gelöst. Anschließend wurde 1 % TritonX-100, 2 mM PMSF und 100 µg/ml Lysozym hinzugegeben. Das Volumen des Lysats betrug nun 50 ml pro 1 l Expressionskultur. Zur Lyse wurde das Gemisch für 30 Minuten bei 37 °C geschüttelt. Anschließend erfolgte die Zersetzung der DNA durch Zugabe von 10 mM MgCl₂ und 40 u DNase I und einer weiteren Inkubation bei 37 °C für 15 Minuten. Nach Zugabe von 0,2 % Sarkosyl wurde das Lysat für 30 Minuten bei 17.500 g zentrifugiert. Lösliche Proteine befanden sich nun im Überstand, während unlöslich Proteine im Pellet (= Inclusion Bodies) zu finden waren.

Aufreinigung

Die Aufreinigung der löslichen Proteine erfolgten nun je nach Protein über eine spezifische Affinitätschromatographie oder aber anhand der Proteinladung über eine Ionenaustausch-Chromatographie. Zur Aufreinigung der unlöslichen Proteine aus den Inclusion Bodies mussten diese zuvor noch in stark denaturierendem Milieu aufgelöst werden. Hierzu wurde ein Denaturierungspuffer mit 8 M Urea zum Pellet gegeben und dieses über Nacht bei 4 °C rotiert. Der so hergestellte Proteinextrakt wurde ebenfalls über die verschiedenen Chromatographie-Verfahren aufgereinigt.

2.6. Zellkultur

2.6.1. Zelllinien

humane Zelllinien		
IMR-32 NLF SKNAS HEK293sw (APP695sw)	TUMILOWICZ <i>et al.</i> , 1970 REYNOLDS <i>et al.</i> , 1988 SUGIMOTO <i>et al.</i> , 1984 CITRON <i>et al.</i> , 1992	ATCC® Nummer: CCL-127™ ATCC® Nummer: CRL-2137™
Maus-Neuroblastoma-Zelllinien		
Neuro-2a (N2a) ScN2a	OLMSTED <i>et al.</i> , 1970 BUTLER <i>et al.</i> , 1988 BOSQUE und PRUSINER, 2000	ATCC® Nummer: CCL-131™
Hybridoma-Zelllinien		
7VC 19B10	KORTH und LINGAPPA, unveröffentlicht	Hybridoma-Zellen aus Maus-P3U-Zellen und Maus-Milz-Zellen von mit PrP-immunisierten Mäusen (PrP-Antikörper bildende Zellen)

Material und Methoden I

Kulturmedien

RPMI 1640 + 1 % L-Glutamin 200mM Konzentrat (100x) + 10 % Foetal Bovine Serum "GOLD"	Invitrogen PAA PAA	# 31870 # M11-004 # A15-151	IMR, NLF SKNAS
Minimum Essential Medium (MEM) with Earle's Salts + 1 % L-Glutamin 200mM Konzentrat (100x) + 1 % Penicillin-Streptomycin (100x) + 10 % Foetal Bovine Serum "GOLD"	Invitrogen PAA Invitrogen PAA	# 21090 # M11-004 # 15140 # A15-151	N2a, ScN2a
Minimum Essential Medium (MEM) with Earle's Salts + 2 % HT-Supplement (50x) + 1 % L-Glutamin 200mM Konzentrat (100x) + 1 % Penicillin-Streptomycin (100x) + 10 % Foetal Bovine Serum "GOLD"	Invitrogen Invitrogen PAA Invitrogen PAA	# 21090 # 41065 # M11-004 # 15140 # A15-151	7VC, 19B10
DMEM (+ 4,5 g/l Glucose, + L-Glutamine, - Pyruvat) + 1 % Penicillin-Streptomycin (100x) + 1 % Natriumpyruvat MEM (100mM) + 200 µg/ml Geneticin (G418) + 10 % Foetal Bovine Serum "GOLD"	Invitrogen Invitrogen Invitrogen Invitrogen PAA	# 41965 # 15140 # 11360 # 10131 # A15-151	HEK293 (APP695sw)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS) (1X) Trypsin-EDTA (0,05 % Trypsin, EDTA·4Na) (1X)	Invitrogen Invitrogen	# 14040 # 25300	

Die Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in entsprechendem Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Bei einer Dichte der Zellen von etwa 90 % wurden die Zellen subkultiviert. Hierzu wurden diese mit PBS gewaschen und durch Zugabe von Trypsin-EDTA von der Oberfläche der Zellkulturschale und voneinander gelöst. Anschließend wurden die Trypsin-behandelten Zellen in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und zur weiteren Kultivierung in einer Verdünnung von 1 : 10 in eine frische Zellkulturschale überführt.

2.6.2. Transiente Transfektion

Um bestimmte Proteine in Zellkultur zu exprimieren, wurden die Zellen mit der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert. Die transiente Transfektion dient der kurzzeitigen Einbringung von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Meist werden hierbei hohe Transfektionsraten von bis zu 80 % erreicht. In der vorliegenden Arbeit

erfolgte die Transfektion mittels Lipofektion. Bei der Lipofektion dienen als Transfektionsreagenz synthetisch hergestellte Phospholipid-Partikel oder kationische Lipide, welche mit der gewünschten Plasmid-DNA einen Komplex eingehen. Anschließend wird das Gemisch aus Plasmiden und Transfektionsreagenz zu den Zellen gegeben. Die beladenen Lipid-Partikel fusionieren mit der Zellmembran und werden im Inneren der Zelle freigesetzt.

Transfektion von Plasmiden

Material und Chemikalien

Name		Firma	
dNTP-Mix	Deoxynucleosid-Triphosphat-Set	Roche	# 11969064001
Expand High Fidelity	PCR System/ DNA Polymerase	Roche	# 11732641001
<i>KpnI</i>	Restriktionsenzym	NEB	# R0142S
METAFFECTENE™	Transfektionsreagenz	Biontex	# T020
pBudCE4.1	eukaryotischer bigener Expressionsvektor	Invitrogen	# V532-20
pcDNA™3.1 (+)	eukaryotischer Expressionsvektor	Invitrogen	# V790-20
T4 DNA Ligase		NEB	# M0202S
<i>XhoI</i>	Restriktionsenzym	NEB	# R0146S

Primer			Reinigung	Firma
E(f)	huTRAM1/ <i>HindIII/KpnI</i>	tttccaagccttggtaccatggcgattcgcaaga aaagc	HPSF	MWG
E(r)	huTRAM1/ <i>BamHI/XhoI</i>	aaagcgggatccctcgagttatgaagatttctctt ttttattccgg	HPSF	MWG

Rezepte

PCR-Mix (25 µl)			PCR-Reaktion		
huTRAM1	1,5 µl	60 ng RNA-cDNA	94 °C	5'	25x
	200 µM	dNTP-Mix	94 °C	30''	
	0,4 µM	Primer (jeweils)	54 °C	30''	
	1 x	Thermopuffer	72 °C	30''	
	2 mM	MgSO4	72 °C	5'	
	0,5 u	VENT-Polymerase			

Material und Methoden I

Zur Expression von TRAM1 in eukaryotischen Säugerzellen wurde die cDNA von TRAM1 in entsprechende Plasmide kloniert. Die Gewinnung der TRAM1 cDNA erfolgte mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) aus humaner cDNA (Primerpaar **D**). Durch die Einbringung der Schnittstellen *KpnI* und *XhoI* am 5' und 3' Ende wurde das Amplifikat nach einem Restriktionsverdau in die Vektoren pcDNA3.1 und pBudCE4.1 (Invitrogen) kloniert. Der Vektor pcDNA3.1 ermöglicht die Expression von Proteinen in Säugetierzellen unter der Kontrolle des Cytomegalievirus (CMV) Promotors. Bei dem Vektor pBudCE4.1 handelt es sich um einen bigenen Vektor mit zwei möglichen Insertionsstellen für die zu exprimierende cDNA. Dieses ermöglicht die gleichzeitige Expression zweier unterschiedlicher Proteine unter zwei verschiedenen Promotoren (Elongationsfaktor 1 α (EF1 α) und CMV). TRAM1 wurde hier unter der Kontrolle des EF1 α -Promotors einkloniert.

Die Zellen wurden am Tag vor der Transfektion in eine 6-Well Kulturplatte ausgesät, so dass die Zellen am Tag der Transfektion eine Dichte von etwa 70 – 80 % hatten. 2 μ g DNA wurden je nach Zelllinie mit verschiedenen Volumina METAFECTENETM (Biontex) in 100 μ l Medium ohne Zusätze gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Transfektionsgemisch zu den Zellen in frischem Medium vorsichtig zupipettiert und die Zellen bei 5 % CO₂ und 37 °C inkubiert. Nach 8 h erfolgte ein weiterer Mediumwechsel mit normalem Wachstumsmedium ohne Zusatz von Transfektionskomplexen. Die Analyse der Transfektion erfolgte nach 48 h.

Transfektion von siRNA

Material und Chemikalien

siRNA			
Name	Firma	#	Sequenz
humane Zelllinien			
#1 HP GenomeWide siRNA Hs_TRAM1_1 HP	QIAGEN	SI00104559	ATGGTGTGAATGGAACATTAA (Zielsequenz) sense(GGUGUGAAUGGAACAUUAA)dTdT antisense(UUAAUGUCCAUCACACC)dTdT
#2 siGENOME Duplex	Dharmacon	D-018676-01	senseGAUAAUUUAUCAUGCCGUUUU antisense5'-PUACGGCAUGAAUAAUUUAUCUU
#3 siGENOME Duplex	Dharmacon	D-018676-02	senseUAAUGAAUCUGGUCAGCUUUU antisense5'-PAAGCUGACCAGAUUCAUUUUU
#4 siGENOME Duplex	Dharmacon	D-018676-03	senseGAGCUUACCUUUUUGAACUUUUU antisense5'-PAAGUUCAAAAGGUAAGCUCUU
#5 siGENOME Duplex	Dharmacon	D-018676-04	senseCAGUGUCCUUUUUAUUCUAAU antisense5'-PUAGUAAUAAAAGGGACACUGUU
Maus-Zelllinien			
#6 HP GenomeWide siRNA Mm_Tram1_1	QIAGEN	SI01454663	TAGCATCTTAATGAGATTCTA (Zielsequenz) sense(GCAUCUUAAUGAGAUUCUA)dTdT antisense(UAGAAUCUCAUUAAGAUGC)dTdT
siRNA-Kontrolle			
AllStars Negative Control siRNA	QIAGEN	1027280	keine Homologie mit bekannten Säugetier-Genen
Transfektionsreagenz			
HiPerFect	Transfektionsreagenz		QIAGEN # 301705

Der Suppression bestimmter Proteine in Zellen dient die Einbringung kleiner synthetischer RNA Partikel, sogenannter small interfering RNAs (siRNAs). Durch die Einbringung der siRNA in Zellen lagert sich diese an die mRNA des Zielgens an, was zum Abbau der mRNA führt. Das zugehörige Protein wird somit nicht mehr translatiert und exprimiert.

Zur Einbringung der siRNA in adherente eukaryotische Zellen wurden diese am Tag vor der Transfektion gesplittet und ca. 1×10^5 Zellen pro Well einer 12-Well-Schale in 1 ml Medium ausgesät. Zum Zeitpunkt der Transfektion sollten die Zellen eine Dichte von etwa 40 % haben. 75 ng siRNA wurden in 100 μ l RPMI-Medium ohne Zusätze verdünnt und mit 6 μ l HiPerFect Transfection Reagent (QIAGEN) versetzt. Nach kurzem Mischen erfolgte eine Inkubation des Transfektionsansatzes für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Gemisch tropfenweise zu den Zellen gegeben (Endkonzentration der siRNA im Medium = 5 nM) und die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Analyse der Transfektion erfolgte nach 24 - 92 h. Für die Transfektion von Suspensionszelllinien mit siRNA wurden die Zellen am Tag vor der Transfektion in einer Dichte von 3×10^5 Zellen pro ml in neues Medium überführt und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am Tag der Transfektion wurden die Zellen in eine 24-Well Schale überführt, so dass pro Well 100 μ l Medium mit 2×10^5 Zellen ausgesät waren. 750 ng siRNA wurden nun in 100 μ l Kulturmedium ohne Zusätze gegeben und nach Zugabe von 6 μ l HiPerFect Transfection Reagent (QIAGEN) kurz gemischt. Der Transfektionsansatz wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tropfenweise zu den Zellen gegeben (Endkonzentration der siRNA im Medium = 100 nM). Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ für sechs Stunden inkubiert. Anschließend wurde 400 μ l Kulturmedium zu den Zellen hinzugegeben und die Suppression nach 24 - 92 h mittels Western Blot analysiert.

2.6.3. Zellyse

Material und Chemikalien

Name		Reinheitsgrad	Firma	
Bromphenolblau	für Elektrophorese		Sigma	# B5525
DOC	Deoxycholsäure	≥ 99%	Sigma	# D2510
Glycerol	UltraPure™ Glycerol	≥ 99,5%	Invitrogen	# 15514
KCl	Kaliumchlorid	≥ 99%	Sigma	# P9541
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat	≥ 99%	Sigma	# P0662
β-Mercaptoethanol	für Molekularbiologie	≥ 98%	Sigma	# M3148
NaCl	Natriumchlorid	≥ 99,5%	Fluka	# 71381
Na ₂ HPO ₄	Natriumdihydrogenphosphat	≥ 99%	Sigma	# S0751
Proteinase Inhibitor	cOmplete Tabletten EDTA-frei		Roche	# 11873580001
SDS	Natriumdodecylsulfat	≥ 99%	Roth	# CN30
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	p.a.	Merck	# 1.08382
Triton®X-100	Polyethylenglycol- <i>tert</i> -octylphenylether		Sigma	# T9284

Rezepte

Lysepuffer (+PI)		Proben-Puffer (4 x)		PBS	
50mM	Tris-Cl pH8.0	100mM	Tris-Cl pH6.8	137mM	NaCl
150mM	NaCl	6%	SDS	2,7mM	KCl
0,5%	TX-100	40%	Glycerol	10mM	Na ₂ HPO ₄
0,5%	DOC	4%	β-Mercaptoethanol	2mM	KH ₂ PO ₄
1x	Proteinase Inhibitor	0,1%	Bromphenolblau		

Für die Lyse der Zellen wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und mit Lysepuffer auf der Platte lysiert. Dabei wurde das Lysat mehrfach vorsichtig auf- und abpipettiert. Dieses hatte eine Verklumpung der DNA zur Folge, wodurch diese einfach mit der Pipette vom restlichen Lysat getrennt werden konnte. Die Lysate wurden anschließend bei –20 °C gelagert.

2.6.4. PrP^{Sc}-Assay (Proteolytische Spaltung mittels Proteinase K)

Material und Chemikalien

Name		Reinheitsgrad	Firma	
Bromphenolblau	für Elektrophorese		Sigma	# B5525
DC Protein Assay	Proteinbestimmungsassay		BioRad	# 500-0112
DOC	Deoxycholsäure	≥ 99 %	Sigma	# D2510
Glycerol	UltraPure™ Glycerol	≥ 99,5 %	Invitrogen	# 15514
KCl	Kaliumchlorid	≥ 99 %	Sigma	# P9541
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat	≥ 99 %	Sigma	# P0662
2-Mercaptoethanol	für Molekularbiologie	≥ 98 %	Sigma	# M3148
NaCl	Natriumchlorid	≥ 99,5 %	Fluka	# 71381
Na ₂ HPO ₄	Natriumdihydrogenphosphat	≥ 99 %	Sigma	# S0751
Proteinase K	PK; EC 3.4.21.14		Merck	# 124568
SDS	Natriumdodecylsulfat	≥ 99 %	Roth	# CN30
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	p.a.	Merck	# 1.08382
Triton®X-100	Polyethylenglycol- <i>tert</i> -octylphenylether		Sigma	# T9284

Rezepte

Lysepuffer (-PI)		Proben-Puffer (4x)		PBS	
50mM	Tris-Cl pH8.0	100mM	Tris-Cl pH6.8	137mM	NaCl
150mM	NaCl	6%	SDS	2,7mM	KCl
0,5%	TX-100	40%	Glycerol	10mM	Na ₂ HPO ₄
0,5%	DOC	4%	β-Mercaptoethanol	2mM	KH ₂ PO ₄
		0,1%	Bromphenolblau		

Zur Bestimmung der Protease-resistenten Form von PrP (PrP^{Sc}) in infizierten N2a-Zellen (ScN2a) wurden die Zelllysate einer Proteolyse mittels Proteinase K (PK-Verdau) unterzogen. Für den PK-Verdau wurde eine mit ScN2a-Zellen dicht bewachsene 60 mm Schale mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 500 µl Lysepuffer (-PI) resuspendiert. Durch vorsichtiges Resuspendieren der Zellen im Lysepuffer verklumpte die DNA und konnte separiert werden. Anschließend wurden 400 µl des Lysats mit 20 µg/ml PK versetzt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Der Verdau wurde mit 2 mM PMSF gestoppt. Anschließend wurde das PK-resistente, aggregierte PrP^{Sc} mittels Ultrazentrifugation bei 100.000 g für 45 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 2 x SDS-

Probenpuffer bei 97 °C für fünf Minuten inkubiert. Von der unverdauten Probe wurde die Proteinkonzentration mittels des DC Protein Assays (BioRad) bestimmt. Anschließend wurden 20 µg Gesamtprotein mit Probenpuffer versetzt und ebenfalls fünf Minuten bei 97 °C inkubiert. Die Proben wurden mittels SDS–PAGE aufgetrennt, wobei die PK-behandelten Proben zuvor anhand des Proteingehalts der unverdauten Proben aneinander angeglichen wurden. Die Detektion von PrP in den unverdauten und verdauten Proben erfolgte mittels Western Blot anhand des Antikörpers W226 (PETSCH und STITZ, unveröffentlicht).

2.6.5. APP- und sAPP-Assay

Material und Chemikalien

Name	Reinheitsgrad	Firma
Acrylamid 30%	(37,5:1)	BioRad # 161-0159
APS	Ammoniumperoxodisulfat	Roth # 9592
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methane	Fluka # 14879
Bromphenolblau	für Elektrophorese	Sigma # B5525
BSA	bovines Serumalbumin	Sigma # A7906
Chemilumineszenz-lösung	Immobilon™ Western HRP Substrate Luminol/ Peroxidlösung	Millipore # WBKLS0020
DOC	Deoxycholsäure	Sigma # D2510
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure - Dinatriumsalz - Dihydrat	AppliChem # A3553
Glycerol	UltraPure™ Glycerol	Invitrogen # 15514
KCl	Kaliumchlorid	Sigma # P9541
LAS-3000mini	Luminescent image analyzer	FujiFilm
2-Mercaptoethanol	für Molekularbiologie	Sigma # M3148
MES	4-Morpholinethansulfonsäure	Fluka # 69890
NaCl	Natriumchlorid	Fluka # 71381
Proteinase Inhibitor	cOmplete Tabletten EDTA-frei	Roche # 11873580001
SDS	Natriumdodecylsulfat	Roth # CN30
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	Roth # 2367
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck # 1.08382
Triton®X-100	Polyethylenglycol- <i>tert</i> -octylphenylether	Sigma # T9284

Rezepte

Lysepuffer (+PI)	Proben-Puffer (4x)	Sammelgel / Trenngel (NuPAGE)
50mM Tris-Cl pH8.0 150mM NaCl 0,5% TX-100 0,5% DOC 1x Proteinase Inhibitor	100mM Tris-Cl pH6.8 6% SDS 40% Glycerol 4% β -Mercaptoethanol 0,1% Bromphenolblau	4/ 10% Acrylamid (37,5 :1) 0,4 M Bis-Tris pH6,4 0,1/0,05% APS 0,25/0,15% TEMED
TBS-T (pH7.5)	MES SDS Laufpuffer	
25mM Tris 137mM NaCl 2,7mM KCl 0,1% TWEEN-20	50mM MES 50mM Tris Base 3,5mM SDS 1mM EDTA	

Zur Darstellung der APP-Prozessierung im Western Blot wurde die mit APP695sw stabil transfizierte humane Zelllinie HEK293 verwendet. Die Doppelmutation (sw) von APP (KM595/596NL) wurde ursprünglich in einer schwedischen Familie mit familiärer Alzheimer Krankheit gefunden (MULLAN *et al.*, 1992). Die mit APP695sw transfizierten Zellen produzieren etwa 6-8 mal mehr A β als Zellen mit unmutiertem APP. Um die Konzentration des ins Medium abgegebenen löslichen APP (sAPP) und A β zu erhöhen, wurde 24 h vor der Ernte ein Mediumwechsel durchgeführt und das Volumen des neuen Mediums auf die Hälfte des üblicherweise verwendeten Mediums reduziert. Zur Ernte der Überstände wurden dann die Zellkulturschalen auf Eis gestellt und das abgenommene Medium in Eppendorf Reaktionsgefäße mit Proteinase-Inhibitor überführt (Endkonzentration 1 x). Anschließend wurden die Überstände für drei Minuten bei 13.000 g bei 4 °C zentrifugiert und in neue Gefäße überführt. Die Lagerung der Überstände erfolgte bei -80 °C. Die Lyse der Zellen erfolgte wie in 2.6.3 beschrieben. Die Lagerung der Lysate erfolgte bei -20 °C.

Zur Analyse im Western Blot wurden die Lysate mit 4 x SDS-Probenpuffer versetzt (Endkonzentration 1 x) und für fünf Minuten bei 97 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben kurz abzentrifugiert und 20 μ l auf das Gel aufgetragen. Der Proteingehalt der Lysate wurde mittels des DC Protein Assays (BioRad # 500-0112) bestimmt. Anschließend wurden 20 μ g Gesamtprotein mit SDS-Probenpuffer versetzt

(Endkonzentration 1 x). Zur Detektion von APP wurden die Proben wie die Überstände für fünf Minuten bei 97 °C inkubiert und anschließend kurz abzentrifugiert. Für die spätere Detektion von TRAM1 entfällt die Erhitzung der Proben.

Die Proben wurden auf 10 % NuPAGE Gele aufgetragen und bei 100 V für 1 h elektrophoretisch aufgetrennt. Der Transfer der Proteine erfolgte mittels Nass-Blot-Verfahren auf eine Polyvinylfluorid- (PVDF-) Membran bei 180 mA und 4 °C über Nacht. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu verhindern, wurde die Membran mit 3 % BSA in TBS-T für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Detektion des löslichen sAPP wurde der monoklonale Maus-Antikörper IC16 verwendet, welcher gegen das Amyloid β Peptid $A\beta_{1-16}$ hergestellt wurde (PRIKULIS und KORTH, unveröffentlicht). Die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper (IC16 für die Überstände und CT152Z für die Lysate) erfolgte bei 4 °C über Nacht, die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur (Antikörperverdünnungen s. 2.2). Die Detektion der Antikörpersignale erfolgte mittels Chemilumineszenzreaktion. Das Signal wurde mittels eines Lumineszenzbild-Analysierers (FujiFilm) festgehalten.

2.7. Dichtegradientenzentrifugation

Material und Chemikalien

Name		Reinheitsgrad	Firma	
DTT	DL-Dithiothreitol	≥ 99 %	Sigma	# D9163
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat	≥ 99 %	AppliChem	# A3553
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure	≥ 99,5 %	Sigma	# H3375
Isopropanol	2-Propanol	≥ 99,8 %	Merck	# 1.09634
MeOH	Methanol	p.a.	Merck	# 1.06009
Pepstatin A	mikrobiell	≥ 75 %	Sigma	# P4265
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluorid	≥ 99,5 %	Sigma	# P7626
Polyallomer	Zentrifugenröhrchen (25x89mm)		Beckman	# 326823
Sucrose	D(+)-Saccharose	≥ 99,5 %	Sigma	# S9378

Zentrifuge

Rotor	SW28 Swinging Bucket Rotor	Beckman	# 342207
-------	----------------------------	---------	----------

Rezepte

Lösung A		Lösung D	
0,25M	Sucrose	2M	Sucrose
20mM	HEPES pH7.4	20mM	HEPES pH7.4
15mM	EDTA	15mM	EDTA
3mM	DTT	3mM	DTT
1mM	PMSF	1mM	PMSF
1 µg/ml	Pepstatin	1 µg/ml	Pepstatin
Lösung B		Lösung C	
Lösung A + 0,6M Sucrose = 0,85M Sucrose total		10ml S1 + 17ml Lösung D	
S1		P1	
Überstand des Maus-Hirnhomogenats		Pellet des Maus-Hirnhomogenats	

Bei der Dichtegradientenzentrifugation wird das Homogenat auf die Oberfläche eines Dichtegradienten aufgetragen und anschließend zentrifugiert. Dadurch trennen sich die einzelnen Zellorganellen und -bestandteile hinsichtlich ihres Volumens und ihres Gewichts. Vor allem Zellbestandteile ähnlicher Größe mit einem geringen Dichteunterschied können so isoliert werden.

Zur Auftrennung der einzelnen Zellkompartimente von Maus-Hirnhomogenat wurde Maushirn in Lösung A homogenisiert, so dass eine 15 %ige Lösung entstand. Anschließend wurde das so hergestellte Homogenat bei niedriger Umdrehung (500 g) für fünf Minuten zentrifugiert. Das hieraus resultierende Pellet wurde verworfen und der Überstand (S1) mit der Lösung D gemischt (= Lösung C). Für die differentielle Zentrifugation wurden die Sucroselösungen wie in Abbildung 8 in ein Polyallomer-Zentrifugenröhrchen gegeben. Nach der Ultrazentrifugation (80–100.000 g) über Nacht haben sich die Zellkompartimente hinsichtlich ihrer Größe und ihres Gewichts aufgetrennt (Abb. 8) und können nun nacheinander entnommen werden.

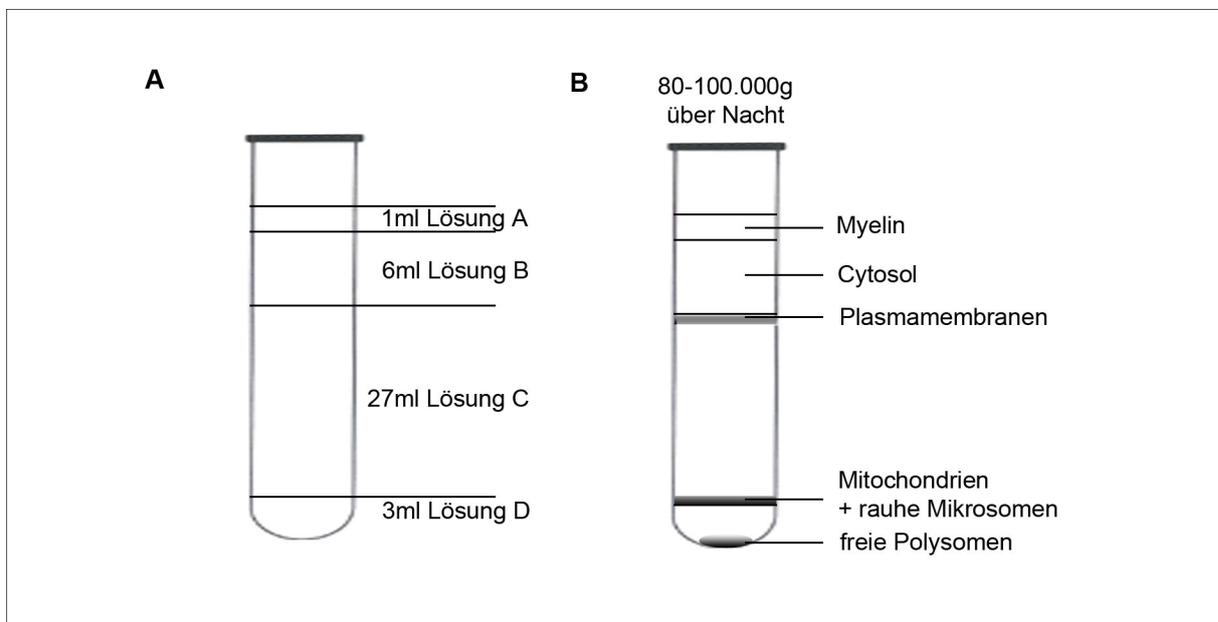


Abb. 8 Differentielle Zentrifugation von Maus-Hirnhomogenat. A: Aufbau des Sucrosegradienten. **B:** Anordnung der Zellkompartimente nach der Ultrazentrifugation.

2.8. Pull Down und Co-Immunopräzipitation

Material und Chemikalien

Name	Reinheitsgrad	Firma
Aceton	≥ 99,5%	Sigma # 179124
Bromphenolblau		Sigma # B5525
Criterion Tris-HCl Gel	4–20 %	BioRad # 345-0033
Criterion Tris-HCl Gel	7,5 %	BioRad # 345-0006
EDTA	≥ 99 %	AppliChem # A3553
Glycerol	UltraPure™ Glycerol	Invitrogen
Glycin	für Elektrophorese	Sigma # G8898
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure	Sigma # H3375
KAc (CH ₃ COOK)	Kalium Acetat	Sigma # P1190
KCl	Kaliumchlorid	Sigma # P9541
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma # P0662
2-Mercaptoethanol	für Molekularbiologie	Sigma # M3148
NaCl	Natriumchlorid	Fluka # 71381
Na ₂ HPO ₄	Natriumdihydrogenphosphat	Sigma # S0751
Ni-NTA Agarose	Nickel-geladenes Granulat	Qiagen # 30210
Protein A - Agarose	Fast Flow	Sigma # P3476
SDS	Natriumdodecylsulfat	Roth # CN30
TCA	Trichloressigsäure	Sigma # T9159
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck # 1.08382
TWEEN®20	Polyethylenglycol-Sorbitan-Monolaurat	Sigma # P5927

Rezepte

TBS-T (pH7.5)	Proben-Puffer (4x)	PBS (pH7.5)
25mM Tris 137mM NaCl 2,7mM KCl 0,1% TWEEN-20	100mM Tris-Cl pH6.8 6% SDS 40% Glycerol 0,1% Bromphenolblau	137mM NaCl 2,7mM KCl 10mM Na ₂ HPO ₄ 2mM KH ₂ PO ₄
Equilibrierungspuffer	Elutionspuffer	VRL-Puffer
20mM HEPES 15mM EDTA	50mM Glycin pH2.5	50mM HEPES pH7.5 250mM Sucrose 5mM MgCl ₂ 100mM KAc

Die Co-Immunopräzipitation und der Pull Down Assay sind *in vitro*-Methoden zur Untersuchung molekularer Interaktionen zweier oder mehrerer Proteine. Die Co-Immunopräzipitation basiert auf der Methode der Immunopräzipitation. Bei dieser Methode wird ein Antikörper an einen solide Phase gebunden. Anschließend kann das zugehörige Antigen aus einem Proteingemisch (zum Beispiel Zelllysate) isoliert und mittels SDS-PAGE und Western Blot detektiert werden. Bei der Co-Immunopräzipitation erfolgt die Detektion hinsichtlich eines Antigen-gebundenen Proteins, welches indirekt über den Antikörper-Antigen-Komplex co-präzipitiert wurde.

Der Pull Down Assay ist eine Form der Affinitäts-Aufreinigung und der Immunopräzipitation sehr ähnlich. Hierbei wird an Stelle des Antikörpers ein Peptid an eine solide Phase gebunden und mögliche Bindungspartner gehen eine direkte Bindung mit dem Peptid ein.

2.8.1. Pull Down Assay

Für den Pull Down Assay wurden das GST-Fusionspeptid GST-TRAM1 B und das Peptid TRAM1 A nach Angaben des Herstellers an Sulfolink-Beads (Pierce) gekoppelt. Anschließend wurden überschüssige Bindungsstellen mit L-Cystein blockiert.

