

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Mitochondriale Zielsteuerung durch
N-terminale Signalpeptide sekretorischer Proteine:
Mechanismen und pathophysiologische Konsequenzen**



Natalie Verena Maria Pfeiffer

aus

Starnberg, Deutschland

2012

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Professor Dr. Jörg Tatzelt betreut und von Frau PD Dr. Konstanze F. Winklhofer von der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 26.10.2012

Dissertation eingereicht am 29.10.2012

1. Gutachterin: PD Dr. Konstanze F. Winklhofer

2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Tatzelt

Mündliche Prüfung am 13.12.2012

Meinen Eltern

Danksagung

Mein erster Dank geht an Herrn Professor Dr. Jörg Tatzelt.

Jörg, ich möchte mich herzlich bei Dir für mein spannendes Projekt, Deine überaus engagierte Betreuung, die zahlreichen guten Ideen, die vielen amüsanten fachlichen Diskussionen und Deine stetige Unterstützung in guten wie in schwierigen Zeiten einer Doktorarbeit, bedanken.

Bei Frau PD Dr. Konstanze Winklhofer bedanke ich mich für ihre herzlich Betreuung und die hervorragende Zusammenarbeit in den letzten Jahren sowie für die Übernahme der Fachvertretung und die Begutachtung dieser Arbeit.

Besonders möchte ich mich bei meinen Kooperationspartnern Herrn Professor Dr. Richard Zimmermann und Dr. Sven Lang für ihre engagierte fachliche und experimentelle Unterstützung bedanken.

Bei Herrn Dr. Dietrich Trümbach bedanke ich mich für die Hilfe bei den bioinformatischen Analysen dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. Stefan Lichtenthaler möchte ich für seine Unterstützung als Teil meines PhD-Komitees danken. Bei Herrn Dr. Peer-Hendrik Kuhn möchte ich mich ausdrücklich für seine engagierten fachlichen und experimentellen Hilfestellungen bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an alle Mitarbeiter der Abteilung Stoffwechselbiochemie des Adolf-Butenandt-Instituts der LMU München. Insbesondere möchte ich mich bei meiner Gruppe (Tatzelt/Winklhofer) für die tolle Arbeitsatmosphäre bedanken. Vignesh und Mädels (Anna, Caro, Elisa, Kathrin, Maria M., Maria P., Simone, Viktoria) ohne Euch wären die letzten Jahre nur halb so schön gewesen! Liebe Anita, Margit und Mareike es waren fantastische erste Jahre mit Euch! Liebe Dani, Uli und Sina tausend Dank für all eure Unterstützung, für die vielen lustigen Momente und die einzigartigen gemeinsamen Erinnerungen.

Herzlich möchte ich mich außerdem bei Frau Veronika Müller bedanken, die mich die letzten Jahre tatkräftig unterstützt hat und deren Witze und Schokoladenversorgung so manchen Labortag versüßt haben.

Mein ganz besonderer Dank geht an meinen Freund Bastian, der mich in den letzten Monaten mit viel Geduld und Humor unglaublich toll unterstützt hat.

Am Ende dieser Seite und mit Sicherheit nicht als Letztes möchte ich meinen Eltern danken. Von Euch beiden habe ich so viel gelernt und ihr gebt mir Rückhalt in allen Lebenslagen. Danke für Alles!

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	7
1.1	Zielsteuerung von Proteinen	7
1.1.1	Einführung	7
1.1.2	Duale Zielsteuerung	10
1.1.3	Zielsteuerung mitochondrialer Proteine	11
1.1.3.1	<i>Mitochondriale Signalsequenzen und mitochondriale Importwege</i>	11
1.1.3.2	<i>Kotranslationale Zielsteuerungen der Mitochondrien</i>	15
1.1.3.3	<i>Zielsteuerung vom Zytosol zu den Mitochondrien</i>	15
1.1.4	Zielsteuerung sekretorischer Proteine	16
1.1.4.1	<i>ER-Signalpeptide und ER-Import Arten</i>	16
1.1.4.2	<i>Kotranslationaler ER-Import</i>	18
1.1.4.3	<i>Posttranslationaler ER-Import</i>	20
1.2	Qualitätskontrollmechanismen des ERs	22
1.2.1	ERAD	22
1.2.2	Die „Antwort auf ungefaltete Proteine“	23
1.2.3	Die kotranslationale Qualitätskontrolle	23
1.3	GPI-verankerte Proteine	25
1.4	Proteinstruktur und intrinsisch unstrukturierte Proteine	27
1.5	Die analysierten Proteine	29
1.5.1	Das Prion-Protein	29
1.5.2	Shadoo	33
1.5.3	Somatostatin	35
1.5.4	Das Amyloid-Vorläuferprotein	37
1.6	Zielsetzung	41