Pull Down von TRAM1-Liganden aus Maus-Hirncytosol

Die Sulfolink-Beads (mit gekoppelten Peptiden) wurden in 20 mM HEPES und 15 mM EDTA equilibriert. Um unspezifische Bindungen von Proteinen an das Trägermaterial oder GST zu detektieren und bei weiteren Inkubationen auszuschließen, wurde das Maus-Hirncytosol (8 ml entsprechend einer Gehirneinheit) mit dem Trägermaterial (160 µl Sulfolink-Beads) oder mit GST-gebundenem Trägermaterial (400 µg GST) für 6 h bei Raumtemperatur rotierend inkubiert. Anschließend wurden die Beads für zwei Minuten bei 12.000 g abzentrifugiert und der Überstand zu jeweils 40 µl TRAM1 A -Sulfolink-Beads oder GST-TRAM1 B -Sulfolink-Beads (100 µg Peptid) gegeben.

Zur Bildung der Peptid-Protein-Interaktions-Komplexe wurden die Proben über Nacht bei 4 °C oder für 2 h bei Raumtemperatur rotierend inkubiert. Anschließend wurden die Beads wieder abzentrifugiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Beads wurden dreimal in Equilibrierungspuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution möglicher gebundener Proteine mittels fünfminütiger Inkubation im sauren Milieu mit 100 µl 50 mM Glycin pH 2.5. Anschließend wurden die Beads wieder abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt um Verdünnungen durch verbliebene Waschlösung und somit ein Nicht-Erreichen des gewünschten pH-Wertes auszuschließen. Die Überstände der Elutionsschritte wurden vereint. Nach der Elution im sauren Milieu erfolgte die Elution in 1 % SDS (3x 100 µl). Die hieraus resultierenden Überstände wurden ebenfalls vereint.

Zur Verringerung des Probenvolumens wurden die Proteine aus der Lösung gefällt. Hierzu wurden 10 % TCA (Trichloressigsäure) zur Lösung gegeben und für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Pelletierung der ausgefällten Proteine mittels Zentrifugation bei 29.000 g und 4 °C für 30 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und die präzipitierten Proteine mit Aceton gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 29.000 g 4 °C für 30 Minuten wurde wiederum der Überstand abgenommen und das Proteinpellet für ca. 10 Minuten an der Luft getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 30 µl Probenpuffer ohne β -Mercaptoethanol resuspendiert und für 10 - 15 Minuten bei 97 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf ein 4 - 20 % Tris-HCl-Gel (Criterion Precast) aufgetragen und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Colloidal Blue Staining (Invitrogen). Proteinbanden wurden ausgeschnitten und zur massenspektrometrischen Bestimmung an Professor Bruce Onisko (University of California, Berkley) versandt.

2.8.2. Co-Immunopräzipitation

Zur Co-Immunopräzipitation wurde der PSA-Antikörper (rab α PSA) an Protein A Agarose gekoppelt. Dazu wurde 100 µl Immuneserum mit 1 ml VRL-Puffer verdünnt

und mit 100 μ l Protein A Agarose Beads über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Anschließend wurden die Beads in VRL-Puffer gewaschen.

Co-Immunopräzipitation von TRAM1 und PSA aus Zelllysaten

Die Protein A Agarose, zuvor inkubiert mit $\text{rab}\alpha\text{PSA}$, Präimmunsereum oder ohne Serum wurde in VRL-Puffer equilibriert. Zur Bildung der Antikörper-Protein-Protein-Interaktions-Komplexe wurden die Proben über Nacht bei 4 °C oder für 2 h bei Raumtemperatur rotierend inkubiert. Anschließend wurden die Beads abzentrifugiert (12.000 g, 2 Minuten). Die Beads wurden dreimal in Equilibrierungspuffer gewaschen. Anschließend wurden die Beads in 30 μ l Probenpuffer resuspendiert und für 10–15 Minuten bei 97 °C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Überstände auf ein 4–20 % Tris-HCl-Gel (Criterion Precast) aufgetragen und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion von TRAM1 erfolgte mittels des Antikörpers $\text{ch}\alpha\text{TRAMC}$ im Western Blot.

3. Ergebnisse

Um die Funktion von TRAM1 in eukaryotischen Zellen zu untersuchen, wurde das Protein in verschiedenen humanen und murinen Neuroblastoma-Zelllinien überexprimiert oder supprimiert. Dieses wurde durch eine transiente Transfektion der Zellen mit den Vektoren pcDNA3.1 TRAM1 und pBudCE4.1 TRAM1 oder mit einer TRAM1-spezifischen siRNA erreicht.

3.1. Überexpression von TRAM1 in eukaryotischen Zelllinien

Bei den Vektoren zur Überexpression von TRAM1 in eukaryotischen Zellen befindet sich die TRAM1 - cDNA hinter dem viralen CMV-Promotor (pcDNA3.1) oder dem humanen Promotor EF1 α (pBudCE4.1). 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Lysate durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion von TRAM1 erfolgte mittels Western Blot mit dem polyklonalen Hühner-Antikörper ch α TRAMC.

Viele Transmembranproteine neigen bei Erhitzung zur Aggregation und zur Ausbildung SDS-resistenter Multimere, vermutlich hervorgerufen durch eine Interaktion der hydrophoben Transmembrandomänen. Da TRAM1 mit seinen acht (GORLICH *et al.*, 1992) beziehungsweise neun (nach einem Programm zur Klassifikation und Sekundärstruktur-Vorhersage von Membran-proteinen; <http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp>, Abb. 5, Kapitel 1.3) Transmembrandomänen ein stark hydrophobes Protein ist, sollte hier der Effekt der Aggregation unter Hitzeeinfluss untersucht werden. Hierzu wurden die Zelllysate in SDS-Probenpuffer für fünf Minuten bei 95, 55 und 37 °C inkubiert. Unter der Verwendung von Probenpuffer mit 1 % oder 0,1 % SDS wurde zusätzlich der Einfluss von SDS auf die Aggregation untersucht. Die Detektion von TRAM1 im Western Blot zeigte, dass bei einer Erhitzung der Proben auf 95 °C das Signal von TRAM1 fast ausschließlich im

Übergang zum Trenngel zu finden war. Bei der Herabsetzung der Temperatur auf 55 °C war eine Immunreaktion des Antikörpers in der erwarteten Höhe von 36 kDa zu sehen. Die SDS-Konzentration hatte hierbei keinen Effekt (Abb. 9).

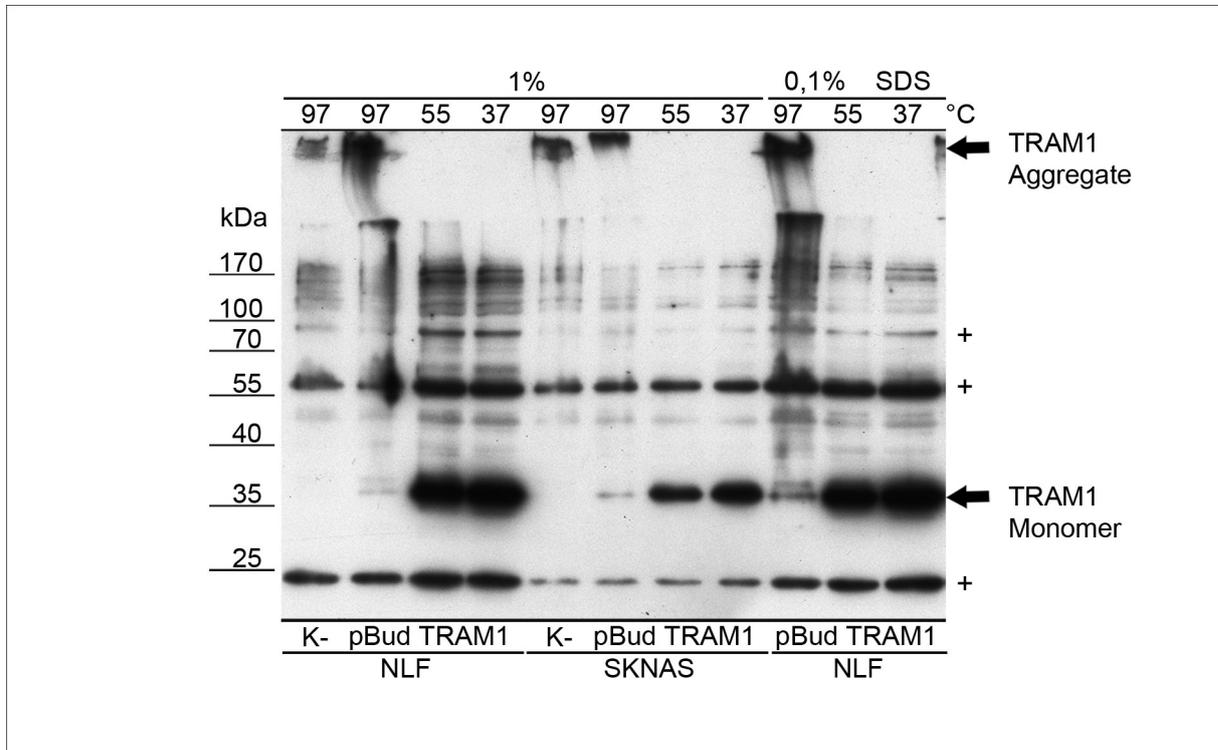


Abb. 9 Überexpression von TRAM1 in eukaryotischen Zellen. Die Zelllinien NLF und SKNAS wurden mittels Lipofektion mit dem Expressionskonstrukt pBudCE4.1 TRAM1 transient transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und die Lysate für fünf Minuten bei 97, 55 oder 37 °C in der Anwesenheit von 1 % oder 0,1 % SDS inkubiert. Die Auftrennung der Lysate (20 µg Gesamtprotein pro Spur) erfolgte über ein 10 %iges Polyacrylamidgel. Zur Detektion von TRAM1 im Western Blot wurde der Antikörper $\text{ch}\alpha\text{TRAMC}$ verwendet, welcher zum Teil mit anderen Proteinen unspezifisch kreuzreagiert (+).

3.2. Suppression von TRAM1 in eukaryotischen Zelllinien

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung von Proteinfunktionen ist die Suppression von Proteinen in Zellen. Für die weitere Charakterisierung von TRAM1 wurden verschiedene Zelllinien mit TRAM1-spezifischer siRNA transfiziert. Hierzu wurden die Zellen mit 5 nM TRAM1 siRNA (# 1) im Medium inkubiert und nach 24, 40 oder 48 h lysiert (Abb. 10A). Die Suppression von TRAM1 war schon nach 24 h

Ergebnisse I

zu sehen, deutlicher war dieser Effekt jedoch 40 h nach der Transfektion. Nach 48 h war ein Rückgang von TRAM1 um etwa 90 % zu beobachten. Zusätzlich zur Inkubationszeit wurden unterschiedliche siRNAs getestet (Kapitel 2.6.2). Hier war zu erkennen, dass die siRNAs # 1, 4 und 5 für die Zelllinien NLF und SKNAS am besten geeignet waren (Abb. 10B). Für die weiteren Versuche mit humanen Zelllinien wurde die TRAM1 siRNA # 1 verwendet.

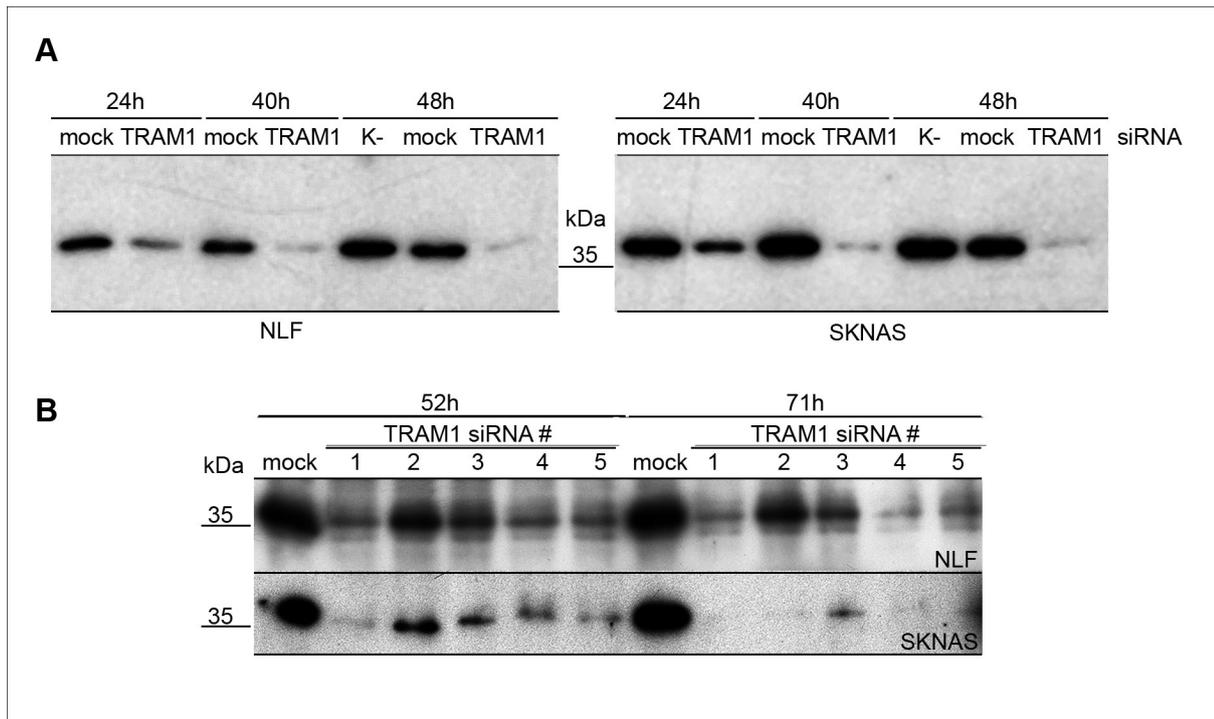


Abb. 10 Suppression von TRAM1 in Säugetierzellen. A: Die Zelllinien NLF und SKNAS wurden mit TRAM1 siRNA (# 1) transfiziert und für 24, 40 und 48 h inkubiert. Nach der Zellyse wurde 20 µg Gesamtprotein über ein 10 %iges Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Visualisierung erfolgte mittels Western Blot mit dem Antikörper $\text{ch}\alpha\text{TRAMC}$. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (K-) und Zellen, die mit nichtbindender siRNA transfiziert wurden (mock). **B:** Die Zelllinien NLF und SKNAS wurden mit verschiedenen TRAM1 siRNAs (# 1 – 5) transfiziert. Die Lyse erfolgte nach 52 h und 71 h. Nach der Auftrennung der Zellysate (20 µg Gesamtprotein) in einem 10 %igen Gel erfolgte die Detektion im Western Blot mittels des Antikörpers $\text{ch}\alpha\text{TRAMC}$. Als Kontrolle dienten Zellysate der mit mock siRNA transfizierten Zellen.

3.3. Auswirkungen der TRAM1-Expression auf die Prion Protein Expression und Konversion

In vitro-Studien haben gezeigt, dass TRAM1 einen Einfluss auf die Bildung der PrP-Konformere ^{sec}PrP, ^{CTM}PrP und ^{NTM}PrP hat (HEGDE *et al.*, 1998b). So begünstigt die durch Glykoprotein-Depletion bewirkte Abwesenheit von TRAM1 *in vitro* die Bildung des Transmembranproteins ^{CTM}PrP (HEGDE *et al.*, 1998b). Die CTM-Form des zellulären Prion Proteins wird vermehrt in Gehirnen von PrP^{Sc}-infizierten Mäusen gefunden (HEGDE *et al.*, 1998a). Zudem werden Gen-veränderte Mäuse, welche diese Form des Prion Proteins auf Grund von Mutationen überexprimieren, nach der Infektion mit Prionen schneller krank, da die Überexpression von ^{CTM}PrP eine höhere Anfälligkeit für Neurodegeneration verursacht (HEGDE *et al.*, 1999).

Zur Untersuchung der Auswirkung der Suppression oder Überexpression von TRAM1 auf die Menge der infektiösen Form des Prion Proteins (PrP^{Sc}) in einem Säugerzell-System, wurde die permanent mit PrP^{Sc} infizierte Maus-Neuroblastoma-Zelllinie ScN2a verwendet. Zur Suppression von TRAM1 wurden die Zellen mit Maus-spezifischer TRAM1 siRNA (# 6) transient transfiziert. Nach 96 h wurden die Zellen lysiert. Um die Menge an PrP^{Sc} zu bestimmen, wurden jeweils 4/5 des gesamten Lysats mit Proteinase K behandelt. Diese Proben beinhalten nur noch PK-resistentes PrP und stellen den Anteil an PrP^{Sc} in den Zellen dar, welches mittels Ultrazentrifugation pelletiert werden kann (MCKINLEY *et al.*, 1983).

Um die Anteile an PrP^{Sc} in den verschiedenen Lysaten vergleichen zu können, wurde die Gesamt-Proteinkonzentration der unverdauten Lysate bestimmt und die PK-verdauten Proben entsprechend angeglichen. Die so geeichten Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Zusätzlich wurden jeweils 20 µg Gesamtprotein der unverdauten Lysate aufgetragen, um die Gesamtmenge an PrP (PrP^C und PrP^{Sc}) in den Zellen darzustellen. Der in Abbildung 11A dargestellte Western Blot zeigt in den Lysaten der TRAM1-supprimierten Zellen eine deutlich stärkere Immunreaktivität des PrP-Antikörpers W226 als in den Kontrollen, sowohl in den PK-unbehandelten als auch in den PK-verdauten Lysaten.

Ergebnisse I

Die densitometrische Auswertung der Western Blots ergab eine Steigerung des Antikörpersignals in den unverdauten Lysaten um den Faktor 3,2 im Vergleich zu den Zellen, die mit der nichtbindenden siRNA (mock) behandelt wurden. Bei den PK-behandelten Zelllysaten war das Signal um den Faktor 2,4 erhöht (Abb. 11B). Die Überprüfung der unverdauten Zelllysate mit einem Antikörper gegen TRAM1 zeigte die erfolgreiche Suppression des Proteins in den Zellen zum Zeitpunkt der Lyse (Abb. 11A).

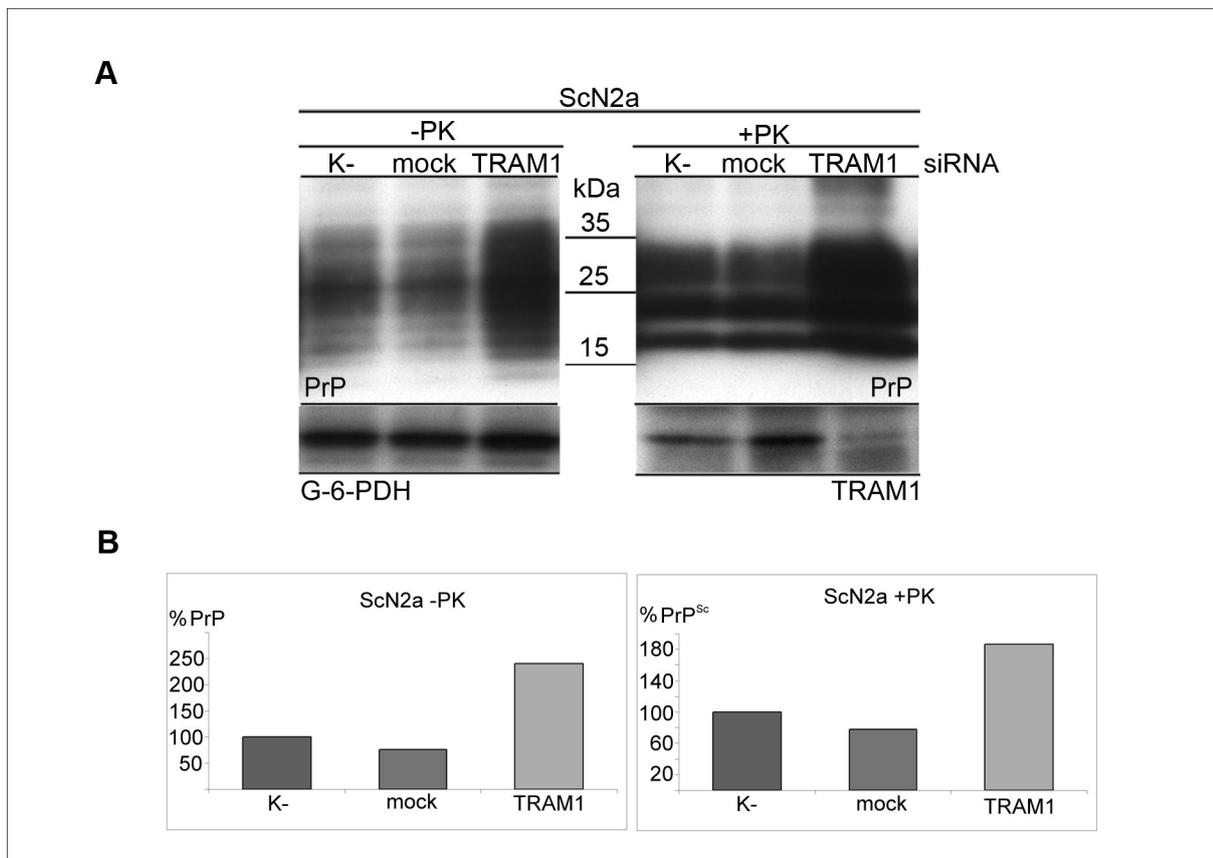


Abb. 11 Auswirkung der TRAM1-Suppression auf PrP in ScN2a-Zellen. **A:** Infizierte murine Neuroblastoma-Zellen (ScN2a) wurden mit siRNA zur Suppression von TRAM1 transfiziert und für 96 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert (– PK) und jeweils 4/ 5 der Lysate mit Proteinase K behandelt (+ PK). Als Kontrolle dienten Zelllysate von unbehandelten Zellen (K-) und von Zellen, die mit Kontroll-siRNA (mock) behandelt wurden. Von den unverdauten Lysaten wurden jeweils 20 µg Gesamtprotein auf ein Polyacrylamidgel (Tris-Cl 4 – 20 %) aufgetragen, während die PK-verdauten Proben angeglichen und dann vollständig aufgetragen wurden. Die Detektion von PrP erfolgte im Western Blot mittels des PrP-Antikörpers W226. Zur Kontrolle der TRAM1 Suppression wurden die unbehandelten Lysate mit dem Antikörper α TRAMC im Western Blot detektiert. Die einheitliche Proteinmenge in den Zelllysaten wurde mit einem Antikörper gegen G-6-PDH nachgewiesen. **B:** Densitometrische Auswertung der Western Blots. Die Menge an PrP in den unbehandelten Zellen (K-) wurde als 100 % angesehen. Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot vier unabhängiger Experimente.

Um zu sehen, ob die Zunahme an PrP in den unverdauten Proben auf der Zunahme an PrP^C beruht, wurden nicht-infizierte Maus-Neuroblastoma-Zellen (N2a) ebenfalls mit TRAM1 siRNA transfiziert und nach 96 h lysiert. Die Analyse mittels Western Blot zeigte auch hier eine erhöhte Antwort des PrP-Antikörpers (Faktor 1,2) (Abb. 12). Dieses deutet darauf hin, dass die TRAM1 Suppression zu einer Zunahme der Expression von PrP^C führt. Dementsprechend wird bei ScN2a Zellen mehr PrP^C in PrP^{Sc} konvertiert. TRAM1 scheint somit keinen Einfluss auf die Kinetik der Konversion zu haben.

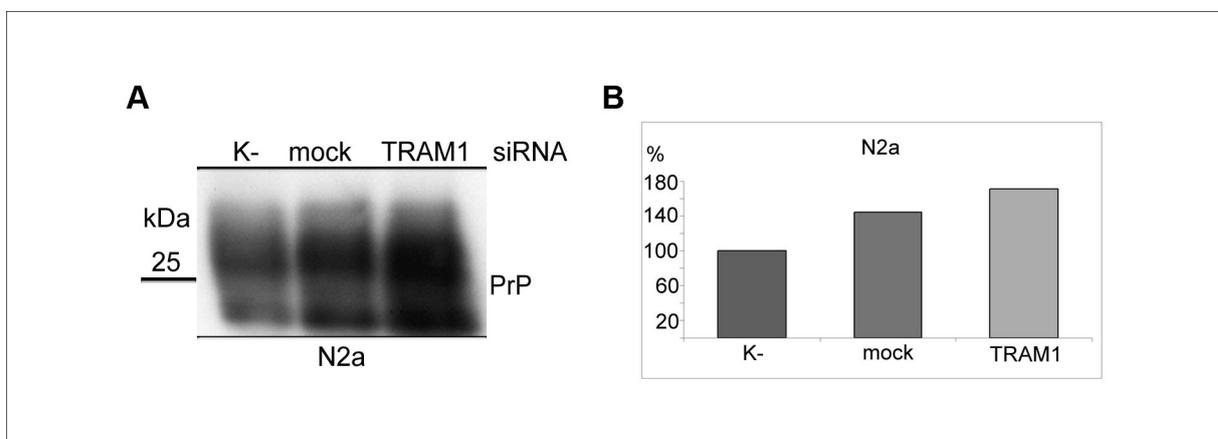


Abb. 12 Auswirkung der TRAM1-Suppression auf PrP in N2a-Zellen. **A:** Nicht-infizierte murine Neuroblastoma-Zellen (N2a) wurden mit siRNA zur Suppression von TRAM1 transfiziert und nach 96 h lysiert. Als Kontrolle dienten Zellysate von unbehandelten Zellen (K-) und von Zellen, die mit nichtbindender siRNA (mock) behandelt wurden. Von den Lysaten wurden jeweils 20 µg Gesamtprotein auf ein Polyacrylamidgel (Tris-CI 4 – 20 %) aufgetragen und PrP im Western Blot mittels des Antikörpers W226 detektiert. **B:** Densitometrische Auswertung des Western Blots. Die Menge an PrP^C in den unbehandelten Zellen (K-) wurde als 100 % angesehen. Gezeigt ist die repräsentative Darstellung zwei unabhängiger Experimente.

Da die Suppression von TRAM1 in mit PrP^{Sc} infizierten Neuroblastoma-Zellen (ScN2a) eine Erhöhung der PrP^{Sc}-Menge zur Folge hat, sollte überprüft werden, ob im Umkehrschluss die Überexpression von TRAM1 eine Reduktion von PrP^{Sc} bewirkt. Dazu wurden ScN2a-Zellen mit den TRAM1-Expressionskonstrukten pBudCE4.1 TRAM1 und pcDNA2.1 TRAM1 transient transfiziert. Nach 96 h wurden die Zellen lysiert und nach der Behandlung mit Proteinase K mittels Western Blot analysiert. Abbildung 13 zeigt eine Reduktion von PrP^{Sc} in den transfizierten Zellen. Da dieser Effekt sich jedoch nicht von dem unterscheidet, der durch die Überexpression des Kontrollgens GFP hervorgerufen wurde, ist die Reduktion von

Ergebnisse I

PrP^{Sc} nicht auf einen spezifischen Effekt der TRAM1 Überexpression sondern auf einen Nebeneffekt der Transfektion zurückzuführen.

Zusammenfassend führte also die Suppression von TRAM1 zu einer deutlichen Zunahme der PrP-Expression sowohl in infizierten (ScN2a) als auch in nicht-infizierten (N2a) Maus-Neuroblastoma-Zellen, wohingegen die Überexpression von TRAM1 keinen spezifischen Effekt auf die PrP-Expression aufwies.

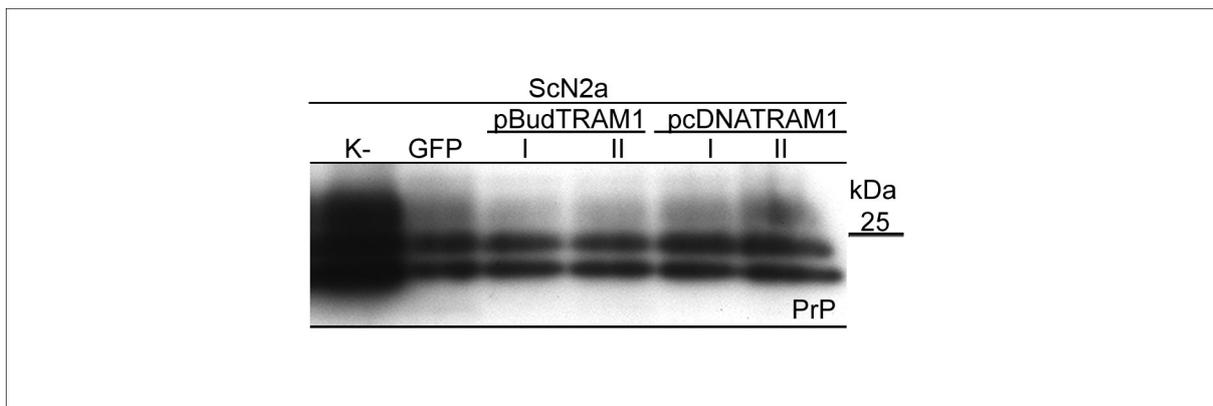


Abb. 13 Auswirkung der TRAM1-Überexpression auf PrP^{Sc} in ScN2a-Zellen. Infizierte murine Neuroblastoma-Zellen (ScN2a) wurden mit den Expressionsvektoren pBudCE4.1 TRAM1 und pcDNA3.1 TRAM1 transient transfiziert und für 96 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und jeweils 4/5 der Lysate mit Proteinase K behandelt. Nach der Proteinbestimmung der unbehandelten Lysate wurden die PK-verdauten Lysate angeglichen und vollständig auf ein Polyacrylamid-Gel (Tris-Cl 4 – 20 %) aufgetragen. Die PrP-Detektion erfolgte im Western Blot mit dem Antikörper W226. Gezeigt ist die repräsentative Darstellung zwei unabhängiger Experimente.

3.4. Einfluss der TRAM1-Suppression auf die APP-Prozessierung

Da die TRAM1 Suppression in ScN2a Zellen einen Einfluss auf die PrP-Produktion und -Konversion zeigte, sollten die Auswirkungen von TRAM1 auch an einem anderem Modell für neurodegenerative Erkrankungen getestet werden. Ein solches Zellmodell sind stabil transfizierte Zellen, die das Amyloid Precursor Protein (APP) überexprimieren. In diesem Modell kann die Prozessierung von APP untersucht werden.

Die Prozessierung von APP zu A β spielt eine entscheidende Rolle in der Alzheimer Krankheit. Im verwendeten Zellmodell wird während der Prozessierung APP von der α -Sekretase beziehungsweise β -Sekretase geschnitten und lösliches APP in Form von sAPP α beziehungsweise sAPP β von den Zellen in das Medium abgegeben. Membranständig bleiben in der Zelle die Spaltprodukte C89 oder C99 zurück. Diese werden durch eine weitere Sekretase (γ) gespalten woraufhin auch die Peptide P3 und A β ins Medium übergehen (Abb. 3; Kapitel 1.1.2).

Um zu untersuchen, ob TRAM1 einen Einfluss auf die APP-Prozessierung hat, wurde in humanen HEK293(APP695sw)-Zellen TRAM1 mittels siRNA (#1) supprimiert. Diese Zellen sind stabil mit der kodierenden cDNA für die neuronale Form von APP (APP695) transfiziert. Zudem beinhaltet die APP-cDNA eine doppelte Mutation (schwedische Mutation KM595/596NL), durch die es verstärkt zur Prozessierung mittels der β -Sekretase kommt und somit zu einer verstärkten Bildung von A β führt. Um die Konzentration des ins Medium sekretierten sAPP und A β zu erhöhen, wurde nach 48 h das Medium auf die Hälfte des üblicherweise verwendeten Volumens reduziert. Dazu wurde bei den Zellen ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellen für weitere 24 h inkubiert. Die Lysate und Überstände (Medium) wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert.

Abbildung 14A zeigt die erfolgreiche Suppression von TRAM1 in den Zellen zum Zeitpunkt der Lyse. Der Western Blot der Lysate mit einem Antikörper gegen APP zeigt eine deutliche Abnahme von APP in den Zellen, in denen TRAM1 supprimiert wurde (Abb. 14B). Die densitometrische Auswertung des Western Blots ergab einen niedrigere APP-Expression in den TRAM1 supprimierten Zellen im Vergleich zu den mock siRNA behandelten Zellen um etwa 45 % (Faktor 1,75) (Abb. 14C). Auch die Analyse der Überstände ergab einen Rückgang von sAPP im Medium der TRAM1 siRNA behandelten Zellen (Abb. 14B). Der Rückgang von APP war jedoch deutlich stärker als der von sAPP.

Die densitometrische Messung des Western Blots zeigt einen Rückgang von sAPP in den TRAM1 supprimierten Zellen um etwa 15 % im Vergleich zu den mock siRNA

Ergebnisse I

behandelten Zellen (Faktor 1,2) (Abb. 14C). Zusammenfassend hatte also die Suppression von TRAM1 in APP-überexprimierenden Zellen einen Rückgang sowohl von APP als auch sAPP zur Folge.

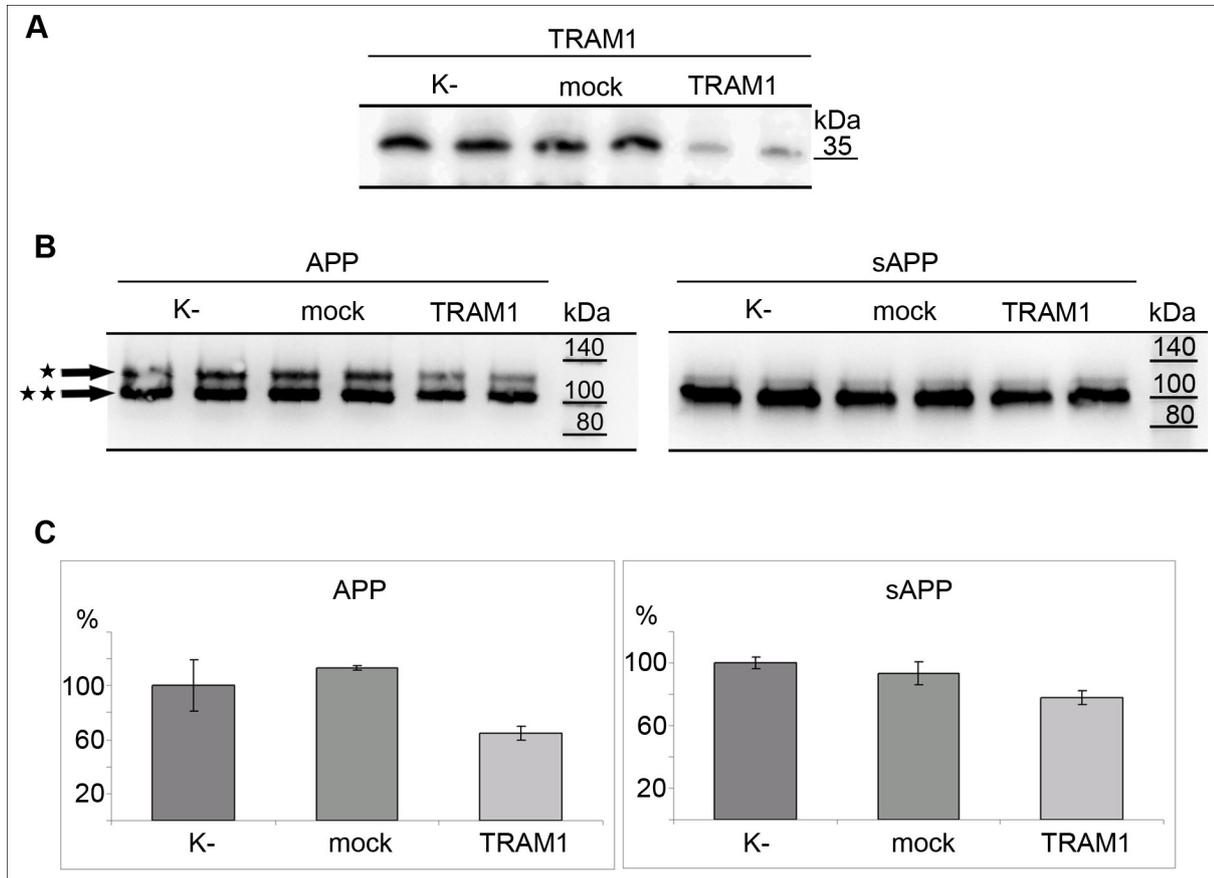


Abb. 14 Auswirkungen der TRAM1-Suppression auf die APP-Prozessierung. Mit APP-stabil transfizierte HEK-Zellen wurden mit TRAM1 siRNA transient transfiziert. Als Kontrolle dienten Zelllysate von unbehandelten Zellen (K-) und von Zellen, die mit nichtbindender siRNA (mock) behandelt wurden. Nach 48 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach weiteren 24 h wurde das Medium abgenommen und die Zellen lysiert. **A:** TRAM1-Western Blot der Lysate (20 µg Gesamtprotein). Die Proben wurden jeweils doppelt aufgetragen. **B:** APP-Western Blot der Lysate (20 µg Gesamtprotein; Antikörper CT-15) und sAPP-Western Blot der Überstände (15 µl; Antikörper 26D6). **C:** Densitometrische Auswertung der APP-Western Blots. Die Menge an APP bzw. sAPP in den unbehandelten Zellen (K-) wurde als 100 % angesehen. Der Fehlerbalken zeigt die Abweichung der doppelt aufgetragenen Proben. (*glykosyliertes APP, **unglykosyliertes APP)

3.5. Einfluss von TRAM1 auf die Proteinsekretion

Da gezeigt wurde, dass TRAM1 *in vitro* notwendig oder zumindest förderlich für die Sekretion vieler sekretorischer Proteine ist (GORLICH *et al.*, 1992; VOIGT *et al.*, 1996), sollte hier der Einfluss von TRAM1 auf die Proteinsekretion in Zellkultur getestet werden. Als Modell diente die Sekretion monoklonaler Antikörper in Hybridoma-Zelllinien.

Dazu wurden die PrP-Antikörper-produzierenden Maus-Zelllinien 7VC und 19B10 mit Maus-spezifischer TRAM1 siRNA transfiziert. Zur Untersuchung der sekretierten Antikörper vom Zeitpunkt der Transfektion bis zur erfolgreichen Suppression von TRAM1, wurde nach 48 h das Medium (Überstand) abgenommen und die Zellen lysiert (1–48 h). Um die Antikörpersekretion ausschließlich unter TRAM1 supprimierten Bedingungen zu erfassen, wurde bei weiteren Zellen 48 h nach der Transfektion ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach weiteren 24 h, in denen die Sekretion erfolgen konnte, wurden die Überstände abgenommen und die Zellen lysiert (48–72 h). Anschließend erfolgte die Überprüfung aller Medium-Überstände auf ihre Antikörperkonzentration.

Die Zelllysate zeigten sowohl nach 48 h als auch nach 72 h eine deutliche Reduktion der TRAM1 Expression in den mit TRAM1 siRNA behandelten Zellen im Vergleich mit den untransfizierten Zellen und den Zellen, welche mit der Kontroll-siRNA (mock) behandelt wurden (Abb. 15A). Die dazugehörigen Überstände wurden im ELISA im Vergleich zu einem Antikörper bekannter Konzentration hinsichtlich ihrer Reaktivität mit einem α -Maus-Sekundärantikörper getestet. Die photometrische Auswertung der Farbreaktion der Überstände bei 450 nm ergab keinen signifikanten Zusammenhang der Antikörperkonzentration und der Behandlung mit der siRNA (Abb. 15C).

Um die Funktionalität der Antikörper an das jeweilige Antigen zu testen und gegebenenfalls Faltungsanomalien nachzuweisen, wurden die Überstände mittels ELIFA (Enzyme-linked Immunoflow Assay) auf ihre Bindungsfähigkeit getestet. Hierzu wurde 1 μ g rekombinantes PrP-Protein pro Well mit einer Dot Blot Apparatur

Ergebnisse I

(ELIFA, Pierce) auf eine Nitrocellulose-Membran gesogen. Anschließend wurde die Membran mit verschiedenen Konzentrationen des Überstands inkubiert und die Bindung der Antikörper durch den Sekundärantikörper detektiert. Auch hier konnten keine Unterschiede der Signalintensitäten zwischen den verschiedenen Überständen beobachtet werden (Abb. 15B). Somit scheint die Suppression von TRAM1 keinen Einfluss auf die Sekretion und die Funktionalität der Antikörper der Hybridomazelllinien 7VC und 19B10 zu haben.

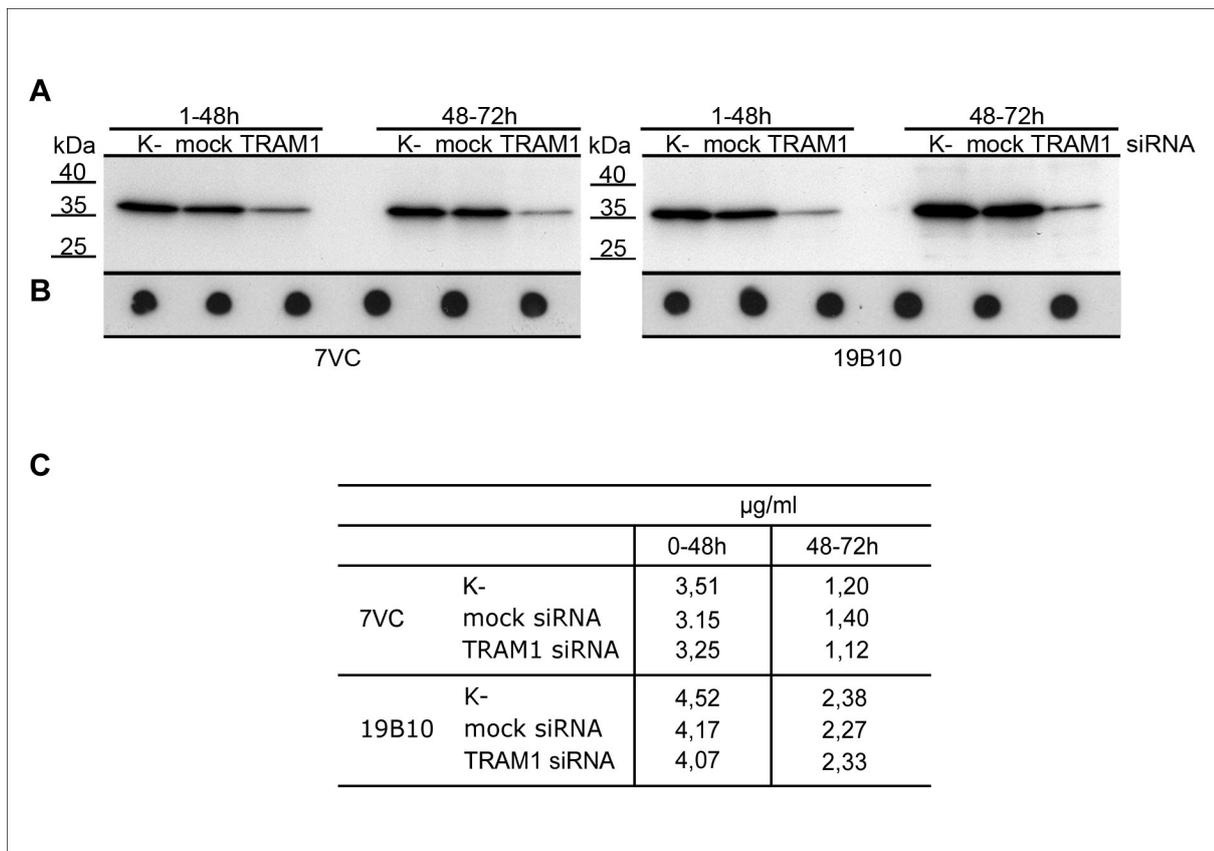


Abb. 15 Auswirkung der TRAM1 Suppression auf die Sekretion monoklonaler Antikörper. Die Antikörper-sezernierenden Hybridoma-Zelllinien 7VC und 19B10 wurden mit TRAM1 siRNA transfiziert und für 48 h inkubiert. Bei der einen Hälfte wurden die Zellen und die Überstände nach 48 h geerntet (0 – 48 h). Bei der anderen Hälfte wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und nach weiteren 24 h Inkubation geerntet (48 – 72 h). Als Kontrolle dienen Überstände von unbehandelten Zellen (K-) und von Zellen, die mit nichtbindender siRNA (mock) behandelt wurden. **A:** TRAM1 Western Blot der Zelllysate. **B:** ELIFA der Zellüberstände hinsichtlich der Antikörperfunktionalität. **C:** ELISA-Auswertung der Zellüberstände hinsichtlich der Antikörpermenge.

3.6. TRAM1-Suppression und Zellvitalität

Bei der Transfektion der Zelllinien entstand der Eindruck, dass die mit TRAM1 siRNA transfizierten Zellen nach vier Tagen Inkubation eine geringere Vitalität aufwiesen als die Kontrollen. Um diese Beobachtung zu untersuchen, wurden die Neuroblastoma-Zelllinien N2a (Maus) und NLF (human) mit siRNA (N2a: Maus-spezifische siRNA # 6; NLF: human-spezifische siRNA # 1) transfiziert und nach 96 h der Farbstoff MTT hinzugegeben. Der MTT-Test dient der Bestimmung der metabolischen Aktivität von Zellen, basierend auf der Ringspaltung des Tetrazoliumsalses MTT zu Formazan durch mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen. Zur photometrischen Bestimmung dieses Umsatzes wurden die Zellen in DMSO lysiert und somit der von den Zellen umgesetzte Farbstoff gelöst. Dadurch wurden alle zum Zeitpunkt der Messung lebenden Zellen erfasst.

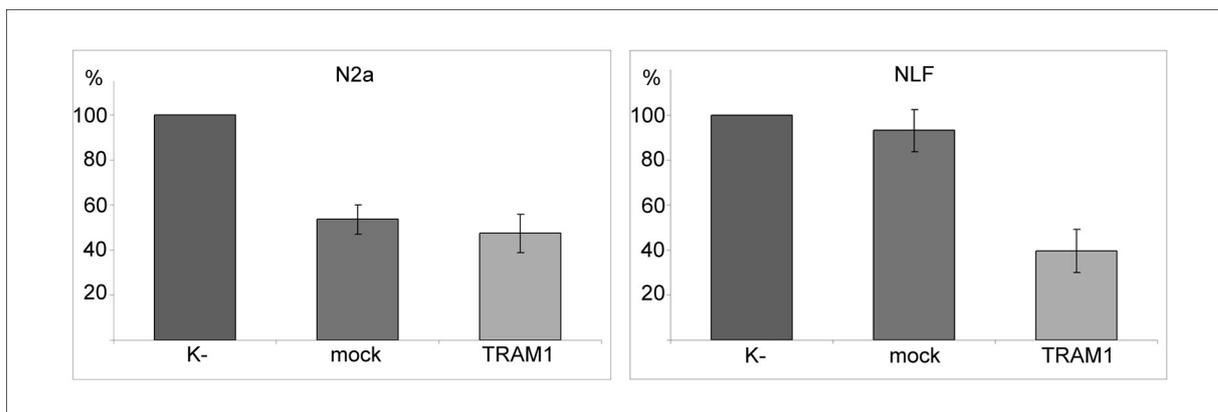


Abb. 16 Einfluss der TRAM1 Suppression auf die Zellvitalität. MTT-Test. Die Zelllinien N2a und NLF wurden mit TRAM1 siRNA transfiziert. Als Referenz dienen unbehandelte und mit mock siRNA behandelte Zellen. Nach 96 h wurde der Farbstoff MTT ins Medium gegeben. Nach einer Inkubation der Zellen für 6 h bei 37 °C und 5 % CO₂ zum Umsatz des Farbstoffes durch die lebenden Zellen wurden diese in DMSO lysiert. Der so gelöste Farbstoff wurde bei einer Wellenlänge von 530 nm und einer Referenzwellenlänge von 670 nm gemessen. Dargestellt ist die photometrische Auswertung der Farbtintensität der Lysate. Die Färbung der untransfizierten Zellen wurden als 100 % angesehen. Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung zwischen drei unabhängigen Messungen.

Die photometrische Auswertung zeigte, dass in beiden getesteten Zelllinien eine Abnahme der Zellaktivität durch TRAM1-Suppression im Vergleich zu den untransfizierten Zellen um mehr als 50 % erfolgte (N2a-Zellen: 53 %; NLF-Zellen: 60 %). Die N2a Zellen zeigten jedoch kaum einen Unterschied hinsichtlich der

Abnahme der Vitalität nach Transfektion mit TRAM1 siRNA (53 %) oder mock siRNA (46 %). Im Gegensatz dazu war ein TRAM1-spezifischer Effekt bei den NLF-Zellen zu beobachten. Hier war die Abnahme der Zellvitalität in den TRAM1-supprimierten Zellen mit 60 % deutlich höher als die der Transfektionskontrolle (7 %) (Abb. 16).

Im Vergleich mit unbehandelten Zellen hatte also die Transfektion der Zelllinien N2a und NLF mit TRAM1 siRNA nach 96 h einen Rückgang der Zellvitalität um mehr als 50 % zur Folge. Während die Zellvitalität der mock siRNA behandelten NLF-Zellen der der unbehandelten Zellen entsprach, hatte bei den N2a Zellen die Transfektion mit der Kontroll-siRNA einen ähnlichen Effekt wie die Transfektion mit der TRAM1 siRNA.

3.7. Schizophrenie und TRAM1

In einem Konsortium von humanen Normalhirnen und Gehirnen von Patienten mit Schizophrenie konnte beobachtet werden, dass TRAM1 in den Schizophrenie-Hirnen signifikant geringer exprimiert war (KORTH *et al.*, unveröffentlicht) (Abb. 17).

Vor diesem Hintergrund sollte in humanen Zelllinien getestet werden, wie sich sowohl die Suppression von TRAM1 als auch die Überexpression von TRAM1 auf die Expression von Proteinen auswirkt, die mit Schizophrenie in Zusammenhang gebracht werden. Solche Kandidatenproteine sind unter anderem Dysbindin, Neuregulin1, Tyrosin Hydroxylase und Catechol O-methyltransferase (COMT). Während Dysbindin und Neuregulin1 auf Grund genetischer Studien als Schizophrenie-verursachende Faktoren in Frage kommen, wird die Beteiligung der Proteine Tyrosin Hydroxylase und COMT auf Grund ihrer Rolle im Dopamin-Stoffwechsel für wahrscheinlich angesehen. So zeigten biochemische Studien an *post mortem* Gehirnen, dass die Expression von Neuregulin1 bei Schizophrenie erhöht ist (HAHN *et al.*, 2006). Die Expression von Dysbindin hingegen ist in Schizophrenie-Gehirnen reduziert (BRAY *et al.*, 2005). Zudem wurde eine Abnahme Tyrosin Hydroxylase-immunoreaktiver, kortikaler Axone in Schizophrenie beobachtet

(LEWIS und AKIL, 1997). COMT ist ein Enzym, das an der Beseitigung von Dopamin aus den Synapsen beteiligt ist. Daher könnte es an der Regulation von Neurotransmittern, die mit Schizophrenie in Zusammenhang gebracht wird, involviert sein (CRADDOCK *et al.*, 2006).

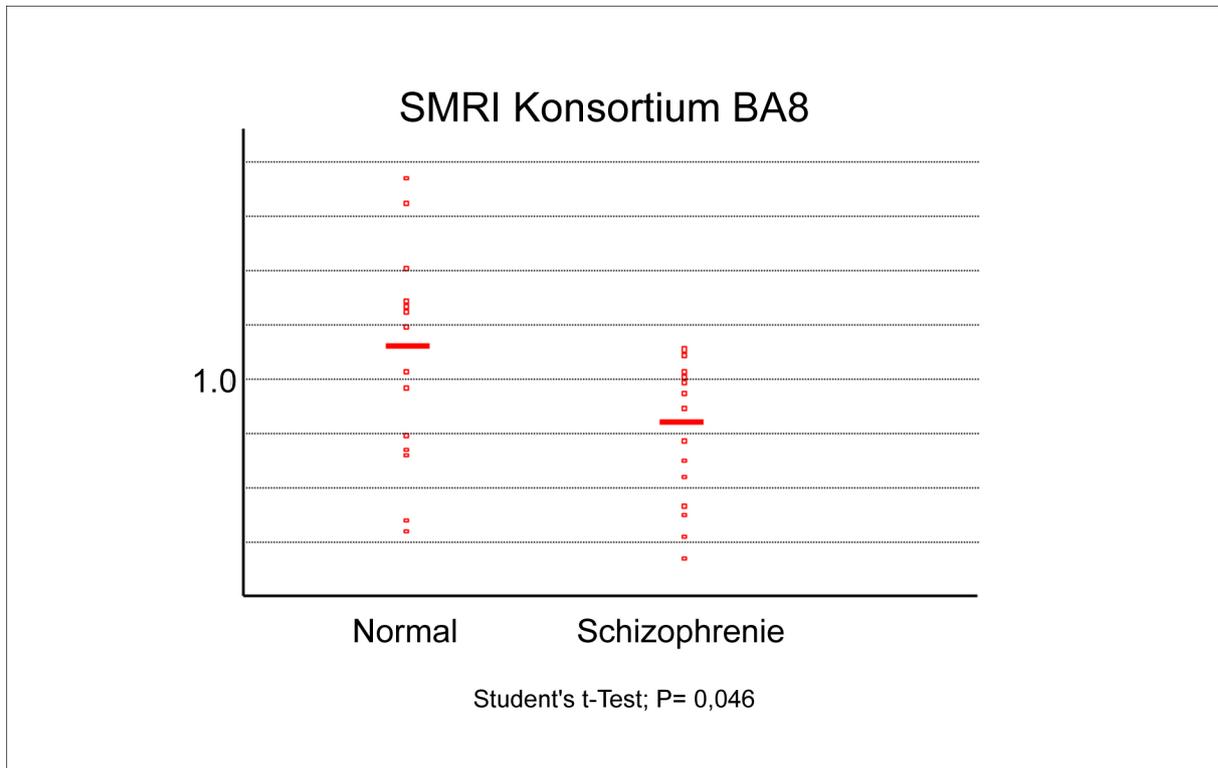


Abb. 17 TRAM1 ist bei Patienten mit Schizophrenie im Durchschnitt vermindert exprimiert. Getestet wurden Schizophrenie- und Normalhirnhomogenate der Brodmann Area 8 (BA8) aus der Sammlung des „Stanley Medical Research Institute“ (SMRI, <http://www.stanleyresearch.org>).

Da in den Schizophrenie-Gehirnen eine Reduktion von TRAM1 beobachtet wurde, sollte in Neuroblastoma-Zelllinien die Auswirkung einer TRAM1-Suppression auf die Schizophrenie-assoziierten Faktoren Neuregulin1, Dysbindin, Tyrosin Hydroxylase und COMT untersucht werden. Die Neuroblastoma-Zelllinien NLF und SKNAS wurden mit einer nicht-bindenden mock siRNA und der TRAM1 siRNA # 1 transfiziert. Nach 72 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Lysate auf dem Western Blot untersucht. TRAM1 zeigte im Western Blot eine deutliche Reduktion wohingegen Neuregulin1, COMT und Tyrosin Hydroxylase keine Veränderung in der Expression aufwiesen (Abb. 18). Der Expressionslevel von Dysbindin zeigte ebenfalls keine Unterschiede in den Zelllysaten (nicht gezeigt).

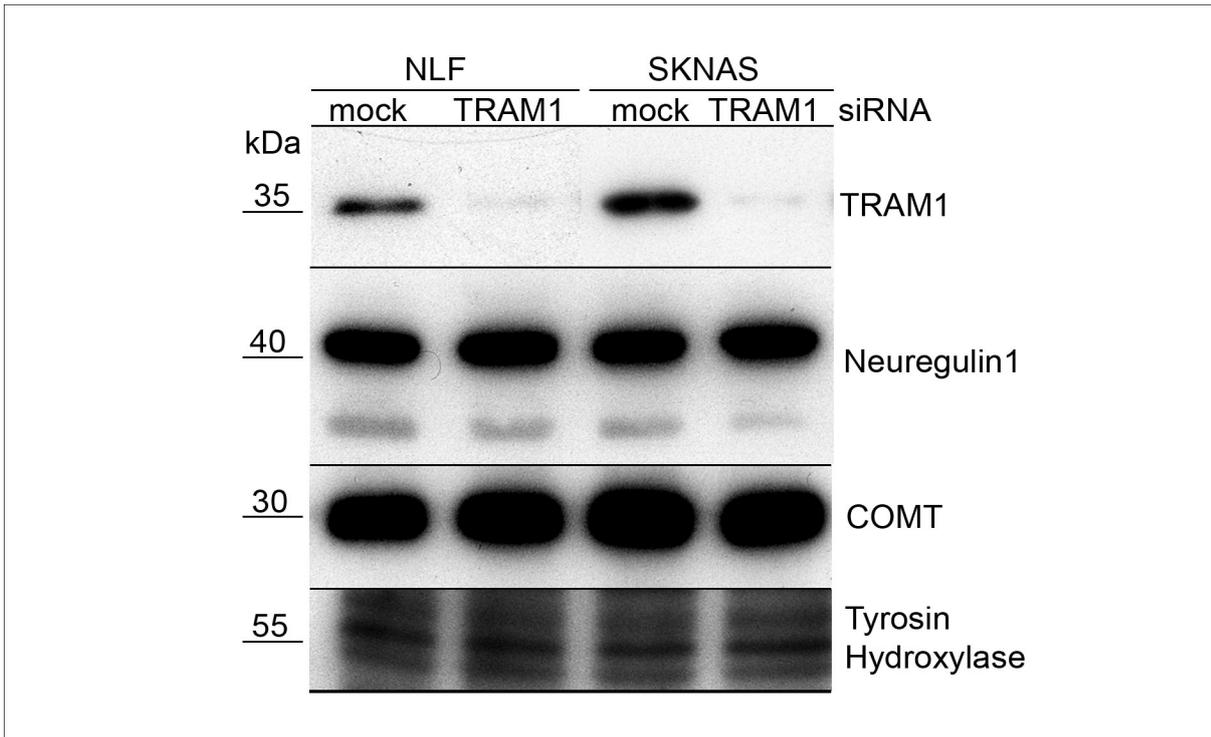


Abb. 18 Auswirkung der TRAM1-Suppression auf SCZ-Faktoren. NLF und SKNAS Zellen wurden mit TRAM1 siRNA (# 1) transfiziert und nach 48 h lysiert. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE in einem 10 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteinexpression im Western Blot mit Antikörpern gegen TRAM1, Neuregulin1, Catechol O-methyltransferase (COMT) und Tyrosin Hydroxylase detektiert. Als Kontrollen dienten unbehandelte und mit mock siRNA behandelte Zellen.

Da die Suppression von TRAM1 keine Auswirkung auf die Expression der untersuchten Proteine hatte, sollte die Expression der gleichen Proteine unter Einfluss der Überexpression von TRAM1 untersucht werden. Dazu wurden die humanen Neuroblastoma-Zelllinien IMR und NLF mit dem Plasmid pBudCE4.1 TRAM1 transient transfiziert und die Lysate nach 48 h im Western Blot auf die Expression von Neuregulin1, Dysbindin, Tyrosin Hydroxylase und COMT untersucht. Abbildung 19 zeigt, dass die Überexpression von TRAM1 in den Zelllinien IMR und NLF keinen Einfluss auf das Expressionslevel von Neuregulin1, Dysbindin und Tyrosin Hydroxylase hat. Auch bei der Expression von COMT konnten keine Unterschiede beobachtet werden (nicht gezeigt).

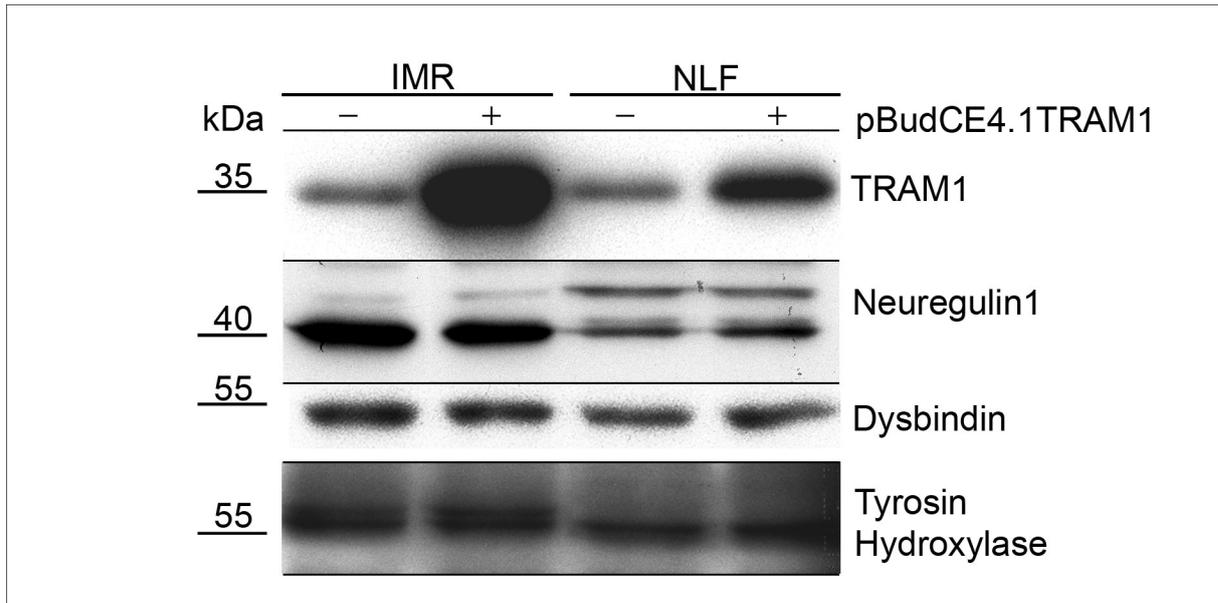


Abb. 19 Auswirkung der TRAM1-Überexpression auf Schizophrenie-assoziierte Faktoren. IMR und NLF Zellen wurden mit dem Expressionskonstrukt pBudCE4.1 TRAM1 transient transfiziert und nach 48 h lysiert. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE in einem 10 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteinexpression im Western Blot mit Antikörpern gegen TRAM1, Neuregulin1, Dysbindin und Tyrosin Hydroxylase detektiert. Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass in den hier verwendeten Zellen sowohl die Suppression als auch die Überexpression von TRAM1 keinen Einfluss auf die Expression der Proteine Neuregulin1, Dysbindin, Tyrosin Hydroxylase und Catechol O-methyltransferase hat.

3.8. Expression von rekombinantem TRAM1 in *E. coli*

Zur weiteren Charakterisierung von TRAM1 sollte das Protein sowohl in seiner gesamten Länge als auch zwei Subdomänen rekombinant exprimiert werden. Die TRAM1-Domänen sollten zur Untersuchung potentieller Liganden von TRAM1 dienen, während TRAM1 in voller Länge zur Herstellung polyklonaler Antikörper in Kaninchen verwendet werden sollte.