2	ERGEBNISSE	43
2.1	TEIL 1: Die Rolle der GPI-Signalsequenz beim ER-Import intrinsisch unstrukturierter Proteine	43
2.1.1	Die GPI-Signalsequenz von Shadoo ist essentiell für dessen ER-Import	44
2.1.2	Die GPI-Signalsequenz von Shadoo ist kein eigenständiges ER-Import-Signal	48
2.1.3	Eine GPI-Signalsequenz verbessert den ER-Import unstrukturierter Proteine	49
2.1.4	Die Zytotoxizität der pathogenen PrP-Mutante Q159X kann durch Fusion einer GPI-Signalsequenz signifikant gesenkt werden	51
2.2	TEIL 2: Mitochondriale Zielsteuerung durch N-terminale Signalpeptide sekretorischer Proteine	54
2.2.1	Mitochondriale Zielsteuerung nicht-translozierter Shadoo- und Somatostatin-Mutanten	54
2.2.2	Die ER-Signalpeptide von Shadoo, Somatostatin und APP leiten nicht-translozierte Proteine zu den Mitochondrien	58
2.2.3	Die mitochondriale Zielsteuerung sekretorischer Proteine wird durch strukturelle Merkmale der Polypeptidkette gesteuert	62
2.2.4	Die Signalpeptide von Sho, Som und APP sind unterschiedlich starke ER-Import-Signale	64
2.2.5	Die mitochondriale Lokalisation von sekretorischen Proteinen kann zur Schädigung von Mitochondrien führen	66
2.2.6	Charakterisierung der mitochondrialen Toxizität von APP•115α2α3	69
2.2.6.1	<i>Die Überexpression von APP•115α2α3 führt zu einem verminderten mitochondrialen Import von TRAP-1</i>	69
2.2.6.2	<i>APP•115α2α3 wird in die Mitochondrien importiert</i>	70
2.2.6.3	<i>Die mitochondriale Toxizität von APP•115α2α3 hängt mit der Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke zusammen</i>	72

2.2.7	Bioinformatische Charakterisierung der Signalpeptide von Sho, Som und APP.....	74
2.2.8	Inverse Korrelation zwischen ER-Import und mitochondrialer Zielsteuerung.....	76
2.2.9	Durch die Verbesserung des ER-Imports wird die mitochondriale Toxizität von <i>APP</i> •115 α 2 α 3 signifikant verringert.....	79
2.2.10	Durch Reduktion des ER-Imports von <i>Sho</i> •115 α 2 α 3 und <i>Som</i> •115 α 2 α 3 wird deren mitochondriale Toxizität signifikant erhöht....	81
2.2.11	Mitochondriale Zielsteuerung als Folge eines gescheiterten ER-Imports	83
2.2.11.1	<i>Hemmung der ER-Translokation durch Eeyarestatin 1</i>	83
2.2.11.2	<i>Inhibition des ER-Imports durch knockdown von Sec61a1</i>	85
2.2.11.3	<i>Mitochondriale Zielsteuerung der Wildtyp-Proteine Sho, Som und APP unter Bedingungen eines gehemmten ER-Imports</i>	86
3	DISKUSSION	89
3.1	TEIL 1: Die Rolle der GPI-Signalsequenz beim ER-Import intrinsisch unstrukturierter Proteine	89
3.1.1	Die Regulation des ER-Imports sekretorischer Proteine	89
3.1.2	Unstrukturierte Proteine translozieren ineffizient ins ER	90
3.1.3	Eine GPI-Signalsequenz verbessert den ER-Import unstrukturierter Proteine.....	91
3.1.4	Wie könnte eine GPI-Signalsequenz die Translokationseffizienz verbessern?.....	92
3.1.5	Translokationsfördernde Domänen müssen nicht Teil des maturen Proteins sein.....	96
3.2	TEIL 2: Mitochondriale Zielsteuerung durch ER-Signalpeptide.....	97
3.2.1	N-terminale ER-Signalpeptide können eine bivalente Steuerungsaktivität aufweisen	97
3.2.2	Wieso können Proteine unterschiedlich lokalisiert sein?	97