Zunächst wurden zur Expression in *E. coli* zwei Domänen ausgesucht, die nach der Vorhersage von GORLICH *et al.* (1992) und SOSUI, einem Programm zur

Ergebnisse I

Klassifikation und Sekundärstruktur-Vorhersage von Membranproteinen (HIROKAWA *et al.*, 1998) (<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp>), cytosolisch exponiert sein sollten (Abb. 5). Die Domäne TRAM1 A umfasst die erste große cytoplasmatische Region von TRAM1 mit den Aminosäuren 101 – 126 und entspricht einer Größe von 4 kDa. Die zweite gewählte Domäne TRAM1 B beinhaltet die C-terminale Region von TRAM1 (Aminosäuren 317 – 374) und hat eine Größe von etwa 8 kDa (Abb. 20). Die cDNA dieser Domänen wurden in den Glutathion-S-Transferase (GST) Fusionsvektor pGEX4T3 kloniert und in den *E. coli*-Stamm BL21 transformiert. Durch die Bindung an GST (~ 26 kDa) und die hydrophile Natur der Domänen sollten die GST-Fusionsproteine nach der Expression in *E. coli* und der Aufreinigung in Lösung befinden.

TRAM1-Domäne A (AS 101-126): LDKINRRMHFSKTKHSKFNESGQLS

TRAM1-Domäne B (AS 317-374): NFQLRRWREHSAFQAPAVKKKPTVTKGRSSK
KTENGVNGTLTSNVADSPRNKKEKSS

Abb. 20 Aminosäuresequenzen der cytosolisch exponierten TRAM1 Domänen. Die Domänen A und B befinden sich nach SOSUI (<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp>) im Cytosol und wurden zur Expression in *E. coli* ausgewählt (siehe auch Abb. 5).

Bei Erreichen von $OD_{600} \sim 0,6$ (nach etwa 3,5 h) wurden die Bakterien mit IPTG induziert und nach weiteren 3,5 h geerntet. Anschließend wurden die Zellen lysiert und pelletiert. Der lösliche Überstand wurde über eine GSH-Sepharose-Säule gegeben und die Peptide so über GST an GSH gebunden. Die Elution erfolgte durch einen Überschuss an gelöstem GSH im Elutionspuffer. Um das gelöste GSH anschließend wieder zu entfernen, wurden die Eluate gegen PBS dialysiert. Die Reinheit und Vollständigkeit der Peptide wurde im Coomassie-Gel überprüft (Abb. 21). Hier ist zu sehen, dass die GST-Fusionspeptide einen hohen Reinheitsgehalt aufwiesen und den erwarteten Größen entsprachen. Das GST-TRAM1 B Peptid zeigte zudem ein Spaltprodukt, das eine Größe von etwa 28 kDa aufwies.

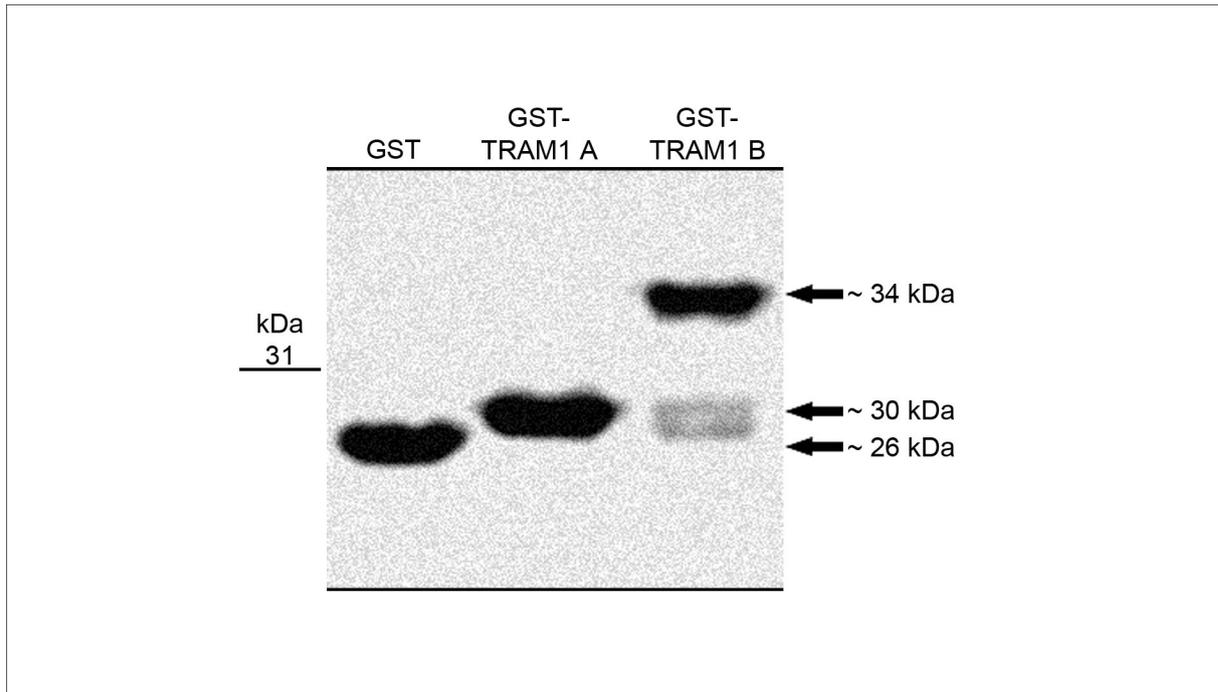


Abb. 21 Expression von TRAM1-Domänen als GST-Fusionsproteine. Die Domänen TRAM1 A und TRAM1 B wurden mittels des Expressionsvektors pGEX4T3 als GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und über GSH-Sepharose aufgereinigt. Nach der Dialyse der Eluate gegen PBS wurden die Peptide auf ein 15 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Analyse erfolgte durch die Anfärbung des Gels mit Coomassie-Blaufärbung. Als Größenreferenz wurde GST ebenfalls auf das Gel aufgetragen.

3.8.1. Expression von rekombinantem Protein in *E. coli*

Zur Herstellung eines polyklonalen Antikörpers in Kaninchen sollte TRAM1 in voller Länge rekombinant exprimiert werden. Dazu wurde die cDNA für das Protein, um ein N-terminales HIS₆- und c-myc-Epitop erweitert und in den prokaryotischen Expressionsvektor pET11a kloniert. Anschließend wurden BL21 rosetta Zellen mit diesem Konstrukt transformiert. Die Expression von HIS₆-c-myc-TRAM1 erfolgte unter verschiedenen Bedingungen der Induktion (1 mM, 250 μ M oder 10 μ M IPTG) und des Wachstums (Zugabe von Rifampicin oder MgCl₂). Nach der Lyse zeigte die Überprüfung der Überstände und Pellets mittels Western Blot-Analyse, dass sich das Protein auf Grund seiner hohen Hydrophobizität wie erwartet in den bakteriellen Einschlusskörpern (Inclusion Bodies) befindet, also in den Bakterien unlöslich ist (Abb. 22).

Ergebnisse I

Die höchste Expression von TRAM1 schien bei der Induktion mit 1 mM IPTG und dem Wachstum der Zellen unter Zugabe von 100 µg/ml Rifampicin gegeben zu sein. Dieses war zu erwarten, da unter diesen Bedingungen die Bildung von Inclusion Bodies begünstigt wird. Daher wurden diese Bedingungen dazu verwendet, eine neue Expressionskultur anzupflanzen. Die Zellen wurden lysiert, abzentrifugiert und das Pellet mit den Inclusion Bodies weiterverwendet. Diese wurden in stark denaturierendem Milieu (20 mM MOPS pH 8, 8 M Urea, 20 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM EDTA) in Lösung gebracht und zur weiteren Aufreinigung von TRAM1 verwendet.

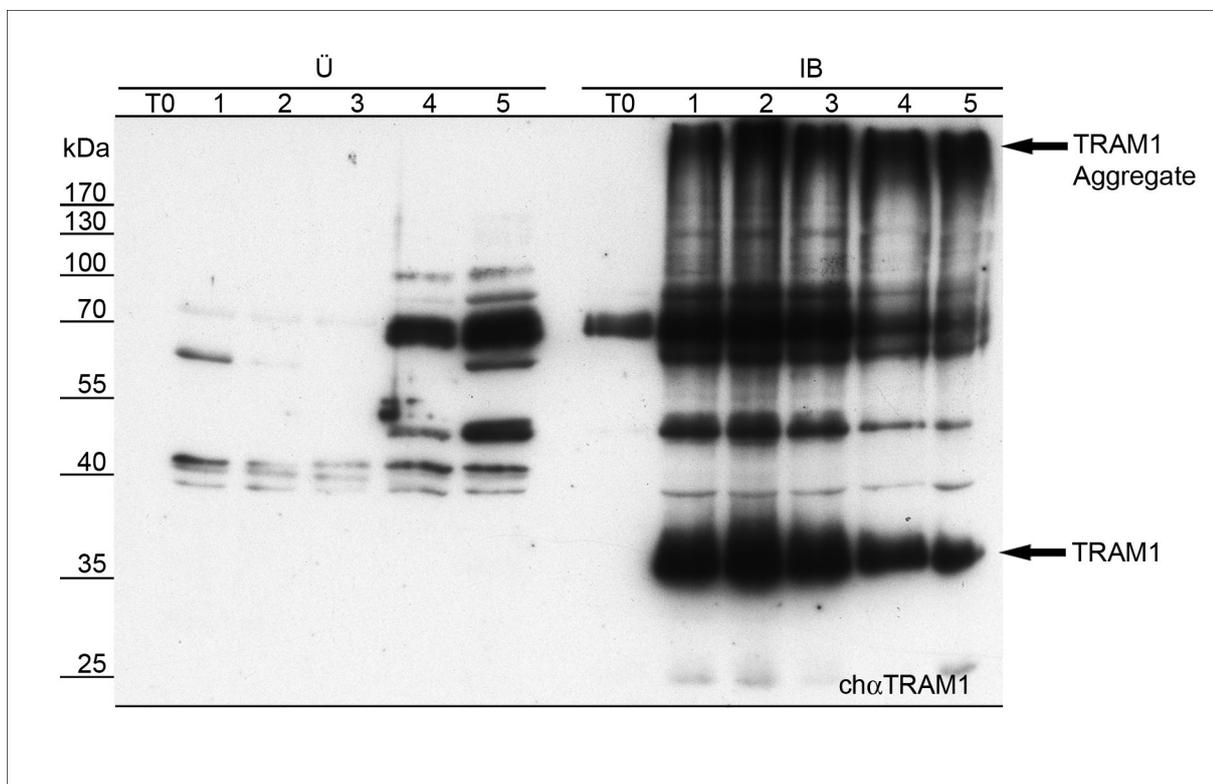


Abb. 22 Expressionskulturen von *E. coli* unter verschiedenen Bedingungen. *E. coli* BL21 rosetta wurden mit dem Expressionsvektor pET11a HIS₆-mycTRAM1 transformiert. Die Expression erfolgte unter verschiedenen Bedingungen (1: 1 mM IPTG; 2: 1 mM IPTG, 100 µg/ml Rifampicin; 3: 1 mM IPTG, 10 mM MgCl₂; 4: 250 µM IPTG; 5: 10 µM IPTG). Nach Lyse der Zellen wurde das Lysat zentrifugiert und der lösliche Teil (Ü) von den unlöslichen Inclusion Bodies (IB) getrennt. Ü und IB wurden für 5 Minuten in SDS-Probenpuffer bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf ein 10 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen und im Western Blot mittels des Antikörpers chαTRAMC auf das Vorkommen von TRAM1 untersucht. Als Negativkontrolle diente Ü und IB von Bakterien vor der Induktion (T0). Die Immunreaktion des Antikörpers gegen TRAM1 ist durch die Pfeile gekennzeichnet. Die übrigen Banden zeigen eine unspezifische Kreuzreaktivität des Antikörpers.

3.8.2. Aufreinigung über Kationen-Austausch-Chromatographie

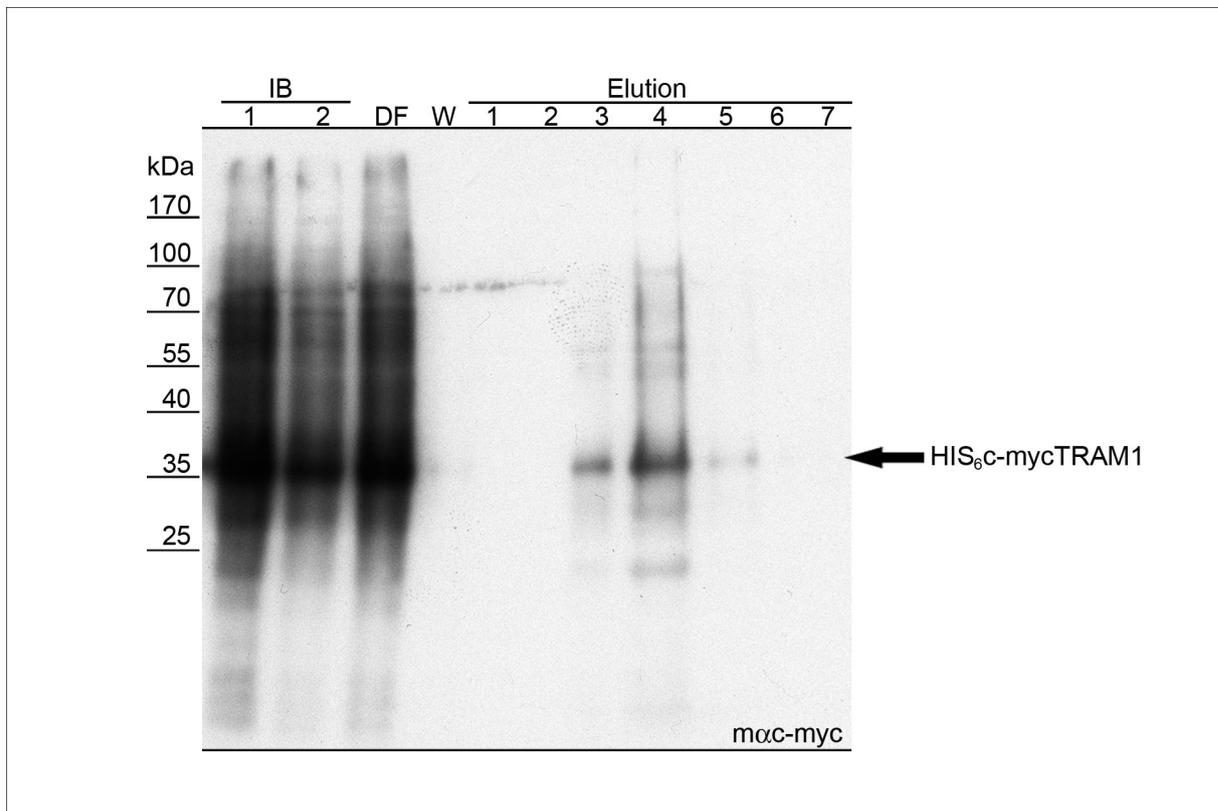


Abb. 23 Western Blot der Aufreinigung über Kationen-Austauscher-Säule. *E. coli* BL21 rosetta wurden mit dem Expressionsvektor pET11a HIS₆-c-mycTRAM1 transformiert. Die Expression des Konstruktes erfolgte nach der Zugabe von 1 mM IPTG in Anwesenheit von 100 µg/ml Rifampicin für 3,5 h. Nach Lyse der Zellen wurden die IB in 20 mM MOPS pH 8, 8 M Urea, 20 mM β-Mercaptoethanol und 1 mM EDTA (IB 1+2) gelöst und über eine Kationenaustauscher-Säule gegeben. Der Durchfluss (DF) wurde aufgefangen. Nach dem Waschen der Säule mit 100 mM NaCl erfolgte die Elution mittels 500 mM NaCl. Die Eluate wurden in 1 ml Schritten gesammelt. Zur Überprüfung der Aufreinigung wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion erfolgte im Western Blot mittels eines Antikörpers gegen das c-myc-Epitop.

Da das Konstrukt HIS₆-c-myc-TRAM1 einen theoretischen isoelektrischen Punkt (pI) von 9,49 hat, ist das Protein unter den verwendeten Pufferbedingungen (20 mM MOPS pH 8, 8 M Urea, 20 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM EDTA) positiv geladen. Daher wurde zur Aufreinigung eine Kationen-Austauscher-Säule (Macro-Prep High S) verwendet. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 500 mM NaCl und die Eluate wurden in 1 ml Schritten aufgefangen (1 - 7). Die Proben wurden ohne Erhitzen mit SDS-Probenpuffer versetzt und über ein 10 %iges Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Überprüfung der Eluate im Western Blot mit einem gegen das c-myc-Epitop

gerichteten Antikörper zeigte nur ein schwaches Signal in den Eluaten 3 - 5, wohingegen ein deutliches Signal im Ausgangsmaterial (IB 1+2) und im Durchfluss (DF) zu sehen war (Abb. 23).

3.8.3. Aufreinigung über Affinitäts-Chromatographie

Da die Bindung von TRAM1 an das Material der Kationen-Austauscher-Säule nicht sehr stark zu sein schien, sollte das Protein über Affinitäts-Aufreinigung gewonnen werden. Hierzu wurde als Säulenmaterial NiNTA Agarose gewählt, an das das HIS₆-Epitop des exprimierten TRAM1 spezifisch binden sollte. Die Elution erfolgte in mehreren Schritten mit 100 mM Imidazol und anschließend mit 5 beziehungsweise 50 mM EDTA. Zur Überprüfung der Bindung von TRAM1 an das Säulenmaterial wurde vor der Elution ein Teil der Agarose Beads in SDS-Probenpuffer für fünf Minuten bei 99 °C inkubiert.

Abbildung 24 zeigt die Western Blot Analyse der NiNTA-Aufreinigung unter der Verwendung eines Antikörpers gegen TRAM1. Der Großteil des Proteins hat nicht an die Säule gebunden und befand sich im Durchfluss (DF). Die Elution mit Imidazol zeigte nur schwache Signale bei 36 kDa, etwas stärker war das Signal bei der Elution mit EDTA. Die Inkubation der Agarose-Beads mit SDS-Probenpuffer bei 99 °C zeigte, dass ein Anteil von TRAM1 nicht von den Agarose-Beads eluiert wurde (NiNTA Agarose A: Agarose-Beads vor der Elution; NiNTA Agarose B: Agarose-Beads nach der Elution). Durch die Erhitzung der Proben auf 99 °C kam es zu einer Aggregation der hydrophoben Domänen von TRAM1. Daher wurde hier TRAM1 im Western Blot am Übergang vom Sammelgel zum Trenngel detektiert.

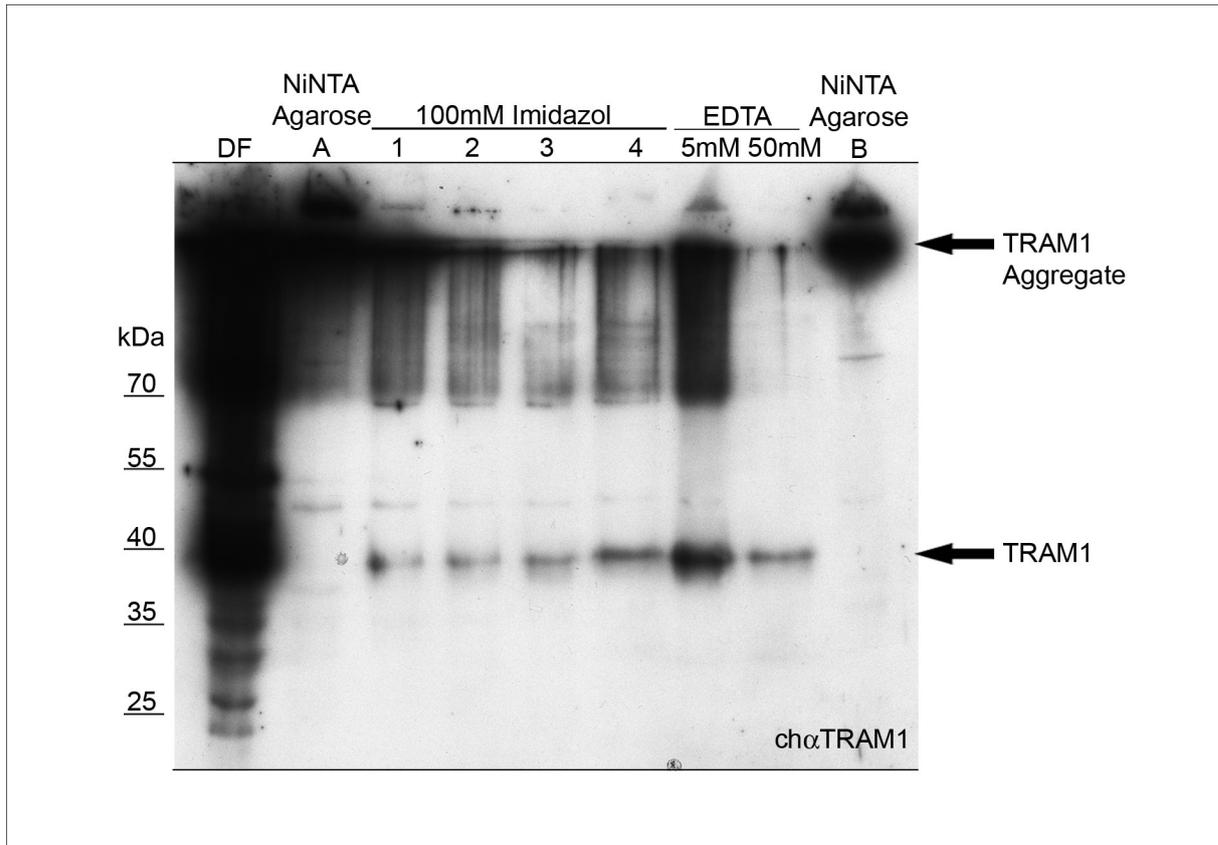


Abb. 24 α TRAM1-Western Blot der Affinitäts-Aufreinigung über NiNTA Agarose. Der Durchfluss der Kationenaustauscher-Säule wurde über eine NiNTA Agarose-Säule gegeben. Der Durchfluss (DF) wurde wiederum aufgefangen und die Elution erfolgte mittels 100 mM Imidazol und anschließend mit 5 oder 50 mM EDTA. Die Proben wurden zur Analyse mit SDS-Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Agarose-Beads wurden vor (NiNTA Agarose A) und nach der Elution (NiNTA Agarose B) in SDS-Probenpuffer bei 99 °C inkubiert und der Überstand ebenfalls aufgetragen. Die Detektion von TRAM1 erfolgte im Western Blot mit dem Antikörper ch α TRAM1.

3.8.4. Aufreinigung über differentielle Löslichkeit

Durch seine vielen Transmembrandomänen handelt es sich bei TRAM1 um ein hydrophobes Protein, wodurch zur Lösung aus den Inclusion Bodies stark denaturierende Konditionen geschaffen werden mussten. Ein Ausfallen des Proteins bei abnehmender Urea-Konzentration aus der Lösung wäre daher anzunehmen. Nach unserer Hypothese könnte das so ausgefallene Protein abzentrifugiert und anschließend resuspendiert werden. Die so gebildeten TRAM1 Aggregate könnten zur Immunisierung von Kaninchen und Herstellung polyklonaler Antikörper verwendet werden. Daher wurde das in Urea gelöste TRAM1 mit 20 mM MOPS pH 8 zu einer finalen Urea-Konzentration von 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 und 1 M verdünnt. Anschließend

Ergebnisse I

wurden die Proben kurz gevortext und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Pelletierung der Proteine erfolgte durch Ultrazentrifugation für 40 Minuten bei 100.000 g. Die Pellets wurden in 8 M Urea und 20 mM MOPS entsprechend des eingesetzten Volumens resuspendiert und jeweils 10 µl auf eine Nitrocellulose-Membran gegeben. Von den Überständen wurde ebenfalls 10 µl aufgetragen. Der Antikörper gegen TRAM1 zeigte im Dot Blot ausschließlich in den Überständen Signale (Abb. 25). Eine Präzipitation von TRAM1 durch Abnahme der Urea-Konzentration ist also nicht erfolgt.

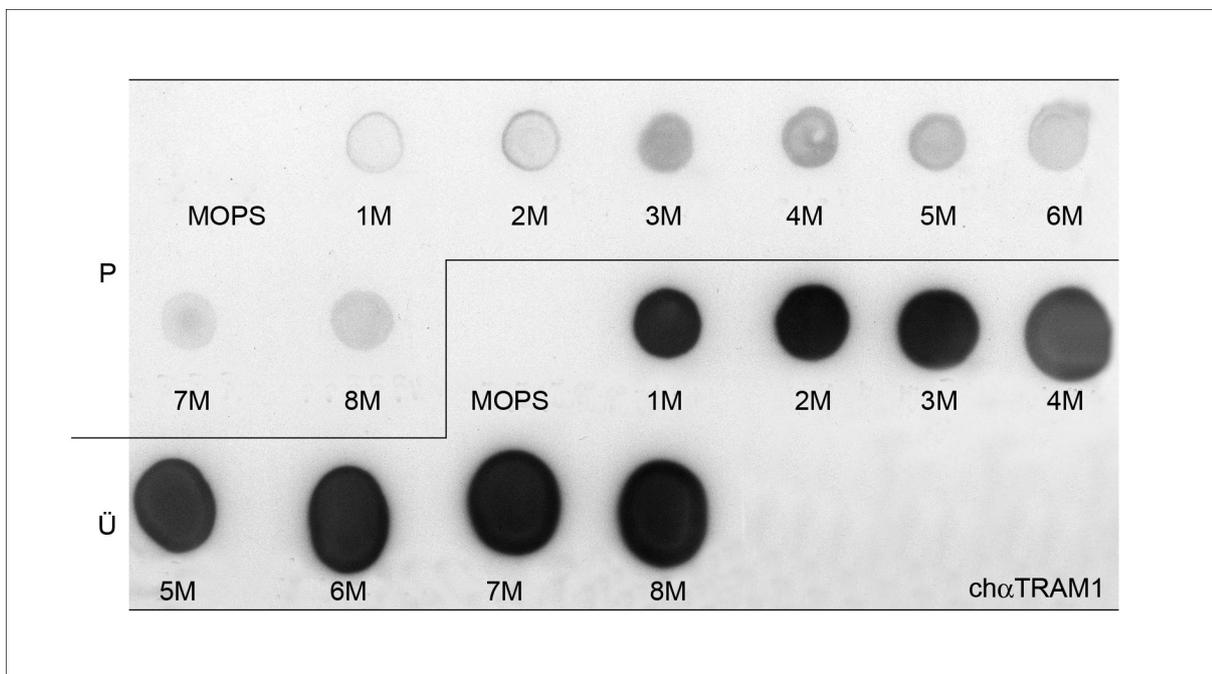


Abb. 25 α TRAM1-Dot Blot der Aufreinigung von HIS₆-c-myc-TRAM1 mittels differentieller Löslichkeit. Der Durchfluss (DF) der NiNTA Säule wurde mit 20 mM MOPS pH 8 auf eine finale Urea-Konzentration von 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 8 M verdünnt. Als Negativkontrolle wurde eine Probe ohne Anteil an DF mitbehandelt (MOPS). Nach einer Inkubation der Proben für 1 h bei Raumtemperatur erfolgte die Pelletierung der Präzipitierten Proteine bei 100.000 g für 40 Minuten. Die Pellets wurden in 8 M Urea und 20 mM MOPS entsprechend des eingesetzten Volumens resuspendiert und jeweils 10 µl auf eine Nitrocellulose-Membran gegeben. Von den Überständen wurde ebenfalls 10 µl aufgetragen. Als Kontrolle diente hier ebenfalls 10 µl 20 mM MOPS ohne DF. Die Detektion erfolgte mit dem Antikörper ch α TRAM1.

Zusammenfassend konnten die cytosolischen TRAM1-Domänen TRAM1 A (Aminosäuren 101 – 126) und TRAM1 B (Aminosäuren 317 – 374) als GST-Fusionspeptide sowie TRAM1 in gesamter Länge mit den N-terminalen Epitopen HIS₆ und c-myc in *E. coli* rekombinant hergestellt werden. Die Expression von

HIS₆-c-myc-TRAM1 erfolgte hierbei in bakteriellen Einschlusskörperchen (Inclusion Bodies). Die Aufreinigung der GST-Fusionspeptide TRAM1 A und TRAM1 B erfolgte über Affinitätschromatographie mittels GSH-Sepharose. Das rekombinante HIS₆-c-myc-TRAM1 konnte bisher weder über Kationenaustausch- noch über Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Die weitere Aufreinigung wurde daher nicht weiter verfolgt.

3.9. TRAM1-Liganden

3.9.1. Kandidatenliganden aus dem Translokon

Zur weiteren Untersuchung der Funktionen von TRAM1 sollten mit den rekombinant exprimierten TRAM1-Domänen Liganden gefunden werden. Hierzu wurde ein Pull Down Experiment mit GSH-Sepharose-gekoppelten GST-Fusionspeptiden und Maus-Hirnhomogenat durchgeführt. Anschließend wurden die Proben im Western Blot auf Liganden untersucht. Da TRAM1 Bestandteil des Translokons ist, wurde untersucht, ob Translokonkomponenten an die durch TRAM1 A und TRAM1 B definierten Subdomänen binden. Die Detektion potentieller Liganden erfolgte über verschiedene Hühnerantikörper gegen Proteine des Translokations-Apparates (Tabelle 1). Abbildung 26 zeigt, dass der Antikörper gegen den C-Terminus von TRAM1 (ch α TRAMC) wie zu erwarten das TRAM1 B-Peptid detektiert, das in gewissem Maße durch die Inkubation im Probenpuffer von der Sepharose gelöst wird. Ferner wurde mit dem TRAM1 B Peptid die β -Untereinheit des Protein Transportprotein Sec61 (Sec61 β) detektiert, jedoch nicht in der zu erwartenden Höhe von etwa 10 kDa. Möglicherweise liegt das Sec61 β Protein hier in einem SDS-resistenten Proteinkomplex vor.

Ergebnisse I

Tabelle 1 Polyklonale Hühner-Antikörper gegen Proteine des Translokations-Apparates.

Polyklonale Hühnerantikörper gegen Proteine des Translokons		
	Name	Sequenz
Sec61αC	α -Untereinheit des Sec61p-Komplexes C-terminales Epitop	CKEQSEVGSMGALLF
Sec61βC	β -Untereinheit des Sec61p-Komplexes C-terminales Epitop	PGPTPSGTNC
SPC12N	12 kDa-Untereinheit des Signal Peptidase-Komplexes N-terminales Epitop	MLEHLSSLPTQMDYKC
SPC25C	25 kDa-Untereinheit des Signal Peptidase-Komplexes C-terminales Epitop	CHDSLATERKIK
SRα	Untereinheit des SRP-Rezeptors	KKFEDSEKAKKPVRC
SSRαC	α -Untereinheit des SSR-Rezeptors (SRP-Rezeptor) C-terminales Epitop	CPRKRAQKRSVGSDE
SSRβC	β -Untereinheit des SSR-Rezeptors (SRP-Rezeptor) C-terminales Epitop	CYSSKRKYDTPKSKKN
TRAMN	TRAM 1-Protein N-terminales Epitop	AIRKKSTKSPVLSHEFC
TRAMC	TRAM 1-Protein C-terminales Epitop	CADSPRNRKEKSS
TRAM2C	TRAM2-Protein C-terminales Epitop	CGTSPRTKCLKSP

Im Pull Down Assay mit immobilisiertem TRAM1 A konnte eine Immunreaktivität des Antikörpers ch α SSR β (Signal Sequence Recognition Particle Receptor, β -Untereinheit) in Höhe von etwa 30 kDa beobachtet werden. Die restlichen Antikörper gaben keine erkennbare Immunreaktivität im Western Blot (Abb. 26). Der Signalsequenz-Erkennungspartikel-Rezeptor SSR (Signal Sequence Recognition Particle Receptor) bildet zusammen mit dem Protein-Transportprotein Komplex Sec61p und TRAM1 das Grundgerüst des Translokons. Da die Antikörper gegen Sec61 β und SSR β ein deutliches Signal im Western Blot ergaben, wurde die Bindung der TRAM1 Peptide an diese Proteine unter verschiedenen Pufferbedingungen untersucht. Hierzu wurden wiederum die GST-Fusionspeptide, gekoppelt an GSH-Sepharose, mit Maus-Hirnhomogenat inkubiert.

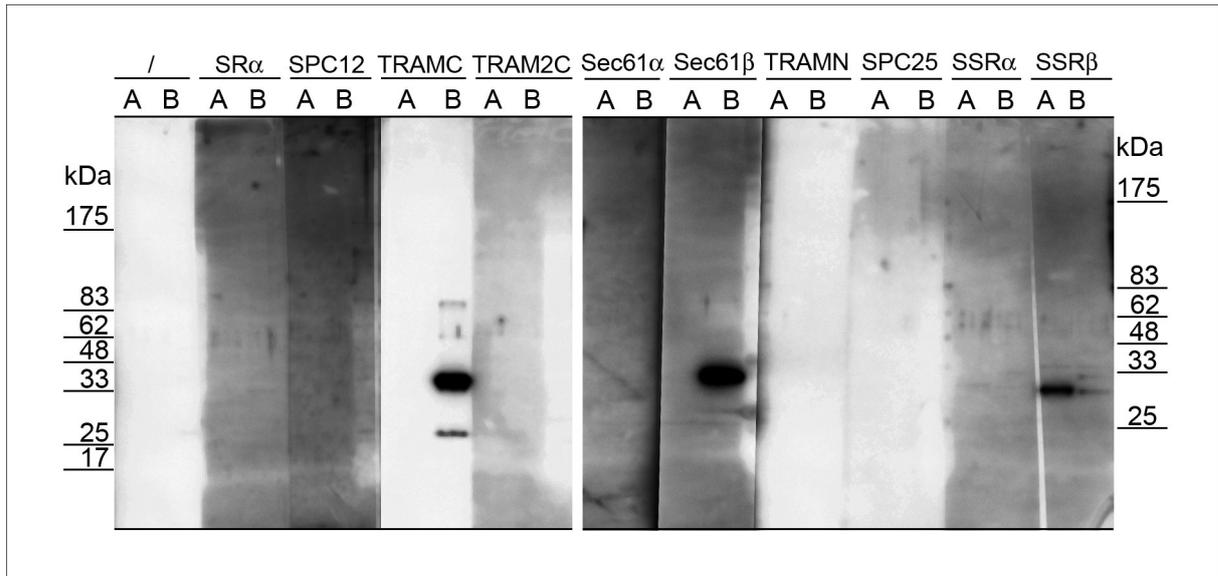


Abb. 26 Pull Down mit den Peptiden GST-TRAM1 A und GST-TRAM1 B und Detektion von Translokonzusammenhängen. GST-TRAM1 A (A) und GST-TRAM1 B (B) wurden an GSH-Sepharose gekoppelt und mit Maus-Hirnhomogenat inkubiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE, die Detektion der potentiellen Liganden im Western Blot mittels der Hühner-Antikörper gegen Proteine des Translokons (Tabelle 1).

Um die Bindung der Peptide an Sec61 β und SSR β unter verschiedenen Bedingungen zu testen, wurde das Maus-Hirnhomogenat in unterschiedlichen Puffern gelöst (Puffer A: 50 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl, 0,5 % NP-40, 0,5 % DOC, 2 mM EDTA; Puffer B: 50 mM HEPES pH 7,5, 300 mM NaCl, 0,6 % NP-40, 0,3 % Sarcosyl, 2 mM EDTA; Puffer C: 50 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 2 mM EDTA; Puffer D: 50 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 5 mM MgCl₂; alle Puffer enthielten 2 mM GSH). Nach der Inkubation wurden die GSH-Sepharose-Beads gewaschen und in SDS-Probenpuffer für fünf Minuten bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion der Liganden erfolgte im Western Blot mit den Antikörpern Sec61 β C und SSR β C (Abb. 27). Das Signal des Antikörpers ch α SSR β auf der Höhe von etwa 30 kDa zeigt, dass sowohl TRAM1 A als auch TRAM1 B eine Bindung von SSR β in allen gewählten Pufferkonditionen aufwiesen. Hierbei war jedoch das Antikörpersignal in den Proben mit TRAM1 A etwa doppelt so stark als in den Proben mit TRAM1 B (Abb. 27A). Der Antikörper gegen Sec61 β zeigte im Western Blot ein Signal bei den Pull Downs von GST-TRAM1 B in der Höhe von etwa 28 kDa und 62 kDa in allen Pufferkonditionen. Die Proben mit GST-TRAM1 A zeigten nur eine

Ergebnisse I

Immunreaktion in Höhe von 62 kDa. Dieses Signal war nicht unter Puffer-Kondition A vorhanden (Abb. 27B). Somit konnte SSR β als Ligand von TRAM1 identifiziert werden. Auch der Antikörper gegen Sec61 β zeigte eine spezifische Immunreaktion in den Proben mit TRAM1 B.

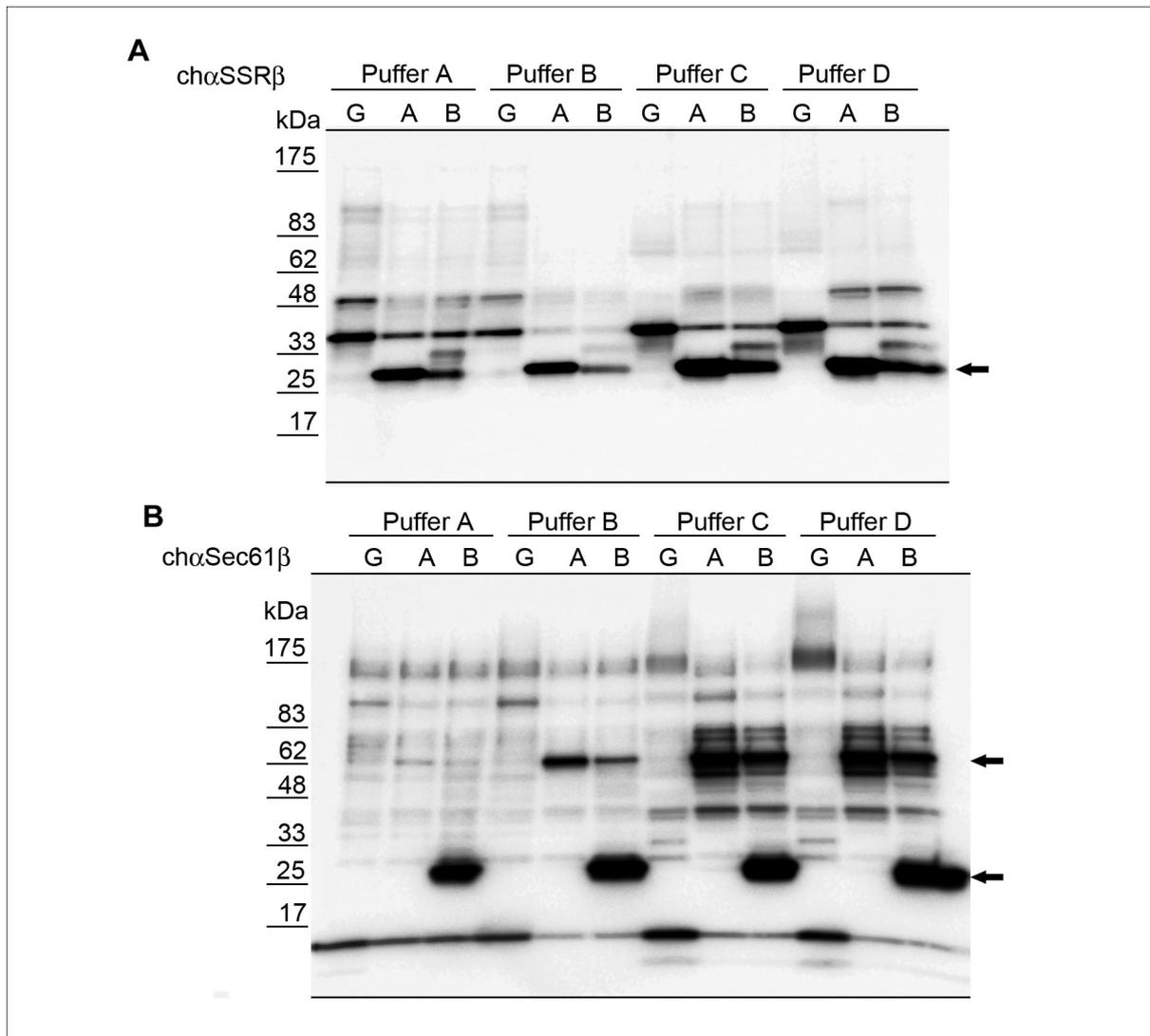


Abb. 27 Pull Down von SSR β und Sec61 β mit den Peptiden GST-TRAM1 A und GST-TRAM1 B unter verschiedenen Pufferkonditionen. Murines Hirnhomogenat wurde in verschiedenen Pufferbedingungen verdünnt und mit den Peptiden GST-TRAM1 A (A) und GST-TRAM1 B (B), gekoppelt an GSH Sepharose-Beads, inkubiert. Als Negativ-Kontrolle diente die Inkubation des Homogenats mit GST-Sepharose-Beads (G). **A:** Western Blot gegen SSR β mit dem Antikörper ch α SSR β C. **B:** Western Blot gegen Sec61 β mit dem Antikörper ch α Sec61 β C. Die Pfeile zeigen eine spezifische Immunantwort des jeweiligen Antikörpers. Alle übrigen Banden wurden durch eine unspezifische Kreuzreaktivität der Antikörper hervorgerufen.

3.9.2. Neue TRAM1-Interaktionspartner

Um weitere potentielle Interaktionspartner zu finden, wurden das synthetisch hergestellte Peptid TRAM1 A und das GST-Fusionspeptid GST-TRAM1 B an Sulfolink-Beads gekoppelt und mit Maushirn-Cytosol inkubiert. Die Gewinnung des Maushirn-Cytosols erfolgte mittels eines Sucrosegradienten. Da die gewählten TRAM1-Domänen anhand der Strukturvorhersage cytosolisch exponiert sein sollten, sollten durch die Inkubation mit Maushirn-Cytosol nur Liganden gefunden werden, die auch in der Zelle cytosolische Interaktionspartner von TRAM1 sein können. Zudem wurde durch die ausschließliche Verwendung des Cytosols eine Konkurrenz mit endogenem TRAM1 vermieden. Als Kontrollen dienten Sulfolink-Beads ohne gebundenes Peptid (für TRAM1 A) und an Sulfolink-Beads gebundenes GST (für GST-TRAM1 B). Vor dem Pull Down erfolgte ein Preclearing des verwendeten Maus-Hirncytosols. Dazu wurde das Maus-Hirncytosol entweder mit 160 µl Sulfolink Beads oder mit 400 µg GST (gekoppelt an Sulfolinkbeads) präinkubiert. Für den Pulldown wurde anschließend jeweils 2 ml Cytosol aus 0,125 g Maushirn (entspricht ¼ Gehirneinheit) mit 100 µg gekoppeltem Peptid inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Beads abzentrifugiert, gewaschen und mögliche Liganden mittels Inkubation in niedrigem pH-Wert (Glycin pH 2,5) eluiert.

Eine zweite Elution erfolgte durch die Inkubation in 1 % SDS. Die Proteine der Eluate wurden mittels Trichloressigsäure (TCA) aus 300 µl Probenvolumen gefällt und in SDS-Probenpuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Proteine auf einem Polyacrylamidgel (Tris-Cl 4 – 20 %) aufgetrennt und durch die Färbung des Gels mit dem Farbstoff Coomassie-Blau angefärbt. Banden, die in den Proben mit TRAM1-Peptiden zu sehen waren, jedoch nicht in den dazugehörigen Kontrollen, wurden ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie (von Professor Bruce Onisko, University of California, Berkley) analysiert (Abb. 28). Zur Kontrolle wurden jeweils in gleicher Höhe Banden in den Kontroll-Eluaten (Sulfolink-Beads alleine und GST-Sulfolink-Beads) ausgeschnitten und ebenfalls analysiert.

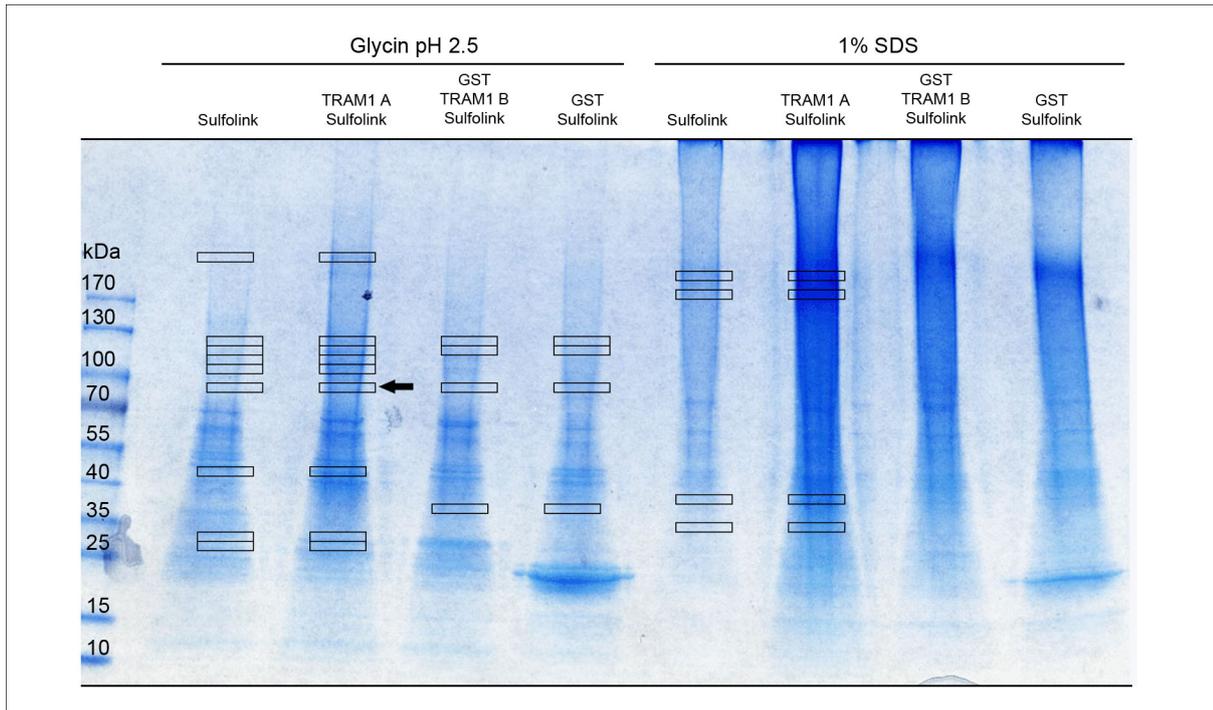


Abb. 28 Coomassie-Gel der eluierten TRAM1-Domänen-Liganden. Die cytosolischen TRAM1-Domänen TRAM1 A und GST-TRAM1 B wurden an Sulfolink-Beads gekoppelt und mit Maushirn-Cytosol inkubiert. Die Elution möglicher Liganden erfolgte durch Inkubation in niedrigem pH-Wert und anschließend in 1% SDS. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Färbung des Gels mit Coomassie-Blau. Die Kästen kennzeichnen Banden, bei denen visuell festgestellt wurde, dass beim Peptid-Pull Down aber nicht in der dazugehörigen Kontrolle eine deutliche Bande zu sehen war. Aus technischen Gründen kann die Auflösung hier nicht rekonstruiert werden. Als Kontrolle für unspezifische Bindungen dienten Sulfolink-Beads allein (für TRAM1 A) oder an Sulfolink-Beads gekoppeltes GST (für GST-TRAM1 B). Der Pfeil zeigt die Bande, die bei der massenspektrometrischen Analyse das Protein Puromycin-sensitive Aminopeptidase (PSA) ergab (Tabelle 2).

Die Massenspektrometrie hat neben ribosomalen Proteinen und den Chaperonen HSP70 und HSP71 eine Interaktion des Peptids TRAM1 A mit dem Enzym Puromycin-sensitive Aminopeptidase (PSA) ergeben (Tabelle 2). Diese Peptidase wurde bereits mit neurodegenerativen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. So wurde gezeigt, dass PSA ein schützender Faktor gegen Tau-induzierte Neurodegeneration in *Drosophila* ist und dass Funktionsverlustmutationen in PSA Neurodegenerationen verstärken (KARSTEN *et al.*, 2006).

Tabelle 2 Auswertung der Massenspektrometrie. Gezeigt sind Proteine, die aus dem Pull Down mit TRAM1 A und TRAM1 B identifiziert und die in den entsprechenden Kontrollbanden nicht detektiert wurden.

TRAM1 A			
ID	AC	Protein	Zelllokalisierung
ACTB	(P60710)	Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)	Cytoplasma
COX2	(P00405)	Cytochrome c oxidase subunit 2 (EC 1.9.3.1)	Mitochondrienmembran
DPYL2	(O08553)	Dihydropyrimidinase related protein-2 (DRP-2)	Cytoplasma
EAA2	(P43006)	Excitatory amino acid transporter 2	Membran
EF1A2	(P62631)	Elongation factor 1-alpha 2 (EF-1-alpha-2)	Nukleus
GUAD	(Q9R111)	Guanine deaminase (EC 3.5.4.3) (Guanase)	
HSP7C	(P63017)	Heat shock cognate 71 kDa protein (Heat shock 70 kDa protein)	Cytoplasma
HSP74	(Q61316)	Heat shock 70 kDa protein 4	Cytoplasma
MDHC	(P14152)	Malate dehydrogenase, cytoplasmic (EC 1.1.1.37)	Cytoplasma
NUEM	(Q9DC69)	NADH-ubiquinone oxidoreductase 39 kDa subunit	Mitochondrien-Matrix
NUMG	(Q9DCT2)	NADH-ubiquinone oxidoreductase 30 kDa subunit	Mitochondrienmembran
PSA	(Q11011)	Puromycin-sensitive aminopeptidase	Cytoplasma, Nukleus
RAB3A	(P63011)	Ras-related protein Rab-3A	Zellmembran, cytoplasmatisch synaptische Vesikel
RAB10	(P61027)	Ras-related protein Rab-10	Zellmembran, cytoplasmatisch
RAN	(P62827)	GTP-binding nuclear protein Ran (GTPase Ran)	Cytoplasma, Nukleus
RL6	(P47911)	60S ribosomal protein L6	Cytoplasma
SPTA2	(P16546)	Spectrin alpha chain, brain	Cytoplasma
TPM1	(P58771)	Tropomyosin 1 alpha chain (Alpha-tropomyosin)	Cytoplasma

TRAM1 B			
ID	AC	Protein	Vorkommen
HSP74	(Q61316)	Heat shock 70 kDa protein 4	Cytoplasma
SFRS2	(Q62093)	Splicing factor, arginine/serine-rich 2 (Splicing factor SC35)	Nukleus

Um diesen möglichen Interaktionspartner beispielhaft zu bestätigen, sollte die Bindung der TRAM1-Domäne A an PSA mittels Immunopräzipitation untersucht werden. Zur Detektion von PSA diente der anti-PSA-Antikörper GAG9, hergestellt gegen das KLH-gekoppelte (Keyhole limpet hemocyanin) PSA-Peptid MYLTKFQQKNAATEDLWESLENAC. Zunächst wurde die Reaktivität des Antikörpers getestet. Dazu wurden die Lysate der Zelllinien NFL und SKNAS in einem 8 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Nachweis der PSA-Expression erfolgte dann im Western Blot mittels des PSA-Kaninchen-Antikörpers.

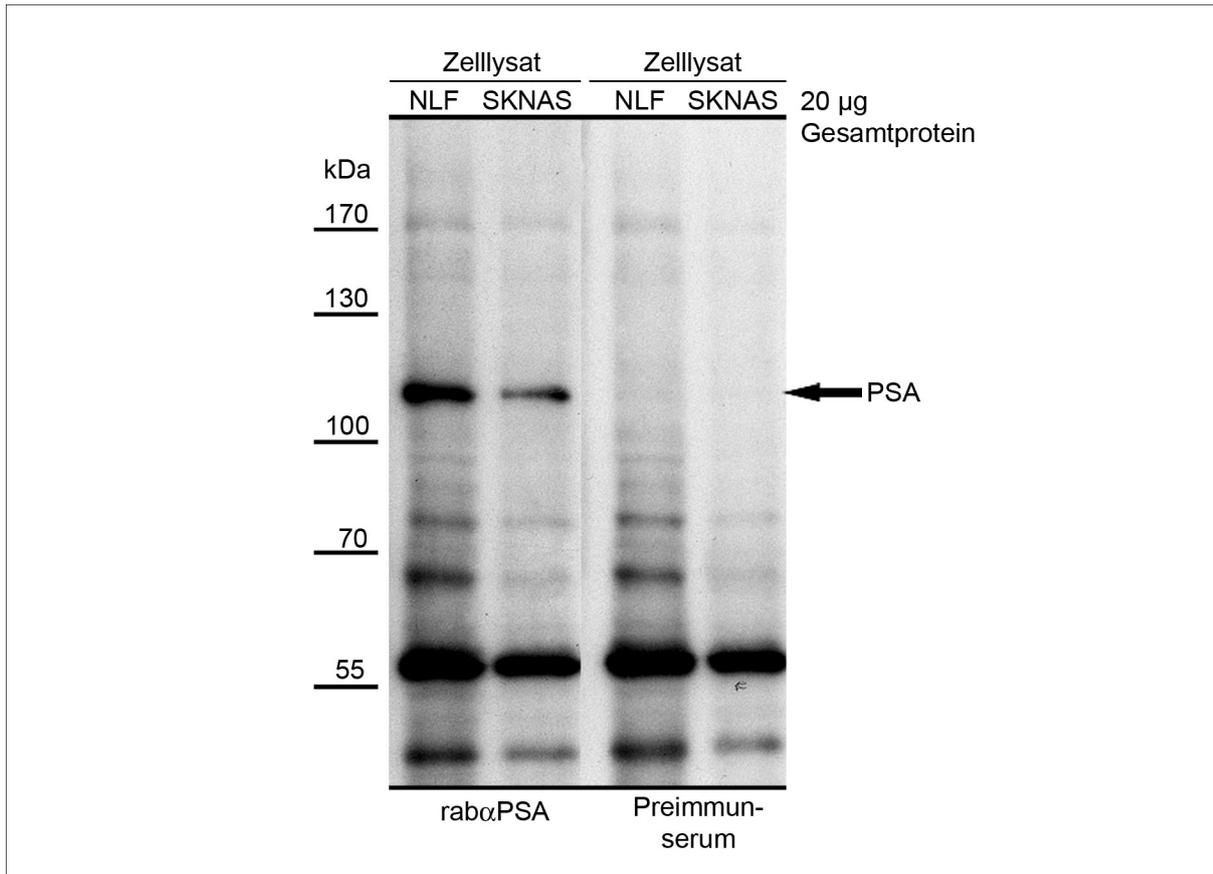


Abb. 29 Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen PSA. Zelllysate der Zelllinien NLF und SKNAS (jeweils 20 µg Gesamtprotein) wurden in einem 8 %igem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Detektion von PSA erfolgte mittels des Kaninchen-Antiserums (rabαPSA) im Vergleich zum Präimmunserum. Die übrigen Banden zwischen 40 und 80 kDa sind unspezifische Kreuzreaktionen, die bereits im Präimmunserum zu sehen sind.

Abbildung 29 zeigt eine deutliche PSA-Bande auf einer Höhe von etwa 103 kDa in den Zelllysaten. Daher wurden für die weiteren Pull Down Experimente Zelllysate verwendet. Da das Vorkommen von PSA in Zelllysaten nachgewiesen werden konnten, sollte nun die Bindung von TRAM1 an PSA gezeigt werden. Hierzu wurde synthetisch hergestelltes TRAM1 A-Peptid an Sulfolink-Beads (Pierce) gekoppelt und mit Lysaten der Zelllinien NLF und SKNAS inkubiert. Anschließend wurden die Beads abzentrifugiert, gewaschen und in SDS-Probenpuffer bei 95 °C für fünf Minuten inkubiert.

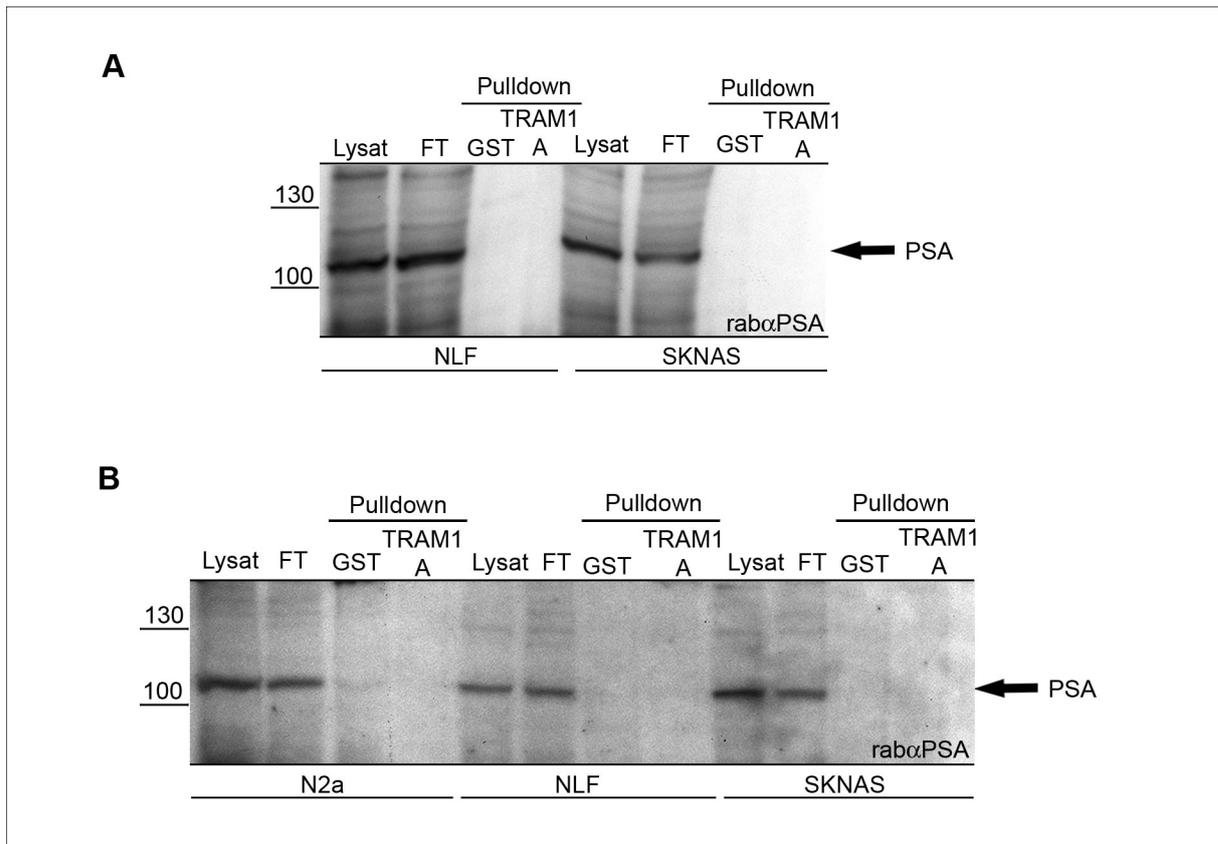


Abb. 30 Western Blot des TRAM1 A-Pull Downs in Zelllysaten. Lysate der Zelllinien N2a, NLF und SKNAS wurden mit TRAM1 A-Sulfolink-Beads inkubiert. Die Elution möglicher Liganden erfolgte über die Inkubation der Beads in SDS-Probenpuffer bei 95 °C. Als Kontrolle diente die Inkubation mit GST-Sulfolink-Beads. Anschließend wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit dem Antikörper rab α PSA detektiert. **A:** TRAM1 A-Pull Down der Zelllysate NLF und SKNAS. **B:** TRAM1 A-Pull Down der TRAM1-supprimierten Zelllysate N2a, NLF und SKNAS.

Abbildung 30A zeigt, dass die PSA-Bande von 103 kDa in den Zelllysaten erkannt wurde, in den Pull Down Proben jedoch nicht. In den Lysaten nach der Inkubation mit TRAM1 A-Peptid ist ein ähnlich starkes Signal wie in den Ausgangslysaten zu sehen. PSA konnte also nicht durch das TRAM1-Peptid depletiert werden (Abb. 30A). Da das endogene TRAM1, das sich im Zelllysate befindet, als Kompetitor zum TRAM1-Peptid wirken könnte, wurden nun Zelllysate verwendet, in denen TRAM1 supprimiert wurde. Dazu wurden die Zelllinien N2a, NLF und SKNAS mit TRAM1 siRNA transfiziert und nach 48 h lysiert. Anschließend wurden TRAM1 A Sulfolink-Beads mit den Lysaten inkubiert, abzentrifugiert und in SDS-Probenpuffer für 95 °C inkubiert. Die Proben wurden in einem 8%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels des Antikörpers rab α PSA im Western Blot detektiert. Während in den Lysaten vor und nach der Inkubation mit TRAM1 A ein deutliches

Ergebnisse I

PSA-Signal in Höhe von 103 kDa zu sehen war, konnte dieses nicht in den Proben der TRAM1 A-Sulfolink-Beads detektiert werden (Abb. 30B).

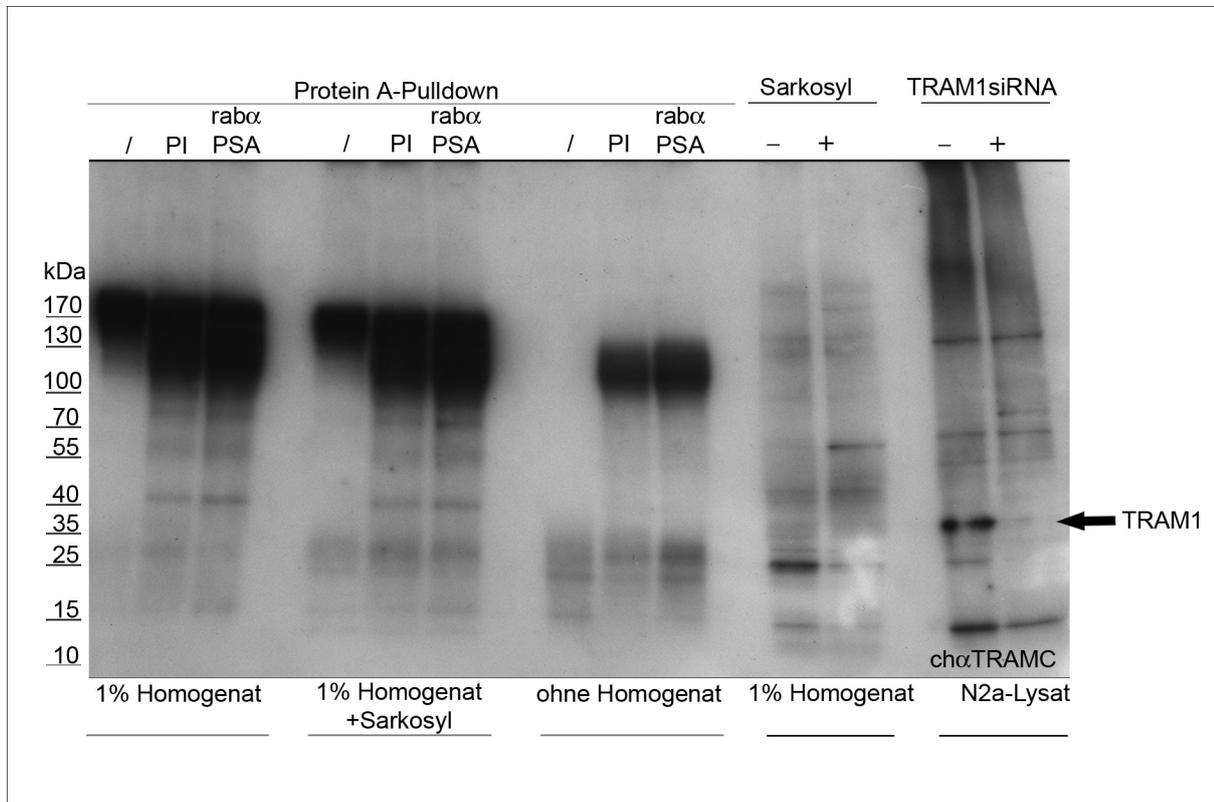


Abb. 31 Western Blot einer Co-Immunopräzipitation mit rab α PSA zum indirekten Nachweis der TRAM1-PSA-Bindung. An Protein A gekoppeltes PSA-Immuneserum wurde mit humanem Hirnhomogenat (+/- Sarkosyl) inkubiert. Anschließend wurden die Protein A-Agarose-Beads abzentrifugiert, gewaschen und für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE auf einem 8 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Detektion von TRAM1 erfolgte im Western Blot mit dem Antikörper ch α TRAMC. Als Kontrollen dienten an Protein A-gekoppeltes Preimmuneserum (PI) und Protein A allein (/). Als Größenorientierung dienten normales und TRAM1-supprimiertes N2a-Zelllysate.