3.2.3	Kann ein und dasselbe Signalpeptid zwei Transportrichtungen vermitteln?.....	99
3.2.4	Welche Zielsteuerung durch die Signalpeptide von Sho, Som und APP vermittelt wird, hängt von der Sekundärstruktur der Polypeptidkette ab	100
3.2.5	Eine mitochondriale Zielsteuerung sekretorischer Proteine kann zur Schädigung der Mitochondrien führen	100
3.2.6	Die mitochondriale Zielsteuerung durch ER-Signalpeptide erfolgt als Folge eines ineffizienten ER-Imports	102
3.2.7	Wie könnte die Sekundärstruktur der Polypeptidkette die Zielsteuerung eines Proteins beeinflussen?.....	104
3.2.8	Duale Zielsteuerung sekretorischer Proteine – Physiologischer Nutzen und pathophysiologische Relevanz	106
4	ZUSAMMENFASSUNG.....	109
5	MATERIAL	111
5.1	Biologisches Material	111
5.1.1	Bakterienstämme.....	111
5.1.2	Zelllinien	111
5.1.3	Plasmidvektoren	111
5.1.4	Rekombinante DNA.....	111
5.1.5	Small interfering RNA (siRNA).....	114
5.1.6	Synthetische Oligonukleotide.....	115
5.1.7	Antikörper	116
5.1.8	Standardgrößenmarker für Proteine und Nucleinsäuren.....	118
5.1.9	Biologische Reagenzien	118
5.2	Chemische Reagenzien	118
5.3	Lösungen und Puffer	120
5.4	Medien.....	123
5.5	Kits	123

5.6	Geräte	124
5.7	Sonstige Materialien	126
6	METHODEN	127
6.1	Molekularbiologische Methoden	127
6.1.1	Polymerase-Kettenreaktion	127
6.1.2	Aufreinigung von PCR-Produkten	130
6.1.3	Restriktion und Ligation	130
6.1.4	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	132
6.1.5	Transformation	132
6.1.6	DNA-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	133
6.1.6.1	<i>Präparation von neu klonierter Plasmid-DNA im kleinen Maßstab</i>	<i>133</i>
6.1.6.2	<i>Präparation von Plasmid-DNA im größeren Maßstab</i>	<i>134</i>
6.1.7	Klonierung neuer DNA-Konstrukte	134
6.2	Zellkultur	138
6.2.1	Zellkultivierung	138
6.2.2	Zellpassagierung	138
6.2.3	Ausplattieren von Zellen	138
6.2.4	Transfektion von Zellen	139
6.2.5	Zellernte	140
6.3	Proteinanalytik	140
6.3.1	Western Blot Analyse	140
6.3.1.1	<i>Herstellung von Gesamtzell-Lysaten</i>	<i>140</i>
6.3.1.2	<i>Proteinbestimmung nach Bradford</i>	<i>141</i>
6.3.1.3	<i>Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	<i>141</i>
6.3.1.4	<i>Proteintransfer (Western-Blot)</i>	<i>142</i>
6.3.1.5	<i>Ponceau-Färbung</i>	<i>143</i>
6.3.1.6	<i>Immundetektion</i>	<i>143</i>
6.3.1.7	<i>Visualisierung und Quantifizierung</i>	<i>143</i>
6.3.2	Spezielle Proteinanalytik	144

6.3.2.1	<i>Nachweis der Sekretion von Proteinen</i>	144
6.3.2.2	<i>Nachweis des proteasomalen Abbaus von Proteinen</i>	144
6.3.2.3	<i>Nachweis der Glykosylierung von Proteinen</i>	144
6.3.3	Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie	145
6.4	Spezielle Methoden	146
6.4.1	Färbung der Mitochondrien mit MitoTracker Red CMXRos	146
6.4.2	Ermittlung der zellulären Lokalisation eines Proteins mittels Immunfluoreszenz	146
6.4.3	Quantifizierung von Immunfluoreszenz-Analysen	147
6.4.4	Apoptose-Assay	148
6.4.5	Nachweis des mitochondrialen Imports von Proteinen	148
6.4.6	SEC61A1- <i>Knockdown</i> mittels RNA-Interferenz	150
6.4.7	Radioaktive Markierung von Proteinen mit [35S]-Methionin	150
6.4.8	Benutzung von Vorhersageprogrammen	151
6.5	Statistische Auswertung	151
7	BIBLIOGRAPHIE	147
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	173
9	VERÖFFENTLICHUNGEN	175

1 Einleitung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle einer GPI-Signalsequenz beim ER-Import unstrukturierter Proteine untersucht. Darüber hinaus wurde ein Steuerungsmechanismus charakterisiert, über den sekretorische Proteine zu den Mitochondrien geleitet werden können. Einleitend wird daher ein Überblick über die Zielsteuerung von Proteinen, unter besonderer Berücksichtigung sekretorischer und mitochondrialer Proteine, gegeben. Desweiteren werden GPI-verankerte und intrinsisch unstrukturierte Proteine sowie die untersuchten Wildtyp-Proteine vorgestellt.