Zum indirekten Nachweis der TRAM1-PSA-Bindung wurde eine Co-Immunopräzipitation aus humanem Hirnhomogenat mit an Protein A-gekoppeltem PSA-Antikörper, in An- oder Abwesenheit von Sarkosyl, durchgeführt. Als Kontrollen dienten die Inkubation mit an Protein A-gekoppeltem Preimmuneserum (PI) und Protein A allein (/). Die Inkubation des Western Blots mit einem Antikörper gegen TRAM1 sollte PSA-gebundenes TRAM1 zeigen, welches durch den PSA-Antikörper präzipitiert wurde. Im Western Blot wurde kein Signal in passender Höhe detektiert. Allerdings zeigte auch das Hirnhomogenat vor der Immunopräzipitation kein TRAM1-

Signal (Abb. 31). Zur Orientierung der Laufhöhe von TRAM1 dienten normales und TRAM1-supprimiertes N2a-Zelllysat.

Das Enzym Puromycin-sensitive Aminopetidase (PSA) wurde als Ligand von TRAM1 A mittels massenspektrometrischer Analyse co-präzipitierender Liganden gefunden. Der Detektion der Interaktion im Western Blot mittels eines gegen PSA generierten Kaninchen Antikörpers steht jedoch noch aus.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollten die Ergebnisse der *in vitro*-Studien und die zahlreichen Modelle für das Translokations-assoziierte Membranprotein 1 (TRAM1) auf das Zellkulturmodell übertragen werden. Dieses Ziel konnte erfüllt werden, wobei die Beobachtungen nur zum Teil mit denen aus den *in vitro*-Experimenten übereinstimmen. Im Folgenden soll nun näher auf diese Ergebnisse eingegangen werden.

TRAM1 bildet zusammen mit dem Protein-Transportprotein Komplex Sec61p und dem Signalsequenz-Erkennungspartikel-Rezeptor SSR (Signal Sequence Recognition Particle Receptor) das Grundgerüst des Translokons (GORLICH und RAPOPORT, 1993; OLIVER *et al.*, 1995; VOIGT *et al.*, 1996). Zuerst entdeckt von GORLICH *et al.* (1992), wurde TRAM1 bisher vor allem *in vitro* in zellfreiem System untersucht und charakterisiert. So konnte gezeigt werden, dass dieses Protein für die Translokation einiger sekretorischer Proteine *in vitro* notwendig ist (GORLICH *et al.*, 1992; VOIGT *et al.*, 1996). Weitergehende Untersuchungen zeigten, dass die TRAM1-Abhängigkeit in der Beschaffenheit der Signalsequenz der Proteine begründet liegt. So haben TRAM1-abhängige Proteine eine eher kurze Signalsequenz mit einer kurzen hydrophilen N-Region (≤ 5 Aminosäuren). Die Signalsequenzen TRAM1-unabhängiger Proteine scheinen hingegen eher länger zu sein, mit einer hydrophilen N-Region von mehr als fünf Aminosäuren. In der hydrophoben Kernregion der Signalsequenz sind bei diesen Proteinen die Aminosäuren Leucin und Valin dominant, während bei den TRAM1-abhängigen Proteinen die Aminosäuren Alanin und Phenylalanin häufiger vorkommen (VOIGT *et al.*, 1996).

Als TRAM1-abhängige Proteine wurden hierbei auch die schwere und die leichte Kette von Maus-IgG identifiziert (VOIGT *et al.*, 1996). Die zellfreien Rekonstitutionssysteme, die zur Untersuchung der TRAM1 Abhängigkeit *in vitro* verwendet wurden, bestanden aus reinen Phospholipidpartikeln, denen wahlweise der Sec61p-Komplex, der Signal-Sequenz-Erkennungspartikel-Rezeptor SSR und TRAM1 zugegeben wurden. In diesem System zeigten Proteine, denen die

Signalsequenz der schweren Kette oder der leichten Kette von Maus-IgG angehängt wurde, eine fehlerhafte Translokation in Abwesenheit von TRAM1 (VOIGT *et al.*, 1996). Daher sollte die Sekretion von IgG-Antikörpern in Zellkultur ebenfalls TRAM1 abhängig sein. Zur Bestätigung dieses Sachverhaltes in Zellkultur, wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von TRAM1 in den Antikörper-produzierenden Hybridomazelllinien 19B10 und 7VC mittels siRNA supprimiert. Eine Auswirkung der TRAM1-Suppression auf die Antikörpersekretion konnte jedoch nicht beobachtet werden (Kapitel 3.5). Dieses legt die Vermutung nahe, dass die Funktion von TRAM1 zur Translokation der Antikörper in das endoplasmatische Reticulum von anderen Proteinen, die in den zellfreien Rekonstitutionssystemen nicht vorhanden waren, übernommen worden sein könnte. Ein Kandidat für ein solches Protein ist das Translokations-assoziierte Membranprotein2 (TRAM2). TRAM2 ist ein Homolog zu TRAM1 mit 53 % identischer Aminosäuresequenz. Der C-Terminus weist eine Homologie von 15 % auf. Ein weiterer Kandidat ist das Protein TRAM1L1 (Translokations-assoziiertes Membranprotein1 ähnliches Protein1). Dieses Protein weist eine Homologie von 90 % zu TRAM1 auf, wobei die Aminosäuresequenz des C-Terminus zu 50 % identisch ist (Abb. 32) (STEFANOVIC *et al.*, 2004).

Für TRAM2 wurde gezeigt, dass in aktivierten Leber-Sternzellen (Hepatic Stellate Cells, HSC) die Expression von TRAM2 mit der Typ I Collagen-Synthese steigt. Die Deletion des C-Terminus von TRAM2 inhibiert hingegen die Collagen-Synthese während der Aktivierung der HSCs. Eine Sekretion von Collagen Typ I ist nicht mehr möglich (STEFANOVIC *et al.*, 2004). Für weitergehende Experimente zur Untersuchung des Einflusses von TRAM2 und TRAM1L1 auf die Sekretion von Antikörpern, könnte in Zellen eine gleichzeitige Suppression von TRAM1, TRAM2 und/ oder TRAM1L1 vorgenommen werden. Zudem könnte die Expression TRAM1-abhängiger Proteine in zellfreien TRAM1-depletierten Rekonstitutionssystemen in Anwesenheit von TRAM2 oder TRAM1L1 untersucht werden.

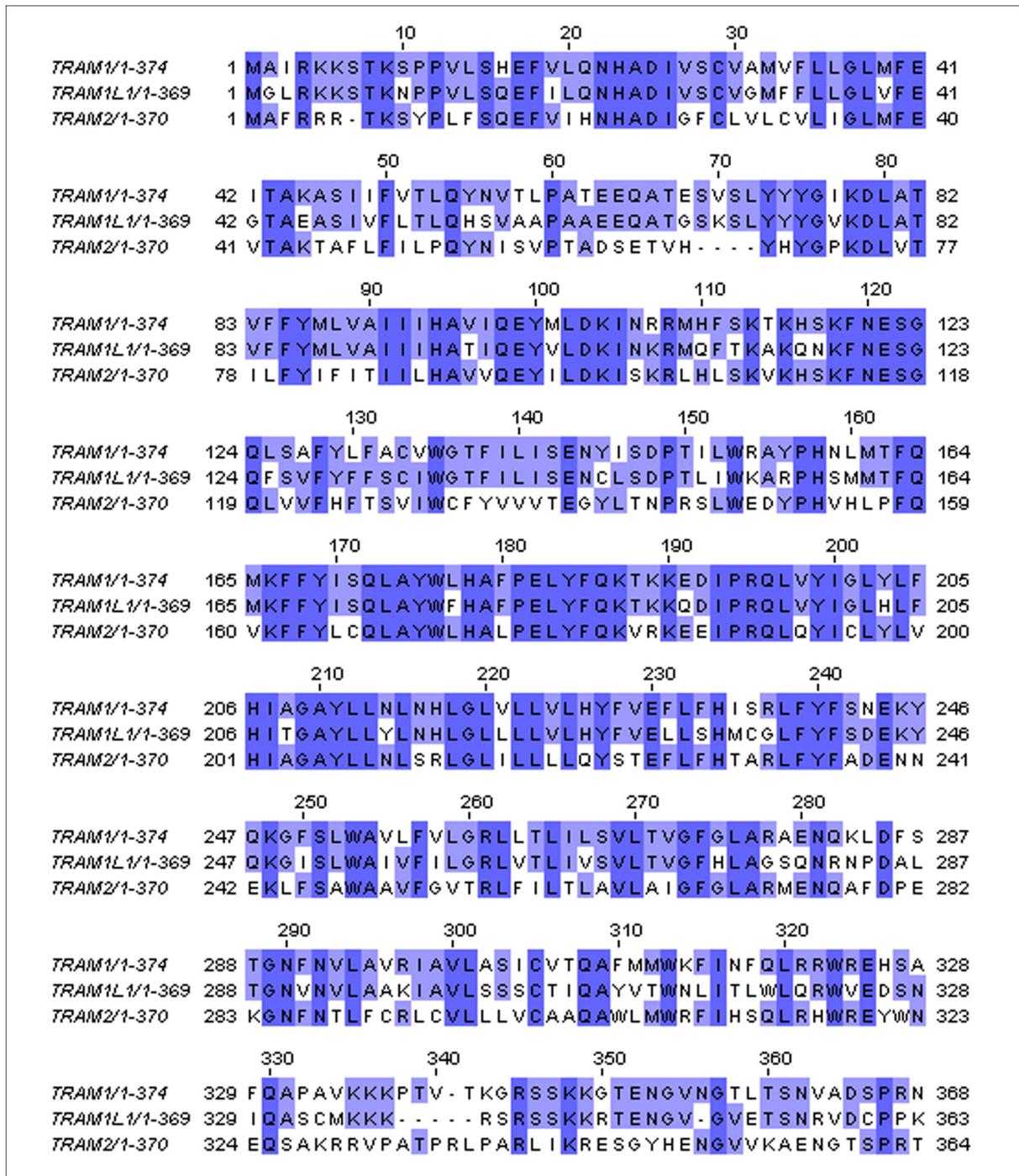


Abb. 32 Sequenzvergleich der humanen Proteine TRAM1, TRAM1L1 und TRAM2. Die Farben kennzeichnen die prozentuale Sequenzübereinstimmung (dunkelblau: Übereinstimmung in allen drei Proteinen, hellblau: Übereinstimmung in zwei Proteinen). Darstellung mit dem Sequenzvergleichs-Programm ClustalW.

Sec61p, SSR und TRAM1 bilden *in vitro* zusammen das Grundgerüst des Translokons (GORLICH und RAPOPORT, 1993; OLIVER *et al.*, 1995; VOIGT *et al.*, 1996). Zudem zeigten FRET-Analysen (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer), dass die

Proteinkomplexe Sec61p, SSR und TRAM1 in direkter räumlicher Nähe zueinander stehen (SNAPP *et al.*, 2004). Eine direkte Interaktion der Proteine wurde bislang jedoch nicht nachgewiesen. Dieses konnte nun in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Durch Pull Down Experimente mit cytosolisch exponierten TRAM1-Domänen und die anschließenden Untersuchungen mit Antikörpern gegen verschiedene Faktoren des Translokationsapparates wurden die β -Untereinheit von Sec61p (Sec61 β) und die β -Untereinheit von SSR (SSR β) als Interaktionspartner identifiziert (Abb. 27, Kapitel 3.9.1). Durch Pull-Down-Experimente und massenspektrometrische Analyse wurden zudem das Enzym Puromycin-sensitive Aminopeptidase (PSA), die Ras-verwandten Proteine Rab-3a und Rab-10 und das Dihydropyrimidinase-verwandte Protein2 (DRP-2) als Interaktionspartner der cytosolischen Domäne A von TRAM1 entdeckt (Tabelle 2, Kapitel 3.9.2).

PSA wurde mit neurodegenerativen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. So wurde gezeigt, dass PSA ein schützender Faktor gegen Tau-induzierte Neurodegeneration in *Drosophila* ist und dass Funktionsverlustmutationen in PSA Neurodegenerationen verstärken (KARSTEN *et al.*, 2006). Die Interaktion zwischen TRAM1 und PSA konnte in der vorliegenden Arbeit zwar nicht bestätigt werden, ist aber auf Grund technischer Unzulänglichkeiten hinsichtlich einer zu geringen Sensitivität der gewählten Methode gegebenenfalls nicht nachweisbar. Die Funktion der GTPasen Rab-3A und Rab-10 ist nicht genau bekannt, diese Proteine scheinen aber eine indirekte Rolle in der synaptischen Reizübertragung zu spielen. Studien an Knockout Mäusen weisen darauf hin, dass Rab-3A eine regulierende Funktion in der Effizienz Ca^{2+} -stimulierter Fusion synaptischer Vesikel spielt und Auswirkungen auf die synaptische Plastizität hat (GEPPERT *et al.*, 1994; CASTILLO *et al.*, 1997; GEPPERT *et al.*, 1997; JAHN und SUDHOF, 1999). Rab-10 ist assoziiert mit der Clathrin-unabhängigen Endocytose und beteiligt am Proteintransport in polarisierten Zellen (BABBEY *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2006). Zudem spielt dieses Protein eine Rolle beim Recycling von Glutamatrezeptoren, die in die Neurotransmission an chemischen Synapsen involviert sind (GLODOWSKI *et al.*, 2007). DRP-2 hingegen scheint eine Rolle in der Schizophrenie zu spielen. Das Protein ist im frontalen Cortex bei Patienten mit Schizophrenie signifikant niedriger exprimiert als in Normalgehirnen

(JOHNSTON-WILSON *et al.*, 2000). Auch für TRAM1 wurde eine signifikant geringere Expression in Gehirnen von Patienten mit Schizophrenie beobachtet (Abb. 17, Kapitel 3.7) (KORTH *et al.*, unveröffentlicht). Dieses und die direkte Interaktion zwischen TRAM1 und den Proteinen Rab-3A und Rab-10, als Modulatoren des Neurotransmitter-Stoffwechsels, könnte auf einen Zusammenhang zwischen TRAM1 und Schizophrenie hindeuten.

Die Neurobiologie chronischer psychiatrischer Erkrankungen wie Schizophrenie ist im Gegensatz zu den neurodegenerativen Erkrankungen weitgehend unbekannt und steht erst am Anfang der Erforschung. Die Identifizierung beteiligter Proteine ähnlich wie in anderen chronischen Hirnerkrankungen, zum Beispiel dem Amyloid Precursor Protein bei der Alzheimer Krankheit oder dem Prion Protein bei Prionenerkrankungen, steht noch aus. Für verschiedene Proteine wurden jedoch veränderte Expressionsmuster bei Patienten mit Schizophrenie gefunden. So ist zum Beispiel auch die Expression von Dysbindin in Gehirnen von Patienten mit Schizophrenie niedriger als in Normalgehirnen (WEICKERT *et al.*, 2004).

Die Überexpression und Suppression von TRAM1 in Zellkultur zeigte jedoch keine Auswirkung auf die Expression der Schizophrenie-assoziierten Faktoren Neuregulin1, Dysbindin und der am Dopaminstoffwechsel beteiligten Proteine Catechol O-methyltransferase und Tyrosin Hydroxylase (Abb. 18, Abb. 19, Kapitel 3.7). Eine Auswirkung von TRAM1 auf die Funktionalität dieser Proteine wurde in dieser Arbeit allerdings nicht untersucht und ist somit nicht ausgeschlossen. So könnte die Suppression von TRAM1 den Transport dieser Proteine aus dem endoplasmatischen Reticulum oder ihre zelluläre Verteilung beeinflussen. Dieses ließe sich durch eine zelluläre Anfärbung der Proteine mittels spezifischer Antikörper im Fluoreszenzmikroskop untersuchen. In diesem Zusammenhang könnte auch die mögliche Bindung von TRAM1 an DRP-2, Rab-3A und Rab-10 und die Auswirkung der TRAM1 Suppression auf diese Proteine untersucht werden.

Der Nachweis von PSA als Interaktionspartner von TRAM1 deutet auf eine Rolle von TRAM1 in neurodegenerativen Erkrankungen hin. Zudem wurde gezeigt, dass die Depletion von TRAM1 *in vitro* eine vermehrte Bildung der Transmembranform ^{CTM}PrP

des Prion Proteins zur Folge hat (HEGDE *et al.*, 1998b). Diese Transmembranform des Prion Proteins tritt vermehrt im Zusammenhang mit Neurodegeneration auf. Genveränderte Mäuse, die ^{CTM}PrP überexprimieren, weisen eine höhere Suszeptibilität für die Infektion mit Prionen auf (HEGDE *et al.*, 1999). Auf Grund der Ergebnisse der *in vitro* Studien wäre anzunehmen gewesen, dass eine Suppression von TRAM1 in ScN2a Zellen ebenfalls zu der vermehrten Bildung von ^{CTM}PrP führen würde. Diese Form von PrP kann auf Grund seiner Natur als Transmembranprotein nicht in die infektiöse Form PrP^{Sc} umgewandelt werden. Eine Suppression von TRAM1 könnte daher auch eine Reduktion von PrP^{Sc} in den Zellen zur Folge haben.

Die Zellkulturexperimente zeigten jedoch eine Zunahme von sowohl PrP^{Sc} als auch PrP^C in den ScN2a Zellen und eine Zunahme von PrP^C in den N2a Zellen (Kapitel 3.3). Eine Transfektions-bedingte Selektion auf Zellen mit höherer PrP-Expression ist ausgeschlossen, da die Kontroll-Transfektion mit mock siRNA den gleichen Effekt auf die Zell-Vitalität hatte wie die Transfektion mit TRAM1 siRNA (Abb. 16, Kapitel 3.6). Bei den mock siRNA transfizierten Zellen war jedoch keine erhöhte PrP Expression zu beobachten (Abb. 11, Kapitel 3.3). Die Suppression von TRAM1 scheint somit eine spezifische Zunahme von PrP durch eine erhöhte Expression oder durch eine verminderte Degradation zur Folge zu haben. Daher ist eine Rolle von TRAM1 als inhibierender Regulator der PrP-Expression oder als stimulierender Regulator der PrP-Degradation anzunehmen, wobei dieser Einfluss wahrscheinlich eher indirekter Natur über die Translokation regulierender Proteine ist. Da es sich bei den ScN2a-Zellen um eine immortalisierte Zelllinie handelt, die hinsichtlich einer hohen Prion-Replikation und ihrer Suszeptibilität für die Infektion mit PrP^{Sc} selektiert wurde, könnte bei der Passagierung der Zellen gleichzeitig eine Selektion gegen die Bildung des cytotoxischen ^{CTM}PrP erfolgt sein. Auch eine Selektion der Zellen hinsichtlich einer erhöhten Toleranz gegenüber ^{CTM}PrP wäre denkbar.

Im Gegensatz zu PrP, das durch die Suppression von TRAM1 eine anscheinend stärkere Expression aufwies, hatte die Suppression von TRAM1 in APP₆₉₅-überexprimierenden HEK Zellen eine Reduktion von sowohl APP als auch sAPP zur Folge (Abb. 14, Kapitel 3.4). Dieses könnte zum einen auf eine verstärkte Prozessierung von APP hindeuten, die in einer erhöhten Bildung der Peptide A β oder

P3 resultieren würde. Um dieses zu untersuchen, müsste in weiteren Experimenten die vermehrte Bildung von A β nachgewiesen werden. Zum anderen könnte eine verminderte Expression von APP durch die Suppression von TRAM1 für den Rückgang von APP und sAPP verantwortlich sein. Diese könnte dadurch hervorgerufen werden, dass die Biosynthese von APP beeinflusst wird und somit TRAM1 direkt oder indirekt als Aktivator der APP-Expression wirkt. Hierbei wäre eine geringere Bildung von A β zu beobachten. Eine weitere Erklärung könnte eine fehlerhafte Translokation von APP sein, hervorgerufen durch eine unzureichende Bindung der naszierenden Kette von APP an das Translokon (Abb. 6, Kapitel 1.3), wodurch es zu einer Degradation während der Expression kommen könnte. Auch in diesem Fall wäre A β reduziert.

Zur weiteren Untersuchung der Beteiligung von TRAM1 an neurodegenerativen Erkrankungen wären weitere Experimente an Zellmodellen für Huntington oder Parkinson Disease interessant. An diesen Modellen könnte die Auswirkung der Suppression von TRAM1 auf die beteiligten Proteine Huntingtin beziehungsweise α -Synuclein getestet werden. Auch die Herstellung einer transgenen Maus könnte Aufschluss über die Beteiligung von TRAM1 an neurodegenerativen Erkrankungen geben. Die Erzeugung einer TRAM1-Knockout Maus wäre jedoch vermutlich schwierig, da die Ergebnisse zellfreier Rekonstitutionssysteme gezeigt haben, dass TRAM1 essentiell für die Sekretion einiger Proteine ist (GORLICH *et al.*, 1992; VOIGT *et al.*, 1996). Somit wäre hier wahrscheinlich die Wahl einer induzierbaren TRAM1-Knockout Maus sinnvoll. Diese Mäuse könnten dann auf die Anfälligkeit für neurodegenerative Erkrankungen untersucht werden, zum Beispiel durch die Infektion mit PrP^{Sc}. Für die anderen neurodegenerativen Erkrankungen wäre eine Doppelmutation mit gleichzeitiger Überexpression des jeweils charakteristischen Proteins denkbar. Andererseits wurde in vorliegender Arbeit am Beispiel der Antikörpersekretion gezeigt, dass die Funktion von TRAM1 redundant sein könnte. Somit könnte eine TRAM1 Knock-out Maus auch ohne Phänotyp sein, solange die sequenzverwandten Proteine TRAM2 und TRAM1L1 den Ausfall kompensieren könnten.

Die rekombinante Expression eukaryotischer Transmembranproteine in prokaryotischen Zellen gestaltet sich meist auf Grund toxischer Effekte durch die hydrophoben Membrandomänen als schwierig (LAAGE und LANGOSCH, 2001). Dieses kann durch die ausschließliche Expression der löslichen Segmente des Proteins umgangen werden. Dazu wurden in der vorliegenden Arbeit die beiden cytosolisch exponierten TRAM1-Domänen A und B als GST-Fusionsproteine in *E. coli* rekombinant exprimiert und zur Erforschung möglicher Liganden verwendet (Kapitel 3.9).

Dennoch ist die Expression der Membranproteine in voller Länge einschließlich der Transmembrandomänen zum Beispiel für die Herstellung von Antikörpern durchaus interessant. Wie zu erwarten erfolgte die Expression von TRAM1 in bakteriellen Einschlusskörpern (IB; Inclusion Bodies) (Abb. 22, Kapitel 3.8.1). Dieses könnte durch die Kombination von TRAM1 mit Fusionsproteinen wie GST, welches zu einer erhöhten Löslichkeit der Proteine führt, umgangen werden. Da jedoch GST bei der Immunisierung zur Erzeugung von Antikörpern ebenfalls eine starke Immunantwort auslöst, sollte auf die Verwendung von Fusionsproteinen hier verzichtet werden. Für die Immunisierung ist allein die Primärstruktur des Proteins – also die Aminosäurekette – ausreichend. Auch aggregierte Proteine können zur Antikörperherstellung verwendet werden.

Durch die Einfügung des N-terminalen HIS₆-Epitops sollte das Protein über Affinitätsreinigung mittels Ni-NTA Agarose aufgereinigt werden (Abb. 24, Kapitel 3.8.3). Die Schwierigkeiten dieser Aufreinigung könnten darin begründet sein, dass das N-terminale Epitop durch bakterielle Proteasen partiell abgebaut wurde und somit eventuell nicht mehr vollständig vorhanden oder auf Grund der Faltung nicht zugänglich war. Trotz der starken Hydrophobizität von TRAM1 und der damit zusammenhängenden Neigung zur Aggregation konnte das Protein nicht durch die Herabsetzung auf 1 M Urea aus der Lösung mittels Ultrazentrifugation präzipitiert werden (Abb. 25, Kapitel 3.8.4). Ein ähnliches Phänomen wurde auch für die Serinprotease CLIPB14 beschrieben (SCHRODEL *et al.*, 2005). Dieses Protein wird in *E. coli* auf Grund seiner sieben Disulfidbrücken in Inclusion Bodies gebildet. Während seiner Expression neigt CLIPB14, versehen mit einem HIS₆-Epitop (HIS₆-CLIPB14),

zur Aggregation und kann mittels hoher Urea Konzentrationen denaturiert aus den IB gelöst werden. Ist HIS₆-CLIPB14 aus den IB mittels Urea in Lösung gebracht, bleibt das Protein auch bei anschließender Herabsetzung der Urea-Konzentration auf 1 M in Lösung und präzipitiert nicht. Die Aggregation erfolgt erst bei einer deutlich niedrigeren Urea-Konzentration. Zudem kann das Protein bei Coexpression mit verschiedenen Chaperonen in kleinen Aggregaten vorliegen, die mittels Zentrifugation nicht präzipitiert werden. Dieses könnte auch für die Präzipitation von TRAM1 gelten.

Zusammenfassend konnte also in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass viele Ergebnisse der *in vitro* Studien zu TRAM1 nicht im Zellkulturmodell bestätigt werden konnten. Auf der anderen Seite wurde ein deutlicher Einfluss der TRAM1-Suppression auf die Expression von PrP und APP in Zellkultur gezeigt. Dieses unterstützt die Hypothese einer Beteiligung von TRAM1 an der Ausbildung und Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen. Weiterhin konnten im Translokon als unmittelbare Interaktionspartner von TRAM1 die β -Untereinheiten von Sec61 (Sec61 β) und SSR (SSR β) identifiziert werden. Als weitere mögliche Liganden von TRAM1 wurden das Enzym Puromycin-sensitive Aminopeptidase (PSA), das Dihydropyrimidinase-verwandte Protein2 (DRP-2) und die Ras-verwandten GTPasen Rab-3A und Rab-10 identifiziert. Diese Proteine machen ebenfalls eine Beteiligung von TRAM1 an Proteinfehlfaltungserkrankungen wahrscheinlich.

5. Zusammenfassung

Neurodegenerative Erkrankungen sind gekennzeichnet durch Proteinaggregate, die meist durch Proteinfehlfaltung hervorgerufen werden. Zusätzlich zu Proteinfehlfaltungen sind für einige Proteine Faltungsvariationen beschrieben worden, die unabhängig von Mutationen oder krankheitsbedingten Fehlfaltungen sind. So liegt zum Beispiel das Prion Protein *in vitro* und *in vivo* in drei verschiedenen Topologien vor. Translokations-assoziierte Faktoren (TraF) - Glykoproteine unbekannter Identität - sind an der Biogenese der verschiedenen PrP-Isoformen (^{sec}PrP, ^{CTM}PrP, ^{NTM}PrP) *in vitro* beteiligt. Ein potentielles Mitglied der TraFs ist das Translokations-assoziierte Membranprotein1 (TRAM1). TRAM1 ist ein etwa 36 kDa großes Glykoprotein mit mehreren Transmembrandomänen, das zusammen mit dem Protein-Transportprotein Komplex Sec61p und dem Signalsequenz-Erkennungspartikel-Rezeptor SSR (Signal Sequence Recognition Particle Receptor) das Grundgerüst des Translokons im endoplasmatischen Reticulum bildet. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass TRAM1 in direkter Interaktion mit den β -Untereinheiten von Sec61p und SSR steht. Zudem wurden die Ras-verwandten Proteine Rab-3A und Rab-10 und das Dihydropyrimidinase-verwandte Protein-2 (DRP-2) als Interaktionspartner von TRAM1 nachgewiesen. Auch die Tatsache, dass TRAM1 in Gehirnen von Patienten mit Schizophrenie signifikant geringer exprimiert war als in Normalgehirnen, könnte auf eine Beteiligung von TRAM1 bei Schizophrenie hindeuten. Auf die Expression der Schizophrenie-assoziierten Proteine Neuregulin1, Dysbindin, Catechol O-methyltransferase und Tyrosin Hydroxylase hatte die Überexpression und Suppression von TRAM1 jedoch keine Auswirkung. Das Enzym Puromycin-sensitive Aminopeptidase (PSA) als Interaktionspartner weist auf eine Rolle von TRAM1 bei neurodegenerativen Erkrankungen hin. Dieses wird dadurch unterstützt, dass die Suppression von TRAM1 in Zellkultur zu einer erhöhten Expression des Prion Proteins und somit auch zu einer erhöhten Bildung des infektiösen PrP^{Sc} führte. Auf die Expression des Amyloid Precursor Proteins APP hatte die Suppression von TRAM1 eine gegenteilige Auswirkung. In APP695sw-stabil transfizierten Zellen konnte durch die

Zusammenfassung I

Suppression von TRAM1 weniger APP detektiert werden. Die gleichbleibende Sekretion von Antikörpern in TRAM1-supprimierten Hybridoma-Zelllinien 7VC und 19B10 und den dazugehörigen Kontrollen legt die Vermutung nahe, dass die Funktion von TRAM1 hinsichtlich der Antikörpersekretion von anderen Proteinen übernommen wird. Kandidaten hierfür sind die Proteine TRAM2 (Translokations-assoziiertes Membranprotein2) und TRAM1L1 (Translokations-assoziiertes Transmembranprotein1 ähnliches Protein1).

6. Abstract (English)

Neurodegenerative diseases are characterised by deposition of protein aggregates caused by protein misfolding or misprocessing. In addition to protein misfolding diseases, conformational heterogeneity modulated by translocational events during protein biogenesis has been described for some proteins. For the prion protein, three different topologies are found *in vitro* and *in vivo*. Translocation-associated Factors (TraF) are involved in the biogenesis of the various conformational PrP-isoforms (^{sec}PrP, ^{CTM}PrP, ^{NTM}PrP) *in vitro*. A potential member of the TraF family is the translocating chain-associating transmembrane protein1 (TRAM1). TRAM1 is a multispinning transmembrane glycoprotein of 36 kDa. Together with the Sec61p complex and the Signal Sequence Recognition Particle Receptor SSR, TRAM1 forms the translocon in the endoplasmic reticulum. In this thesis is shown that TRAM1 interacts directly with the β -subunits of Sec61p and SSR. Furthermore, the Ras-related proteins Rab-3A and Rab-10 and the dihydropyrimidinase-related protein-2 (DRP-2) have been identified as binding partners of TRAM1. This and the fact that TRAM1 expression is significantly decreased in schizophrenia, could suggest a role for TRAM1 in this disease, although the overexpression and suppression of TRAM1 has no influence on the expression of the schizophrenia-associated proteins neuregulin1, dysbindin, catechol O-methyltransferase and tyrosin hydroxylase. A role for TRAM1 in neurodegenerative diseases has been suggested based on its potential interaction with the enzyme puromycin-sensitive aminopeptidase (PSA). In an independent set of experiments, it was shown that suppression of TRAM1 has an effect on expression of prion disease- and Alzheimer's disease-related proteins PrP and APP. In cell culture TRAM1 suppression increases expression of prion protein (PrP^C and PrP^{Sc}) and decreases expression of amyloid precursor protein (APP). TRAM1 suppression showed no effect on the secretion of antibodies in hybridoma cell lines. This suggests that the function of TRAM1 can be compensated by other proteins such as TRAM2 (translocation chain-associated membraneprotein2) or TRAM1L1 (translocation chain-associated membraneprotein1-like protein 1).

II

Der Polymorphismus am Codon 129 des Prion Protein Gens (*PRNP*) beeinflusst den klinisch- neurologischen Verlauf von Wilson Disease

7. Einleitung

Wilson Disease (WD) oder hepatolentikuläre Degeneration, ist eine Erkrankung des Kupferstoffwechsels und kann zu schwerwiegenden Störungen der Leber oder des zentralen Nervensystems führen. Die Krankheit ist begründet in einer Mutation des Gens *ATP7B*. Dieses kodiert für eine ATPase, die als zelluläres Kupfertransportprotein fungiert und an der Beladung von Ceruloplasmin mit Kupferionen beteiligt ist (TANZI *et al.*, 1993; GITLIN, 2003). Bedingt durch Mutationen von *ATP7B* wird Kupfer nicht in das Transgolginetzwerk transportiert, von wo es gebunden an Ceruloplasmin aus der Zelle transportiert werden würde. Dadurch kommt es zu einer Akkumulation von Kupfer in der Zelle, die zu Schädigungen der Mitochondrien und letztendlich zum Zelltod führt (Abb. 33). Die herabgesetzte Beseitigung zellulären Kupfers führt zu einer Anlagerung im Gewebe, vorwiegend im Gehirn, Auge und in der Leber der betroffenen Patienten.

Auffällig bei WD ist die mögliche Unterscheidung zweier unterschiedlicher Patientengruppen hinsichtlich ihrer Symptomatik: Während ein Teil der Patienten hauptsächlich Schädigungen der Leber aufweist, scheinen bei einem anderen Teil der Patienten neurologische Symptome stärker ausgeprägt zu sein. Patienten mit schweren neurologischen Schädigungen weisen vor allem Demenzen, psychiatrische und motorische Störungen auf. Bei einer frühen Diagnose der Erkrankung und einer geeigneten Therapie, zum Beispiel durch die lebenslange Einnahme von Kupfer-Chelatoren, sind diese Störungen reversibel. Zwar geht der Verlauf von WD in vielen Fällen einher mit neuronalem Abbau und Demenzerscheinungen, dennoch gehört diese Krankheit nicht zu den klassischen neurodegenerativen Erkrankungen. Die Degenerationen im Gehirn werden hier nicht durch die Aggregation bestimmter Proteine hervorgerufen, sondern durch eine Akkumulation von Kupfer in den Zellen und dem daraus resultierendem Zelltod. Die Ursache dieser Krankheit wird Mutationen des Gens *ATP7B* zugeschrieben. Eine Erklärung für den unterschiedlichen Verlauf und die unterschiedliche Organpräferenz (Leber- oder neurologische Schäden) gibt es derzeit jedoch noch nicht.

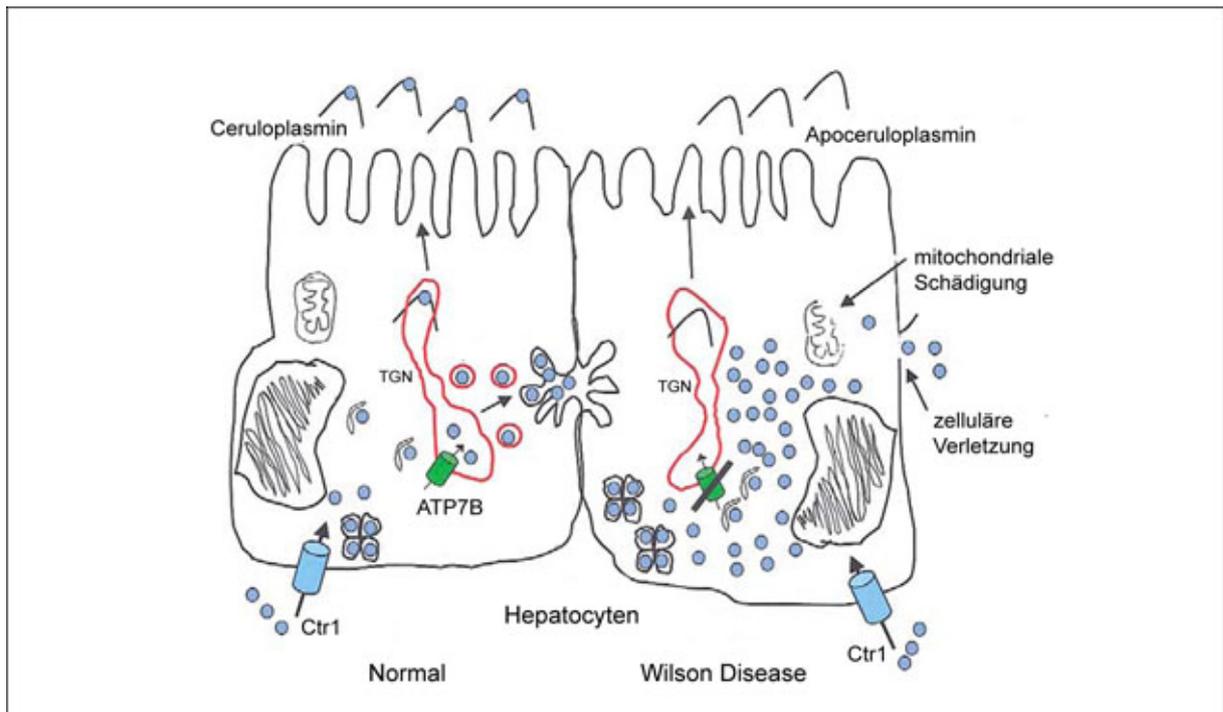


Abb. 33 Kupferstoffwechsel und Wilson Disease. Die an der Wilson Disease beteiligten ATPase (ATP7B) transportiert Kupfer zum Transgolginetzwerk (TGN). Von dort aus wird Kupfer, gebunden an Ceruloplasmin, von der Zelle sezerniert. Wilson Disease wird verursacht durch verschiedene funktionsbeeinträchtigende Mutationen des Gens *ATP7B*. Kupfer kann nicht mehr aus der Zelle heraustransportiert werden und akkumuliert. Dieses hat eine Schädigung der Zelle und letztendlich den Zelltod zur Folge. (Abbildung nach GITLIN, 2003)

Trotz verschiedener Ansätze konnte bislang keine einheitliche und eindeutige Genotyp-Phänotyp-Beziehung bei Patienten mit WD hergestellt werden (FERENCI, 2004; VRABELOVA *et al.*, 2005). Dieses liegt zum einen an der großen Anzahl der Mutationen im betroffenen Gen. Etwa 4200 Mutationen wurden im *ATP7B*-Gen identifiziert. Hinzu kommt eine geografische Variabilität der Mutations-Frequenz und eine vermischte Heterozygotität der Mutationen (FERENCI, 2004). Diese enorme Mutationsvielfalt von *ATP7B* macht es sehr wahrscheinlich, dass noch andere Gene den Phänotyp von WD beeinflussen.

Ein möglicher Kandidat könnte das Prion Protein Gen (*PRNP*) sein. Das Produkt von *PRNP* ist das normale Prion Protein (PrP^{C}). Dieses ist das Substrat für Prionen, welche spongiforme Enzephalopathien verursachen. Das Besondere an den Prionenerkrankungen ist die Tatsache, dass es sich um übertragbare neurodegenerative Erkrankungen handelt. Die Infektiosität wird hier allein der

fehlgefalteten Prion Protein Form zugeschrieben, ohne Beteiligung viraler Nukleinsäuren (SAFAR *et al.*, 2005). Die an der Krankheit beteiligten fehlgefalteten Prion Proteine (PrP^{Sc}) werden als infektiöse Agentia Prionen genannt (PRUSINER, 1982). Prionen replizieren autokatalytisch. So bringt die Krankheits-assoziierte Form PrP^{Sc} die normale Form PrP^{C} dazu, seine Konformation anzunehmen (PRUSINER, 1998). Unter den Prionenerkrankungen ist die sporadische Creutzfeldt Jakob Erkrankung (sCJD) die häufigste (85 % der Fälle) und die übertragene CJD die seltenste Form (< 1 % der Fälle). 15% der CJD Fälle sind genetischen Ursprungs und werden derzeit mit 55 Mutationen von PRNP in Verbindung gebracht (KONG *et al.*, 2004).

Da dem Prion Protein auf Grund seiner kupferbindenden Eigenschaften eine Rolle im Kupferstoffwechsel zugeschrieben wird, sollte bei einer Patientengruppe mit klinischem Wilson Disease das PrP Gen (*PRNP*) untersucht werden. Besonderer Augenmerk lag hierbei auf dem Polymorphismus M129V, der zu einem Aminosäure-Austausch von Methionin zu Valin führt. Homozygotität am Codon 129 von PRNP beeinflusst die Anfälligkeit für Creutzfeldt Jakob Disease (PALMER *et al.*, 1991), wahrscheinlich auf Grund dessen, dass die Konversion von PrP^{C} zu PrP^{Sc} bei der Anlagerung identischer Polypeptidsequenzen effektiver stattfindet (PRUSINER, 1998). Einen Einfluss des *PRNP* Codon 129 Genotyps auf cerebrale Funktionen und den klinischen Verlauf wurde auch für Krankheiten gezeigt, die in keinem direkten Zusammenhang mit Prionenerkrankungen stehen. So beeinflussen die *PRNP* Codon 129 Allele das Risiko, an einer früh auftretenden Form der Alzheimer Krankheit (Early Onset Alzheimer's Disease) zu erkranken (DERMAUT *et al.*, 2003; GOLANSKA *et al.*, 2004). Auch die kognitiven Fähigkeiten während des Alterns (BERR *et al.*, 1998; CROES *et al.*, 2003) und die Funktionen des Langzeitgedächtnisses in gesunden Probanden werden vom *PRNP* Codon 129 beeinflusst (PAPASSOTIROPOULOS *et al.*, 2005). Zudem scheint der Polymorphismus einen Einfluss auf die Bildung der verschiedenen PrP-Isoformen zu haben. So führt eine Methionin-Homozygotität von *PRNP* am Codon 129 tendenziell zu einer erhöhten Bildung von $^{\text{CTM}}\text{PrP}$ (OTT *et al.*, 2007). Da es sich bei $^{\text{CTM}}\text{PrP}$ um eine Transmembranform handelt, könnte die kupferbindende Funktion des sonst GPI-verankerten PrP gestört sein.

8. Material und Methoden

8.1. Bestimmung des PrP-Polymorphismus M129V aus humanem Blut

Material und Chemikalien

Name	Reinheitsgrad	Firma
Acrylamid	≥ 98 %	BioRad # 161-0156
Agarose		BioBudget # 10-35-1020
APS		Roth # 9592
BigDye®		Applied # 4337450
Borsäure	~ 99 %	Biosystems
Dextran-Blau		Sigma # B6768
dNTP-Mix		Fluka # 31393
EDTA	≥ 99 %	Roche # 11969064001
		AppliChem # A3553
EtOH	p.a.	Merck # 1.00983
Expand High Fidelity PCR System		Roche # 11732641001
Formamid	≥ 99,5 %	Sigma # F7508
NaAc	≥ 99 %	Sigma # S3272
TEMED	99 %	Roth # 2367
TRIS	p.a.	Merck # 1.08382
Urea	≥ 99,5 %	Fluka # 51459

PCR-Primer

PrP5Intron_s caacataaatatgggactctgacg
 PrP3UTRneu_as ccctcaagctggaaaaagattag

Sequenzierungsprimer

Satz A:	Satz B:
PrP5Intron_s caacataaatatgggactctgacg	PrP5Intron_s caacataaatatgggactctgacg
PrPseq_as ggtcctcatagtcactgcc	PrPseq2_s aaccgctaccacactcag
PrPSeq_s tgaagcacatggctggtgc	PrPSeq_s tgaagcacatggctggtgc
PrP3UTRneu_as ccctcaagctggaaaaagattag	PrPseq4_s cacacggtcaccacaacc

Material und Methoden II

Rezepte

PCR-Mix (25µl)		Sequenzierungsgel			
100 ng	genomische DNA	6 M	Urea		
200 µM	dNTP-Mix	4,5 %	Acrylamid 29: 1		
0,4 µM	Primer (jeweils)	1 x	TBE		
1 x	Expand High Fidelity Buffer + MgCl ₂ (1,5mM)	0,05 %	APS		
1 u	Expand High Fidelity Enzyme Mix	0,06 %	TEMED		
Sequenzierungs-Mix (10 µl)		Probenpuffer		TBE-Puffer (pH8.3)	
5 µl	PCR-Produkt	80 % (v/v)	Formamid	89 mM	Tris
0,5 µM	Primer	5 mM	EDTA pH8.0	89 mM	Borsäure
2 µl	Terminations-Mix	10 mg/ml	Dextranblau	2 mM	EDTA

PCR-Protokoll			Sequenzierungsreaktion		
95 °C	5'		96 °C	10"	
94 °C	15"		50 °C	5"	25x
53 °C	30"	10x	60 °C	4'	
72 °C	1'		Software		
94 °C	10"		ABI Prism™ 377 DNA Sequencer Data Collection Version 2.5.1		
53 °C	30"	jeweils 10x	ABI Prism® 377 Sequencing Analysis Version 3.4.1		
72 °C	2/3/4'				
72 °C	7'				
Sequenzierer			Sequenzierungsbedingungen		
Gelsequenzierer	ABI Prism™ 377 DNA Sequencer		Filter Set E	2500 V; 50 mA; 48 W; Laufzeit 8 h; Gel-Temperatur 51 °C; Laser-Stärke 40 mW; ; CCDOffset 250; CCDGain 2	

Zur Bestimmung des PrP-Polymorphismus M129V bei Patienten mit Wilson Disease (WD) wurde venöses Blut der Probanden verwendet. Die Aufreinigung der DNA aus EDTA-Blut erfolgte mittels des QIAGEN Kits FlexiGene nach dem Herstellerprotokoll für DNA-Isolation aus 1 - 3 ml Vollblut. Zur Gewinnung des Amplifikats des PrP-Gens (*PRNP*) aus der genomischen DNA wurde eine PCR mit einem Proof-Reading-

Enzym-Gemisch durchgeführt, um durch die PCR hervorgerufene Mutationen auszuschließen.

Zur Amplifikation von *PRNP* waren zwei Primer ausreichend, da der offene Leserahmen (Open Reading Frame; ORF) von PrP vollständig auf einem Exon lokalisiert ist. Um *PRNP* vollständig sequenzieren zu können, waren die Primer außerhalb des ORF lokalisiert. Das so gewonnene PCR-Produkt wurde im Agarosegel auf seine Reinheit überprüft und die entsprechende Bande von 867 bp ausgeschnitten. Zur Aufreinigung der DNA aus dem Agarosegel diente das Gel-Extraktions-Kit QIAQuick von QIAGEN. Verwendet wurde das Protokoll für die Gelextraktion nach Angaben des Herstellers. Zur Bestimmung des Polymorphismus wurden die PCR-Proben sequenziert.

Für die Sequenzreaktion, d. h. den Einbau farbig markierter Didesoxynukleotide (ddNTP) in den DNA-Strang, wurde das BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit verwendet (Applied Biosystems). Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 1 µl 3 M NaAc und 25 µl 95 % EtOH pro 10 µl Reaktionsgemisch gefällt (alles in 1,5 ml Reaktionsgefäß geben, vortexen, 20 Minuten bei 29.000 g und 4°C zentrifugieren). Nach zweimaligem Waschen mit 70 % EtOH und anschließender Lufttrocknung wurde das Pellet in 4 µl Probenpuffer aufgenommen. 2,5 µl der Proben wurden auf das Sequenzgel aufgetragen und analysiert.

Die statistischen Analysen wurden mittels des Statistikprogramms SPSS 11.0.2 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) durchgeführt. Für den Vergleich der Allelkombinationen zwischen den Gruppen wurden χ^2 -Tabellenvergleiche durchgeführt. Für den Test auf Homogenität von Varianzen zwischen den verschiedenen *PRNP* Codon 129 Gruppen wurde der Test nach Levene verwendet. Auf Grund des geringen Vorkommens wurden Probanden, die homozygot für Valin waren (n=2), nicht in diese Erhebung mit eingeschlossen. Alle gezeigten Experimente wurden durch die interne Ethikkommission des Uniklinikums Düsseldorf geprüft. Alle Patienten haben vor der Erhebung der Daten eine schriftliche Einwilligung abgegeben. Alle Experimente wurden in völliger Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

9. Ergebnisse

Zur Studie eines möglichen Einflusses des Genotyps von PrP auf den klinischen Verlauf von Wilson Disease wurden 40 WD Patienten der Neurologie der Heinrich Heine Universität Düsseldorf untersucht. Diese bundesweit rekrutierten Patienten nahmen an der ambulanten WD-Sprechstunde teil. Für die vorliegende Erhebung wurden alle teilnehmenden Patienten eines Jahres berücksichtigt. Wilson Disease wurde diagnostiziert, wenn mindestens zwei der folgenden Kriterien zutraten: Vorhandensein des Kayser Fleischer Rings, Serum-Ceruloplasmin < 15 mg/dl, Kupferexkretion im Urin > 250 μ g/24 h oder Kupfergehalt der Leber > 250 μ g/g Trockengewicht.

Die Patienten durchliefen standardisierte klinische neurologische Untersuchungen. Folgende klinische Anzeichen und Symptome wurden gewertet: Bradydiadochokinese, Funktionen des Kleinhirns, Dysarthrie, Dystonie, Gang, Augenbewegungsstörungen, sensorische Befunde, psychiatrische Symptome, Sehnenreflexe und Tremor. Zur Bewertung dieser Symptome wurde eine Bewertungsskala (WDRS = Wilson Disease Rating Scale) von 0, für die vollständige Abwesenheit neurologischer Symptome, bis 3, für äußerst schwerwiegende neurologische Symptome, verwendet (WALTER *et al.*, 2005).

Tabelle 3 Allel-Verteilung des Codon 129-Polymorphismus. Die Allel-Verteilung der WD-Patienten-Gruppe im Vergleich mit der normalen Allel-Verteilung einer deutschen Kontrollgruppe (WINDL *et al.*, 1999).

		MM [%]	MV [%]	VV [%]	Allel- Verteilung M	Allel- Verteilung V
deutsche Kontroll- Gruppe	n = 74	42	45	13	0.63	0.36
Gruppe mit Wilson Disease	n = 40	52.5	42.5	7	0.73	0.27

Nach der Erhebung der klinischen Symptome sollte das Krankheitsbild mit dem Genotypus von PrP verglichen werden. Dazu wurde den Patienten zur Gewinnung genomischer DNA Blut entnommen. Anschließend wurde das PrP Gen (*PRNP*) mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Die Sequenzierung des Open Reading Frames (ORF) von *PRNP* zeigte außer bei einem Patienten mit einer stillen Mutation GAC → GAT am Codon 202 auf einem Allel keine Mutationen. Hinsichtlich des Polymorphismus an Codon 129 (M/V) war die Verteilung bei den Patienten mit Wilson Disease vergleichbar mit der normalen Verteilung in einer deutschen Kontrollgruppe (WINDL *et al.*, 1999) (Tabelle 3). Dennoch gab es einen Trend hin zu einer erhöhten *PRNP* Codon 129 Methionin-Homozygotität.

Tabelle 4 Demografische und Krankheits-assoziierte Daten der untersuchten Patienten mit Wilson Disease. Alle Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung. Zur Bestimmung der statistischen Varianz wurde eine multivariate Analyse der Abweichungen verwendet.

	<i>PRNP</i> 129(MM)	<i>PRNP</i> 129 (MV)	
Anzahl	15	10	
Geschlecht (m/w)	7/8	6/4	
Alter (Jahre)	41 ± 2	32 ± 2	p < 0.02
WDRS	5.7 ± 1.0	2.6 ± 0.7	p < 0.02
Alter bei Ausbruch (Jahre)	29 ± 4	23 ± 3	n.s.
Dauer der Krankheit ^a (Jahre)	15 ± 4	7 ± 1	n.s.
freies Kupfer im Serum [µg/l]	0.34 ± 0.06	0.27 ± 0.06	n.s.
Ceruloplasmin im Serum [mg/dl]	8.1 ± 1.1	8.0 ± 1.3	n.s.
Kupfer im Urin [mg/l/24h]	0.15 ± 0.05	0.15 ± 0.03	n.s.

^a Alter bei Ausbruch der Krankheit und Dauer der Krankheit hinsichtlich neurologischer Symptome; n.s.: nicht signifikant

Nach einem blinden Ausschluss aller Patienten mit Nebenerkrankungen, die potentiell mit der klinischen Bewertung interferieren könnten, waren 15 Patienten homozygot für Methionin (MM) während 10 Patienten heterozygot für Methionin/

Ergebnisse II

Valin (M/V) waren. Zwei Patienten, die homozygot für Valin waren, konnten auf Grund der geringen Anzahl nicht in dieser Studie berücksichtigt werden.

Bei den für die Studie ausgewählten Patienten konnten keine Unterschiede in Serum-Kupfer, Serum-Ceruloplasmin oder 24 h Kupfer-Exkretion zwischen den heterozygoten und homozygoten Patienten beobachtet werden (Tabelle 4). Zudem gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede dieser zwei Gruppen hinsichtlich des Alters bei Auftreten der neurologischen Symptome oder der Dauer der Krankheit (Tabelle 4). Dennoch gab es einen signifikanten Unterschied beim Alter der zwei Patientengruppen zur Zeit der Erhebung. Durchschnittlich waren die Methionin-homozygoten Patienten etwa zehn Jahre älter als die Methionin/ Valin heterozygoten Patienten dieser Studie (Tabelle 4).

Klinisch wurden signifikant mehr schwere neurologische Symptome (WDRS-Auswertung) bei den homozygoten (MM) gegenüber den heterozygoten (MV) Patienten beobachtet (Tabelle 4). Besonders starker Tremor trat ausschließlich bei homozygoten Patienten auf. So hatten 10 MM-Patienten starken Tremor mit Werten bis zu 3 während bei den MV-Patienten nur 2 Patienten Tremor aufwiesen (mit dem niedrigsten Wert von 1). Alle anderen WD-Parameter unterschieden sich nicht in diesen beiden Gruppen (Tabelle 4).

Korrelationen zwischen den Parametern wie Ceruloplasmin im Serum mit freiem Kupfer im Serum oder mit dem Alter bei Einsetzen der neurologischen Symptome oder die inverse Korrelation des Alters bei Einsetzen der neurologischen Symptome mit der Dauer der Krankheit bei Zeitpunkt der Erhebung waren zu erwarten und bestätigen die Gültigkeit dieser Daten (Tabelle 5).

Tabelle 5 Korrelationskoeffizienten (Pearson) der erfassten Parameter der Patienten mit Wilson Disease.

	Alter	WDRS ^a	Alter bei Ausbruch ^b	Dauer der Krankheit ^b	Freies Kupfer im Serum	Ceruloplasmin im Serum	Kupfer im 24h Urin
Alter		0.61** ^c	0.35	0.55*	0.22	0.14	-0.24
WDRS ^a	0.61** ^c		0.21	0.21	-0.07	-0.01	-0.07
Alter bei Ausbruch ^b	0.35	0.21		-0.58*	0.54	0.58*	-0.31
Dauer der Krankheit ^b	0.55*	0.21	-0.58*		-0.36	-0.44	-0.07
Freies Kupfer im Serum	0.22	-0.07	0.54	-0.36		0.65**	0.07
Ceruloplasmin im Serum	0.14	-0.01	0.58*	-0.44	0.65**		-0.26
Kupfer im 24h Urin	-0.24	-0.07	-0.31	-0.07	0.07	-0.26	

** : Die Korrelation ist signifikant auf einem Niveau von 0.01 (beidseitig); * : Die Korrelation ist signifikant auf einem Niveau von 0.05 (beidseitig); ^a : WDRS Korrelationen wurden mit dem Spearmans Rangkorrelations-Test kalkuliert; ^b : Alter bei Ausbruch der Krankheit und Dauer der Krankheit hinsichtlich neurologischer Symptome; ^c : Die positive Korrelation des Alters mit WDRS wurde für die *PRNP* Codon 129 Genotypen unterschiedlich kalkuliert: Während für MM eine positive Korrelation mit 0.81 ($p < 0.0001$) errechnet wurde, korrelierte bei MV das Alter nicht mit WDRS (-0.06 , $p = 0.86$)

10. Diskussion

Die Genetische Grundlage vieler neurodegenerativer Erkrankungen ist immer noch unbekannt. Die Ätiologie von Wilson Disease (WD) ist eng verknüpft mit spezifischen Mutationen im Gen *ATP7B* (TANZI *et al.*, 1993). Dennoch ist der klinische Verlauf von WD sehr heterogen und konnte bislang nicht mit einzelnen Mutationen in *ATP7b* in Verbindung gebracht werden. Daher ist die Beteiligung anderer krankheitsbeeinflussender Gene wahrscheinlich (FERENCI, 2004). In dieser Arbeit sollte die Hypothese getestet werden, dass *PRNP* eine kritische Rolle als krankheitsmodifizierendes Gen in WD eine Rolle spielt. Ein Einfluss des *PRNP* Codon 129 wurde zuvor für cerebrale Funktionen und neurodegenerative Krankheiten, die nicht in direktem Zusammenhang mit Prionenerkrankungen stehen, beschrieben (BERR *et al.*, 1998; DERMAUT *et al.*, 2003; RIEMENSCHNEIDER *et al.*, 2004; PAPASSOTIROPOULOS *et al.*, 2005).

Homozygotität am *PRNP* Codon 129 erhöht das Risiko an "Early Onset Alzheimer's Disease" (EOAD) zu erkranken, zudem sind die Patienten bei Ausbruch der Krankheit jünger (DERMAUT *et al.*, 2003; PAPASSOTIROPOULOS *et al.*, 2005). Zusätzlich konnte ein "Valin-Dosis"-Effekt für die Krankheits-Beschleunigung in EOAD beobachtet werden (DERMAUT *et al.*, 2003). Valin-Homozygotität scheint zudem den kognitiven Verlust während der Alterung zu beschleunigen (BERR *et al.*, 1998) und führt zu einer negativen Beeinträchtigung des Langzeitgedächtnisses bei gesunden Probanden (PAPASSOTIROPOULOS *et al.*, 2005). Diese Daten suggerieren, dass das *PRNP* Codon 129 in zweifacher Weise cerebrale Funktionen modulieren kann: Zum einen durch Homozygotität und zum anderen durch den Valin-Dosis-Effekt. Veröffentlichungen legen nahe, dass der Valin-Dosis-Effekt vor allem einen Einfluss auf die rechnerischen Fähigkeiten hat, während die Homozygotität mit genereller cerebraler Degeneration verbunden zu sein scheint.

In der vorliegenden Arbeit gab es keine Unterschiede des Serum-Ceruloplasmin zwischen *PRNP* Codon 129 homozygoten und heterozygoten WD-Patienten. Im Gegensatz zum Kupfergehalt im Serum oder im Urin, welcher modifizierbar durch

Diät oder pharmakotherapeutischer Behandlung ist, kann Ceruloplasmin im Serum als individuelles Merkmal angesehen werden, das nur minimale Variationen während des klinischen Krankheitsverlaufs aufweist. Zudem zeigten auch andere Parameter des Kupferstoffwechsels keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Tabelle 4). Daher machen es die hier gezeigten Ergebnisse unwahrscheinlich, dass *PRNP* eine signifikante Rolle in der Pathophysiologie des Kupferstoffwechsels bei WD spielt.

Das Alter als eine unabhängige Variable wird weder mit einem gutartigen noch mit einem schnellen klinischen Verlauf von WD in Zusammenhang gebracht. Im Gegensatz dazu scheinen motorische Symptome sich bei älteren Patienten, vermutlich auf Grund von Therapien, zu verbessern (HEFTER *et al.*, 1993). Während es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Studiengruppen hinsichtlich des Alters bei Auftreten der Krankheit und der Dauer der Krankheit gab, waren die Methionin-homozygoten Patienten im Durchschnitt 10 Jahre älter als die heterozygoten Patienten. Interessanterweise gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Behandlungsdauer, die mit der Dauer der Krankheit gleichzusetzen ist (Tabelle 4), da die Behandlung in jedem Fall mit Erstellen der Diagnose einsetzte. Es konnte sogar ein Trend hinsichtlich einer längeren Behandlungsdauer zur Milderung neurologischer Symptome beobachtet werden (HEFTER *et al.*, 1993). In unserer Studie korrelierte das Alter signifikant mit dem WDRS Score. Zudem zeigte die Analyse der Kovarianz, dass Alter und WDRS voneinander abhängige Variablen innerhalb der Patientengruppen waren. Untergruppen-Analysen zeigten, dass die positive Korrelation allein auf der *PRNP* Codon 129 Methionin homozygoten Gruppe ($r= 0.81$, $p< 0.0001$; Tabelle 5) beruhte, während die heterozygoten keine Korrelation zwischen dem Alter und der Schwere der neurologischen Symptome zeigte, ($r= 0.06$; Tabelle 5).

In dem in dieser Arbeit verwendeten Protokoll und den hier gezeigten Daten kann eine Erhebungs-Neigung hinsichtlich der Untergruppen-Unterschiede ausgeschlossen werden: Zum einen gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Allel-Frequenzen der Patienten dieser Studie und denen einer Kontroll-Gruppe (Tabelle 3), zum anderen wurden für diese Studie alle Patienten, die die

ambulante WD-Sprechstunde innerhalb eines Jahres besucht haben, in die Studie einbezogen. Daher repräsentieren diese Patienten einen zufälligen Querschnitt der neurologischen WD-Population in Deutschland.

Die Ergebnisse dieser Studie lassen vermuten, dass Patienten mit klinisch stabilem WD schwerere neurologische Symptome in höherem Alter haben, wenn sie Methionin homozygot sind und dass sie weniger schwere verbleibende neurologische Symptome aufweisen, wenn sie heterozygot an Codon 129 sind. Daher brauchen homozygote Patienten auf Grund ihres verspäteten Ablaufs des neurologischen WD erst später in ihrem Leben Expertenhilfe und stellen daher eine durchschnittlich ältere Gruppe in unserer Erhebung dar.