1.1 Zielsteuerung von Proteinen

1.1.1 Einführung

Eukaryotische Proteine werden, bis auf einige Proteine der Mitochondrien und Chloroplasten, von Genen im Zellkern kodiert und an Ribosomen im Zytosol synthetisiert. Da viele Proteine ihre Funktion jedoch nicht im Zytosol erfüllen, müssen sie zu ihrem zellulären Zielort weitergeleitet werden. Die dabei stattfindenden Prozesse fasst man als Sortierung oder Zielsteuerung von Proteinen zusammen (*protein sorting; protein targeting*).

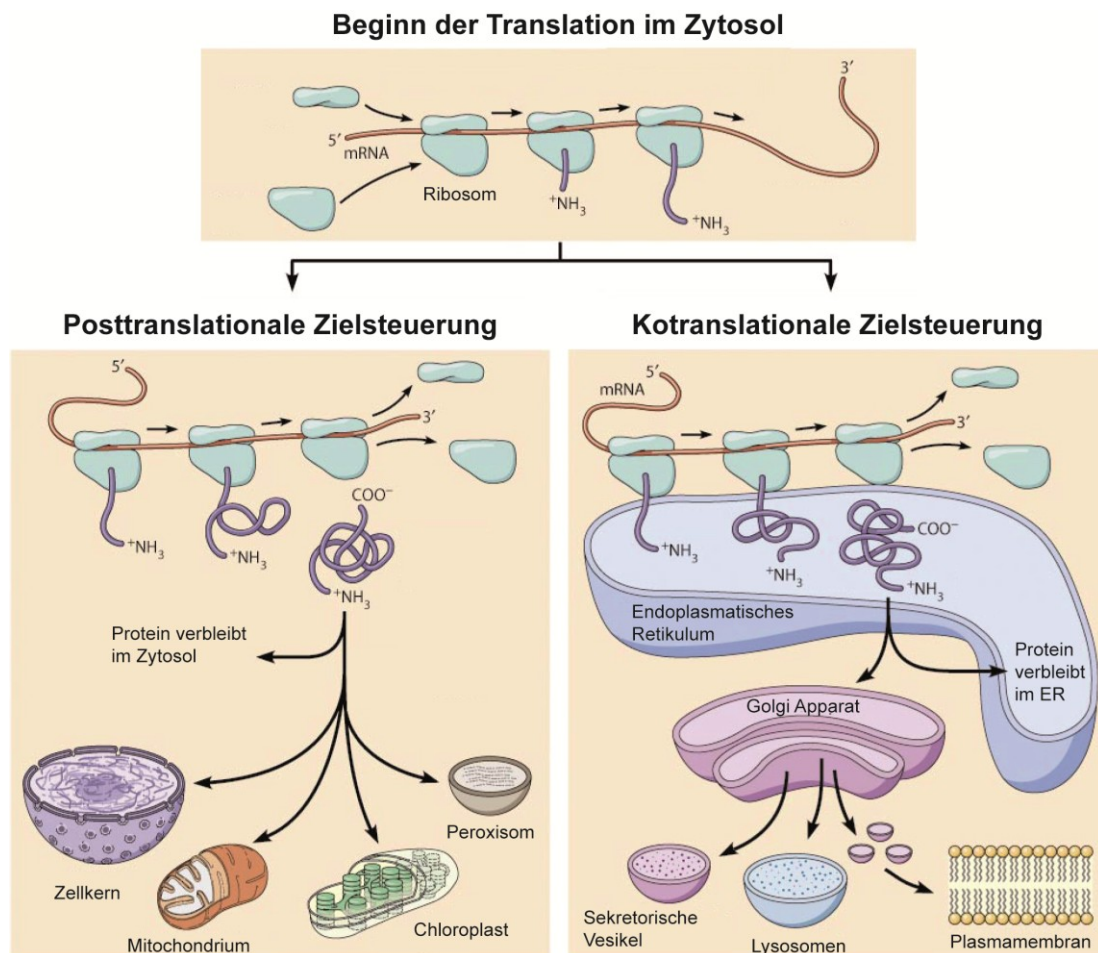
Bei Proteinen die im Zytosol synthetisiert werden teilt sich die Zielsteuerung initial in zwei Wege auf (Abb. 1):

Erstens können Proteine vollständig an freien Ribosomen synthetisiert werden, was die Freisetzung der Polypeptidkette ins Zytosol zur Folge hat. Auf diese Art werden zytosolische Proteine sowie Proteine des Zellkerns, der Peroxisomen und die meisten Proteine der Mitochondrien und Chloroplasten gebildet. Der Transport zu den genannten Zellkompartimenten erfolgt in diesem Fall nach der Proteinsynthese (Translation) und wird daher als **posttranslationale Zielsteuerung** bezeichnet.