Für die Beobachtung, dass Methionin Homozygotie zu einer höheren Prävalenz neurologischer Symptome – vor allem hinsichtlich Tremor – bei älteren MM-Patienten führt, gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten: Entweder könnte das Vorhandensein von Tremor in Patienten, die weniger zugänglich für die konventionelle pharmakologische Behandlung von WD sind, einen Effekt einer langandauernden Krankheit repräsentieren oder der Tremor könnte ein spezifisches Symptom in dieser WD-Patienten-Untergruppe sein. Daher legen die hier vorgelegten Ergebnisse zusammen mit denen der EOAD (DERMAUT *et al.*, 2003; RIEMENSCHNEIDER *et al.*, 2004) die Vermutung nahe, dass Methionin Homozygotie an *PRNP* Codon ein neurologischer verwundbarer Faktor ist, der nicht krankheitskennzeichnend ist, aber mit verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen einhergeht. Somit wäre Heterozygotie ein begünstigender Faktor für neurodegenerative Prozesse.

11. Zusammenfassung

Wilson Disease (WD) oder hepatolentikuläre Degeneration, ist eine Erkrankung des Kupferstoffwechsels und kann zu schwerwiegenden Störungen der Leber oder des zentralen Nervensystems führen. Bei WD ist die Beladung von Ceruloplasmin mit Kupferionen durch eine Mutation im Gen *ATP7B* nicht mehr möglich, wodurch es zu einer Störung des Kupfertransport aus der Zelle kommt. Die dadurch entstehenden Kupferakkumulationen führen zu Schädigungen der Mitochondrien und letztendlich zum Zelltod. Es kommt zu einer Anlagerung von Kupfer im Gewebe, vorwiegend im Gehirn, Auge und in der Leber der betroffenen Patienten, wobei es eine mögliche Unterscheidung der WD-Patientengruppen hinsichtlich einer neuronalen und einer hepatischen Symptomatik gibt. Einen direkten Zusammenhang zwischen bestimmten Mutationen von *ATP7B* und dem Phänotyp wurde bisher nicht gefunden. Die enorme Mutationsvielfalt von *ATP7B* macht es sehr wahrscheinlich, dass noch andere Gene den klinischen Verlauf von WD beeinflussen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese untersucht, dass *PRNP* ein Krankheits-modifizierendes Gen bei Wilson Disease ist und den neurologischen Phänotyp beeinflusst. Der Polymorphismus des humanen Prion Proteins am Codon 129 (*PRNP129*) bestimmt die Suszeptibilität für Prionenerkrankungen und wurde mit der Early Onset Alzheimer Krankheit (EOAD) und einem ernsteren Verlauf neurodegenerativer Erkrankungen in Verbindung gebracht. Unterschiede zwischen den Allel-Frequenzen von Patienten mit WD und denen einer gesunden deutschen Kontrollgruppe wurden nicht beobachtet. Der *PRNP129* Genotyp ergab keine Unterschiede des Gehaltes von Kupfer im Serum, Ceruloplasmin im Serum oder Kupfer in 24 h Urin. Dennoch führte die *PRNP129* Homozygotität zu signifikant schwereren neurologischen Symptomen in älteren Patienten, vor allem zu Tremor. Dieses unterstützt die These, dass *PRNP129* Homozygotität zu einer erhöhten neuronalen Verletzlichkeit führt.

12. Abstract (English)

Wilson disease (WD), or hepatolenticular degeneration, is a disease of copper metabolism that may lead to severe damage. WD is caused by mutations in *ATP7B*, a gene coding for a cellular copper-exporter involved in loading ceruloplasmin. Decreased elimination of copper leads to tissue deposition, primarily in the brain, eye, and liver of affected patients. Despite many attempts, no clear genotype-phenotype relationships could unequivocally be established for patients with Wilson disease. This is due to the high number of mutations that have been identified in the *ATP7B* gene, geographic variability of mutation frequency, and compound heterozygosity. It is therefore likely that genes other than *ATP7B* affect the WD phenotype. Here, we tested the hypothesis that the prion protein gene (*PRNP*) is a disease-modifying gene in clinical Wilson disease with a neurological phenotype. The polymorphism of the *PRNP* Codon 129 influences susceptibility to Creutzfeldt Jakob disease, the risk for early onset Alzheimer's disease, and a more severe progress of neurodegenerative frequencies in patients with clinical Wilson disease were not different from diseases. Allele those of a healthy German control population, and *PRNP* 129 genotypes did not result in different serum copper, serum ceruloplasmin, or copper in 24 hour urine concentrations. However, *PRNP* 129 methionine homozygosity led to significantly more severe neurological symptoms in elderly patients, particularly tremor, supporting the notion that *PRNP* 129 homozygosity contributes to neuronal vulnerability.

13. Abkürzungsverzeichnis

α	anti
Abb.	Abbildung
A β	Amyloid β Peptid
AICD	APP intrazelluläre Domäne
APP	Amyloid Precursor Protein
sAPP	lösliches APP
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
Atg5/ 7	Autophagieprotein 5/ 7
ATP	Adenosin Triphosphat
ATPase	Adenosin Triphosphatase
<i>ATP7b</i>	Gen der Kupfer-transportierenden ATPase
BA	Brodman Area
BSE	bovine spongiforme Enzephalopathie
C83/ 99	83/ 99 Aminosäuren großes C-terminales Fragment von APP
ch	chicken
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung
sCJD	sporadische Creutzfeldt Jakob Erkrankung
CMV	Cytomegalievirus
COMT	Catechol O-methyltransferase
DF	Durchfluss
DISC 1	Disrupted in Schizophrenia 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	complimentary DNA
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Deoxynukleotide
DOC	Deoxycholsäure
DRP-2	Dihydropyrimidinase-verwandtes Protein 2
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EF1 α	Elongationsfaktor 1 α
ELIFA	Enzyme-linked Immunoflow Assay
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EOAD	Early Onset Alzheimer's Disease
ER	endoplasmatisches Reticulum
ERAD	ER-assozierte Degradation
EtOH	Ethanol
G-6-PDH	Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure

Abkürzungsverzeichnis

HIS	Histidin
HRP	Horseradish Peroxidase
HSC	Hepatic stellate cells
HSP	Heat shock Protein
IB	Inclusion Bodies
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
KLH	Keyhole limpet hemocyanin
m	männlich
M	Methionin
M129V	Methionin-Valin-Polymorphismus am Codon 129
MeOH	Methanol
mo	mouse
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
MTT	Dimethylthiazolyldiphenyltetrazoliumbromid
myc	myelocytomatosis
N2a	Neuro-2a
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
n. s.	nicht signifikant
NUDEL	nuclear distribution element-like protein
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheincker-Syndrom
ORF	Open Reading Frame
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered Saline
PBS-T	Phosphate-buffered Saline + TWEEN
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI	Proteinaseinhibitor
pl	isoelektrischer Punkt
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluorid
<i>PRNP</i>	PrP-Gen
PrP ^C	zelluläres Prion Protein
PrP ^{Sc}	infektiöses Prion Protein
^{CTM} PrP	C-trans transmembrane Form des Prion Proteins
^{NTM} PrP	N-trans transmembrane Form des Prion Proteins
^{sec} PrP	sekretorische Form des Prion Proteins
POD	Peroxidase
PSA	Puromycin-sensitive Aminopeptidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rab	rabbit
Rab-3A	Ras-verwandtes Protein Rab-3A
Rab-10	Ras-verwandtes Protein Rab-3A
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA
SMRI	Stanley Medical Research Institute
SPC	Signal Peptidase Complex
SRP	Signal Recognition Particle Receptor

TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBS	TRIS-buffered Saline
TBS-T	TRIS-buffered Saline + TWEEN
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGN	Transgolginetzwerk
TMB	Tetramethyl-benzidine
TraF	Translokations-assoziierte Faktoren
TRAM1	Translocating chain-associating membrane protein 1
TRAM1L1	Translocating chain-associating membrane protein 1 like protein 1
TRAM2	Translocating chain-associating membrane protein 2
TCA	Trichloressigsäure
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UPR	Unfolded Protein Response
V	Valin
w	weiblich
WD	Wilson Disease
WDRS	Wilson Disease Rating Scale

14. Literaturverzeichnis

- Anfinsen, C. B. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181(96): 223-230
- Babbey, C. M., Ahktar, N., Wang, E., Chen, C. C., Grant, B. D., Dunn, K. W. 2006. Rab10 regulates membrane transport through early endosomes of polarized Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* 17(7): 3156-3175
- Baek, S. H., Ohgi, K. A., Rose, D. W., Koo, E. H., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G. 2002. Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF-kappaB and beta-amyloid precursor protein. *Cell* 110(1): 55-67
- Bence, N. F., Sampat, R. M., Kopito, R. R. 2001. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science* 292(5521): 1552-1555
- Bennett, E. J., Bence, N. F., Jayakumar, R., Kopito, R. R. 2005. Global impairment of the ubiquitin-proteasome system by nuclear or cytoplasmic protein aggregates precedes inclusion body formation. *Mol Cell* 17(3): 351-365
- Berr, C., Richard, F., Dufouil, C., Amant, C., Alperovitch, A., Amouyel, P. 1998. Polymorphism of the prion protein is associated with cognitive impairment in the elderly: the EVA study. *Neurology* 51(3): 734-737
- Bitan, G., Kirkitadze, M. D., Lomakin, A., Vollers, S. S., Benedek, G. B., Teplow, D. B. 2003. Amyloid beta -protein (Abeta) assembly: Abeta 40 and Abeta 42 oligomerize through distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(1): 330-335
- Bosque, P. J., Prusiner, S. B. 2000. Cultured cell sublines highly susceptible to prion infection. *J Virol* 74(9): 4377-4386
- Bray, N. J., Preece, A., Williams, N. M., Moskvina, V., Buckland, P. R., Owen, M. J., O'Donovan, M. C. 2005. Haplotypes at the dystrobrevin binding protein 1 (DTNBP1) gene locus mediate risk for schizophrenia through reduced DTNBP1 expression. *Hum Mol Genet* 14(14): 1947-1954
- Buck, M. 1998. Trifluoroethanol and colleagues: cosolvents come of age. *Recent studies with peptides and proteins. Q Rev Biophys* 31(3): 297-355
- Butler, D. A., Scott, M. R., Bockman, J. M., Borchelt, D. R., Taraboulos, A., Hsiao, K. K., Kingsbury, D. T., Prusiner, S. B. 1988. Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins. *J Virol* 62(5): 1558-1564
- Buxbaum, J. D., Liu, K. N., Luo, Y., Slack, J. L., Stocking, K. L., Peschon, J. J., Johnson, R. S., Castner, B. J., Cerretti, D. P., Black, R. A. 1998. Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem* 273(43): 27765-27767
- Cao, X., Sudhof, T. C. 2001. A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science* 293(5527): 115-120
- Castillo, P. E., Janz, R., Sudhof, T. C., Tzounopoulos, T., Malenka, R. C., Nicoll, R. A. 1997. Rab3A is essential for mossy fibre long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 388(6642): 590-593

- Chen, C. C., Schweinsberg, P. J., Vashist, S., Mareiniss, D. P., Lambie, E. J., Grant, B. D. 2006. RAB-10 is required for endocytic recycling in the *Caenorhabditis elegans* intestine. *Mol Biol Cell* 17(3): 1286-1297
- Chuck, S. L., Lingappa, V. R. 1992. Pause transfer: a topogenic sequence in apolipoprotein B mediates stopping and restarting of translocation. *Cell* 68(1): 9-21
- Chuck, S. L., Yao, Z., Blackhart, B. D., McCarthy, B. J., Lingappa, V. R. 1990. New variation on the translocation of proteins during early biogenesis of apolipoprotein B. *Nature* 346(6282): 382-385
- Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A. Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I., Selkoe, D. J. 1992. Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360(6405): 672-674
- Craddock, N., Owen, M. J., O'Donovan, M. C. 2006. The catechol-O-methyl transferase (COMT) gene as a candidate for psychiatric phenotypes: evidence and lessons. *Mol Psychiatry* 11(5): 446-458
- Croes, E. A., Dermaut, B., Houwing-Duistermaat, J. J., Van den Broeck, M., Cruts, M., Breteler, M. M., Hofman, A., van Broeckhoven, C., van Duijn, C. M. 2003. Early cognitive decline is associated with prion protein codon 129 polymorphism. *Ann Neurol* 54(2): 275-276
- Dermaut, B., Croes, E. A., Rademakers, R., Van den Broeck, M., Cruts, M., Hofman, A., van Duijn, C. M., Van Broeckhoven, C. 2003. PRNP Val129 homozygosity increases risk for early-onset Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 53(3): 409-412
- Dumpitak, C., Riesner, D. 2005. Der Beweis der Prionenhypothese. *Biologie in unserer Zeit* 35(6): 374-383
- Dunlop, J., Jones, P. C., Finbow, M. E. 1995. Membrane insertion and assembly of ductin: a polytopic channel with dual orientations. *Embo J* 14(15): 3609-3616
- Ferenci, P. 2004. Pathophysiology and clinical features of Wilson disease. *Metab Brain Dis* 19(3-4): 229-239
- Geppert, M., Bolshakov, V. Y., Siegelbaum, S. A., Takei, K., De Camilli, P., Hammer, R. E., Sudhof, T. C. 1994. The role of Rab3A in neurotransmitter release. *Nature* 369(6480): 493-497
- Geppert, M., Goda, Y., Stevens, C. F., Sudhof, T. C. 1997. The small GTP-binding protein Rab3A regulates a late step in synaptic vesicle fusion. *Nature* 387(6635): 810-814
- Gitlin, J. D. 2003. Wilson disease. *Gastroenterology* 125(6): 1868-1877
- Glodowski, D. R., Chen, C. C., Schaefer, H., Grant, B. D., Rongo, C. 2007. RAB-10 regulates glutamate receptor recycling in a cholesterol-dependent endocytosis pathway. *Mol Biol Cell* 18(11): 4387-4396
- Golanska, E., Hulas-Bigoszewska, K., Rutkiewicz, E., Styczynska, M., Peplonska, B., Barcikowska, M., Bratosiewicz-Wasik, J., Liberski, P. P. 2004. Polymorphisms within the prion (PrP) and prion-like protein (Doppel) genes in AD. *Neurology* 62(2): 313-315
- Gorlich, D., Hartmann, E., Prehn, S., Rapoport, T. A. 1992. A protein of the endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation. *Nature* 357(6373): 47-52
- Gorlich, D., Rapoport, T. A. 1993. Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 75(4): 615-630

- Hahn, C. G., Wang, H. Y., Cho, D. S., Talbot, K., Gur, R. E., Berrettini, W. H., Bakshi, K., Kamins, J., Borgmann-Winter, K. E., Siegel, S. J., Gallop, R. J., Arnold, S. E. 2006. Altered neuregulin 1-erbB4 signaling contributes to NMDA receptor hypofunction in schizophrenia. *Nat Med* 12(7): 824-828
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., Mizushima, N. 2006. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441(7095): 885-889
- Harrison, P. J., Weinberger, D. R. 2005. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry* 10(1): 40-68; image 45
- Hefter, H., Arendt, G., Stremmel, W., Freund, H. J. 1993. Motor impairment in Wilson's disease, I: Slowness of voluntary limb movements. *Acta Neurol Scand* 87(2): 133-147
- Hegde, R. S., Mastrianni, J. A., Scott, M. R., DeFea, K. A., Tremblay, P., Torchia, M., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Lingappa, V. R. 1998a. A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science* 279(5352): 827-834
- Hegde, R. S., Tremblay, P., Groth, D., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Lingappa, V. R. 1999. Transmissible and genetic prion diseases share a common pathway of neurodegeneration. *Nature* 402(6763): 822-826
- Hegde, R. S., Voigt, S., Lingappa, V. R. 1998b. Regulation of protein topology by trans-acting factors at the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* 2(1): 85-91
- Hegde, R. S., Voigt, S., Rapoport, T. A., Lingappa, V. R. 1998c. TRAM regulates the exposure of nascent secretory proteins to the cytosol during translocation into the endoplasmic reticulum. *Cell* 92(5): 621-631
- Hirokawa, T., Boon-Chieng, S., Mitaku, S. 1998. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* 14(4): 378-379
- Jahn, R., Sudhof, T. C. 1999. Membrane fusion and exocytosis. *Annu Rev Biochem* 68: 863-911
- Johnston-Wilson, N. L., Sims, C. D., Hofmann, J. P., Anderson, L., Shore, A. D., Torrey, E. F., Yolken, R. H. 2000. Disease-specific alterations in frontal cortex brain proteins in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. The Stanley Neuropathology Consortium. *Mol Psychiatry* 5(2): 142-149
- Karsten, S. L., Sang, T. K., Gehman, L. T., Chatterjee, S., Liu, J., Lawless, G. M., Sengupta, S., Berry, R. W., Pomakian, J., Oh, H. S., Schulz, C., Hui, K. S., Wiedau-Pazos, M., Vinters, H. V., Binder, L. I., Geschwind, D. H., Jackson, G. R. 2006. A genomic screen for modifiers of tauopathy identifies puromycin-sensitive aminopeptidase as an inhibitor of tau-induced neurodegeneration. *Neuron* 51(5): 549-560
- Klingenstein, R., Lober, S., Kujala, P., Godsave, S., Leliveld, S. R., Gmeiner, P., Peters, P. J., Korth, C. 2006. Tricyclic antidepressants, quinacrine and a novel, synthetic chimera thereof clear prions by destabilizing detergent-resistant membrane compartments. *J Neurochem* 98(3): 748-759
- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K. 2006. Loss of autophagy in the

- central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441(7095): 880-884
- Kong, Q., Surewicz, K. A., Petersen, R. B., Zou, W., Chen, S. G., Gambetti, P., Parchi, P., Capellari, S., Goldfarb, L., Montagna, P., Lugaresi, E., Piccardo, P., Ghetti, B. 2004. Inherited Prion Diseases. *Prion Biology and Diseases*: 673-775
- Laage, R., Langosch, D. 2001. Strategies for prokaryotic expression of eukaryotic membrane proteins. *Traffic* 2(2): 99-104
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., Fahrenholz, F. 1999. Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(7): 3922-3927
- Levine, B., Klionsky, D. J. 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6(4): 463-477
- Levy, D. 1996. Membrane proteins which exhibit multiple topological orientations. *Essays Biochem* 31: 49-60
- Lewis, D. A., Akil, M. 1997. Cortical dopamine in schizophrenia: strategies for postmortem studies. *J Psychiatr Res* 31(2): 175-195
- McKinley, M. P., Bolton, D. C., Prusiner, S. B. 1983. A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* 35(1): 57-62
- Millar, J. K., Christie, S., Anderson, S., Lawson, D., Hsiao-Wei Loh, D., Devon, R. S., Arveiler, B., Muir, W. J., Blackwood, D. H., Porteous, D. J. 2001. Genomic structure and localisation within a linkage hotspot of Disrupted In Schizophrenia 1, a gene disrupted by a translocation segregating with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 6(2): 173-178
- Millar, J. K., Wilson-Annan, J. C., Anderson, S., Christie, S., Taylor, M. S., Semple, C. A., Devon, R. S., Clair, D. M., Muir, W. J., Blackwood, D. H., Porteous, D. J. 2000. Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. *Hum Mol Genet* 9(9): 1415-1423
- Mullan, M., Houlden, H., Windelspecht, M., Fidani, L., Lombardi, C., Diaz, P., Rossor, M., Crook, R., Hardy, J., Duff, K., et al. 1992. A locus for familial early-onset Alzheimer's disease on the long arm of chromosome 14, proximal to the alpha 1-antichymotrypsin gene. *Nat Genet* 2(4): 340-342
- Oliver, J., Jungnickel, B., Gorlich, D., Rapoport, T., High, S. 1995. The Sec61 complex is essential for the insertion of proteins into the membrane of the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* 362(2): 126-130
- Olmsted, J. B., Carlson, K., Klebe, R., Ruddle, F., Rosenbaum, J. 1970. Isolation of microtubule protein from cultured mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 65(1): 129-136
- Ott, C. M., Akhavan, A., Lingappa, V. R. 2007. Specific features of the prion protein transmembrane domain regulate nascent chain orientation. *J Biol Chem* 282(15): 11163-11171
- Palmer, M. S., Dryden, A. J., Hughes, J. T., Collinge, J. 1991. Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* 352(6333): 340-342

- Papassotiropoulos, A., Wollmer, M. A., Aguzzi, A., Hock, C., Nitsch, R. M., de Quervain, D. J. 2005. The prion gene is associated with human long-term memory. *Hum Mol Genet* 14(15): 2241-2246
- Proctor, C. J., Soti, C., Boys, R. J., Gillespie, C. S., Shanley, D. P., Wilkinson, D. J., Kirkwood, T. B. 2005. Modelling the actions of chaperones and their role in ageing. *Mech Ageing Dev* 126(1): 119-131
- Prusiner, S. B. 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216(4542): 136-144
- Prusiner, S. B. 1998. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(23): 13363-13383
- Prusiner, S. B. 2001. Shattuck lecture--neurodegenerative diseases and prions. *N Engl J Med* 344(20): 1516-1526
- Reynolds, C. P., Tomayko, M. M., Donner, L., Helson, L., Seeger, R. C., Triche, T. J., Brodeur, G. M. 1988. Biological classification of cell lines derived from human extra-cranial neural tumors. *Prog Clin Biol Res* 271: 291-306
- Riemenschneider, M., Klopp, N., Xiang, W., Wagenpfeil, S., Vollmert, C., Muller, U., Forstl, H., Illig, T., Kretzschmar, H., Kurz, A. 2004. Prion protein codon 129 polymorphism and risk of Alzheimer disease. *Neurology* 63(2): 364-366
- Romisch, K. 2005. Endoplasmic reticulum-associated degradation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 435-456
- Safar, J. G., Kellings, K., Serban, A., Groth, D., Cleaver, J. E., Prusiner, S. B., Riesner, D. 2005. Search for a prion-specific nucleic acid. *J Virol* 79(16): 10796-10806
- Sambrook, J., Russell, D. W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, New York
- Schrodel, A., Volz, J., de Marco, A. 2005. Fusion tags and chaperone co-expression modulate both the solubility and the inclusion body features of the recombinant CLIPB14 serine protease. *J Biotechnol* 120(1): 2-10
- Schroder, M., Kaufman, R. J. 2005. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res* 569(1-2): 29-63
- Selkoe, D. J. 1994. Cell biology of the amyloid beta-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease. *Annu Rev Cell Biol* 10: 373-403
- Selkoe, D. J., Wolfe, M. S. 2000. In search of gamma-secretase: presenilin at the cutting edge. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(11): 5690-5692
- Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Sinha, S., Schlossmacher, M., Whaley, J., Swindlehurst, C., et al. 1992. Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* 359(6393): 325-327
- Sinha, S., Anderson, J. P., Barbour, R., Basi, G. S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H. F., Frigon, N., Hong, J., Jacobson-Croak, K., Jewett, N., Keim, P., Knops, J., Lieberburg, I., Power, M., Tan, H., Tatsuno, G., Tung, J., Schenk, D., Seubert, P., Suomensaari, S. M., Wang, S., Walker, D., Zhao, J., McConlogue, L., John, V. 1999. Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature* 402(6761): 537-540
- Sisodia, S. S., Koo, E. H., Hoffman, P. N., Perry, G., Price, D. L. 1993. Identification and transport of full-length amyloid precursor proteins in rat peripheral nervous system. *J Neurosci* 13(7): 3136-3142
- Skach, W. R., Calayag, M. C., Lingappa, V. R. 1993. Evidence for an alternate model of human P-glycoprotein structure and biogenesis. *J Biol Chem* 268(10): 6903-6908

- Snapp, E. L., Reinhart, G. A., Bogert, B. A., Lippincott-Schwartz, J., Hegde, R. S. 2004. The organization of engaged and quiescent translocons in the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J Cell Biol* 164(7): 997-1007
- Stahl, N., Baldwin, M. A., Teplow, D. B., Hood, L., Gibson, B. W., Burlingame, A. L., Prusiner, S. B. 1993. Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry* 32(8): 1991-2002
- Stefanovic, B., Stefanovic, L., Schnabl, B., Bataller, R., Brenner, D. A. 2004. TRAM2 protein interacts with endoplasmic reticulum Ca²⁺ pump Serca2b and is necessary for collagen type I synthesis. *Mol Cell Biol* 24(4): 1758-1768
- Stefansson, H., Sigurdsson, E., Steinthorsdottir, V., Bjornsdottir, S., Sigmundsson, T., Ghosh, S., Brynjolfsson, J., Gunnarsdottir, S., Ivarsson, O., Chou, T. T., Hjaltason, O., Birgisdottir, B., Jonsson, H., Gudnadottir, V. G., Gudmundsdottir, E., Bjornsson, A., Ingvarsson, B., Ingason, A., Sigfusson, S., Hardardottir, H., Harvey, R. P., Lai, D., Zhou, M., Brunner, D., Mutel, V., Gonzalo, A., Lemke, G., Sainz, J., Johannesson, G., Andresson, T., Gudbjartsson, D., Manolescu, A., Frigge, M. L., Gurney, M. E., Kong, A., Gulcher, J. R., Petursson, H., Stefansson, K. 2002. Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Am J Hum Genet* 71(4): 877-892
- Straub, R. E., Jiang, Y., MacLean, C. J., Ma, Y., Webb, B. T., Myakishev, M. V., Harris-Kerr, C., Wormley, B., Sadek, H., Kadambi, B., Cesare, A. J., Gibberman, A., Wang, X., O'Neill, F. A., Walsh, D., Kendler, K. S. 2002. Genetic variation in the 6p22.3 gene DTNBP1, the human ortholog of the mouse dysbindin gene, is associated with schizophrenia. *Am J Hum Genet* 71(2): 337-348
- Sugimoto, T., Tatsumi, E., Kemshead, J. T., Helson, L., Green, A. A., Minowada, J. 1984. Determination of cell surface membrane antigens common to both human neuroblastoma and leukemia-lymphoma cell lines by a panel of 38 monoclonal antibodies. *J Natl Cancer Inst* 73(1): 51-57
- Tanzi, R. E., Petrukhin, K., Chernov, I., Pellequer, J. L., Wasco, W., Ross, B., Romano, D. M., Parano, E., Pavone, L., Brzustowicz, L. M., et al. 1993. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nat Genet* 5(4): 344-350
- Taylor, J. P., Hardy, J., Fischbeck, K. H. 2002. Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science* 296(5575): 1991-1995
- Tumilowicz, J. J., Nichols, W. W., Cholon, J. J., Greene, A. E. 1970. Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma. *Cancer Res* 30(8): 2110-2118
- Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M. A., Biere, A. L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J. C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., Citron, M. 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286(5440): 735-741
- Voigt, S., Jungnickel, B., Hartmann, E., Rapoport, T. A. 1996. Signal sequence-dependent function of the TRAM protein during early phases of protein transport across the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* 134(1): 25-35

- Vrabelova, S., Letocha, O., Borsky, M., Kozak, L. 2005. Mutation analysis of the ATP7B gene and genotype/phenotype correlation in 227 patients with Wilson disease. *Mol Genet Metab* 86(1-2): 277-285
- Walter, U., Krolikowski, K., Tarnacka, B., Benecke, R., Czlonkowska, A., Dressler, D. 2005. Sonographic detection of basal ganglia lesions in asymptomatic and symptomatic Wilson disease. *Neurology* 64(10): 1726-1732
- Weickert, C. S., Straub, R. E., McClintock, B. W., Matsumoto, M., Hashimoto, R., Hyde, T. M., Herman, M. M., Weinberger, D. R., Kleinman, J. E. 2004. Human dysbindin (DTNBP1) gene expression in normal brain and in schizophrenic prefrontal cortex and midbrain. *Arch Gen Psychiatry* 61(6): 544-555
- Windl, O., Giese, A., Schulz-Schaeffer, W., Zerr, I., Skworc, K., Arendt, S., Oberdieck, C., Bodemer, M., Poser, S., Kretzschmar, H. A. 1999. Molecular genetics of human prion diseases in Germany. *Hum Genet* 105(3): 244-252
- Winter, E., Ponting, C. P. 2002. TRAM, LAG1 and CLN8: members of a novel family of lipid-sensing domains? *Trends Biochem Sci* 27(8): 381-383
- Wojcik, C., Yano, M., DeMartino, G. N. 2004. RNA interference of valosin-containing protein (VCP/p97) reveals multiple cellular roles linked to ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis. *J Cell Sci* 117(Pt 2): 281-292
- Yan, R., Bienkowski, M. J., Shuck, M. E., Miao, H., Tory, M. C., Pauley, A. M., Brashier, J. R., Stratman, N. C., Mathews, W. R., Buhl, A. E., Carter, D. B., Tomasselli, A. G., Parodi, L. A., Heinrikson, R. L., Gurney, M. E. 1999. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 402(6761): 533-537
- Yost, C. S., Lopez, C. D., Prusiner, S. B., Myers, R. M., Lingappa, V. R. 1990. Non-hydrophobic extracytoplasmic determinant of stop transfer in the prion protein. *Nature* 343(6259): 669-672
- Zhang, J. T., Ling, V. 1995. Involvement of cytoplasmic factors regulating the membrane orientation of P-glycoprotein sequences. *Biochemistry* 34(28): 9159-9165

Danksagung

Allen, die zur Vollendung dieser Arbeit beigetragen haben und mich während der vergangenen Zeit unterstützt haben, möchte ich ein großes „Dankeschön“ aussprechen.

Ein besonderer Dank geht an PD Dr. Carsten Korth für die Möglichkeit der Durchführung und die Betreuung meiner Promotionsarbeit. Zudem möchte ich mich für die ständige Diskussionsbereitschaft und die große Unterstützung vor allem im letzten Drittel meiner Promotionszeit bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dieter Willbold für die Übernahme des Korreferats und die Bereitschaft der Mitbetreuung als Vertreter der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Guido Reifenberger für die Möglichkeit, meine Arbeit am Institut für Neuropathologie anfertigen zu können.

Ein sehr großer Dank geht an alle Kooperationspartner, im Besonderen an Prof. Dr. Vishwanath Lingappa, Prof. Dr. Bruce Onisko, Prof. Dr. Harald Hefter, Dr. Olaf Stüve, Prof. Dr. Lothar Stitz, Prof. Dr. Sascha Weggen, Julia Ness, Eva Czirr und Benjamin Petsch.

Ganz besonders bedanke ich mich bei den derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, die durch die ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft auf berufliche und persönliche Weise ein tolles Arbeitsklima geschaffen haben. Ein besonderer Dank geht hierbei an Frau Janine Muyrers für viele aufmunternde Worte und geduldiges Zuhören, Herrn Dr. Andreas Müller-Schiffmann für konstruktive Kritik und Korrekturen an der vorliegenden Arbeit sowie für seine Gabe, stets einen Lösungsvorschlag aus dem Ärmel zu zaubern, Herrn Dr. Rutger Leliveld für seine große fachliche Hilfe, Herrn Ralf Lucassen für seine Unterstützung und Frau Ingrid Prikulis für alle praktischen Tipps und Tricks des Laboralltags.

Auch an alle übrigen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeiter des Instituts für Neuropathologie geht ein großer Dank für fachliche Beratung und ein tolles kollegiales Umfeld. Ein besonderer Dank geht hierbei an Frau Dr. Marietta Wolter und Herrn Dr. Peter Roerig, die in meiner ersten Woche in der Neuropathologie das Geheimnis der „nicht-funktionieren-wollenden“ PCR gelüftet haben. Ohne diesen Umstand hätte ich es sicherlich nicht so weit geschafft.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Jan Berger für seine tapfere Unterstützung während der gesamten Zeit und bei meinen Eltern für ihre stets rückhaltlose Unterstützung bei allem was ich tue. Frau Dr. Claudia Esser, Frau Gudrun Strahl, Frau Dr. Marietta Wolter, Frau Heike Denck und Herrn Mark Rogers danke ich für die sprachlichen, inhaltlichen und formalen Korrekturen an dieser Arbeit.

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 11.01.2008

(Stephanie Grubenbecher)