Der zweite Weg zur Sortierung von Proteinen umfasst die Zielsteuerung der meisten sekretorischen Proteine. Dies sind Proteine, die sekretiert werden, oder Proteine, deren Bestimmungsort das Endoplasmatische Retikulum (ER), der Golgi Apparat,

der ERGIC (*ER-Golgi intermediate compartment*), die Lysosomen oder die Plasmamembran ist. Üblicherweise geht man davon aus, dass die Synthese sekretorischer Proteine an freien Ribosomen im Zytosol beginnt, die Translation des Proteins dann jedoch kurz unterbrochen wird und der Ribosom-Peptid-Komplex zur ER-Membran geleitet wird. An der ER-Membran setzt sich die Translation fort und die Proteine translozieren während ihrer Synthese ins ER-Lumen. Da in diesem Fall die Sortierung des Proteins während der Translation stattfindet, wird dieser Prozess als **kotranslationale Zielsteuerung** bezeichnet (1.1.4.2).

Darüberhinaus können sekretorische Proteine auch posttranslational zum ER geleitet werden (1.1.4.3). Außerdem ist beschrieben, dass sekretorische Proteine möglicherweise an ER-gebundenen Ribosomen translatiert werden und hierfür die mRNA zum ER geleitet wird (Potter & Nicchitta, 2000).



Modifiziert nach Pearson Education, Inc. 2009.

Abb. 1: Zelluläre Sortierung von Proteinen. Oben: Beginn der Translation. Die Synthese von nukleär kodierten Proteinen beginnt an freien Ribosomen im Zytosol. **Links: Posttranslationale Zielsteuerung.** Proteine des Zellkerns, der Mitochondrien, Chloroplasten (Pflanzen) oder Peroxisomen werden im Zytosol fertig translatiert und posttranslational zu den genannten Organellen geleitet. Zytosolische Proteine verbleiben im Zytosol. **Rechts: Kotranslationale Zielsteuerung.** Ribosomen, die sekretorische Proteine translatieren, werden zur ER-Membran geleitet, wo die Proteine kotranslational ins ER-Lumen translozieren. In Abhängigkeit von der Anwesenheit weiterer Steuerungssignale können die Proteine im ER verbleiben, zum Golgi-Apparat, den Lysosomen oder der Plasmamembran transportiert werden oder sekretiert werden.

Welche Zielsteuerung erfolgt, wird durch spezielle Sortierungssignale der Proteine vorgegeben, den sogenannten **Signalsequenzen** (Blobel & Dobberstein, 1975; Martoglio & Dobberstein, 1998; von Heijne, 1985). Nach Art des Zielkompartiments können folgende Signalsequenzen unterschieden werden:

- Kernlokalisierungssignale
- Peroxisomale Signalsequenzen
- Mitochondriale Signalsequenzen
- Signalsequenzen für den Import in Chloroplasten
- ER-Signalpeptide

Nur wenige Signalsequenzen sind invariable Aminosäuresequenzen, wie beispielsweise die peroxisomale Signalsequenz PTS-1 mit der Konsensussequenz *Serin-Lysin-Leucin* (Gould et al, 1989). Die meisten Signalsequenzen folgen sehr variablen Konsensussequenzen oder werden nur durch wiederkehrende Muster in Hydrophobizität, Polarität und/oder Helizität charakterisiert. Je nach Art der Signalsequenzen können diese stark in ihrer Länge variieren. Die Spanne reicht von kurzen Kernlokalisierungssignalen oder peroximalen Signalsequenzen mit nur 3-4 Aminosäuren (AS) bis zu Chloroplasten-Signalsequenzen mit bis zu ~70 AS. Die Länge der anderen Signalsequenz-Arten liegt meistens um die 20 - 30 AS (Emanuelsson et al, 2000). Grundsätzlich können Signalsequenzen innerhalb einer Polypeptidkette überall lokalisiert sein. Besonders häufig sind sie jedoch am N-Terminus des Proteins. Viele Signalsequenzen sind Teil des murens Proteins, andere wie beispielsweise ER- und Mitochondrien-Signalsequenzen, können während der Biosynthese entfernt werden. Zudem ist es möglich, dass ein Protein über mehr als eine Signalsequenz oder eine bivalente Signalsequenz verfügt.

1.1.2 Duale Zielsteuerung

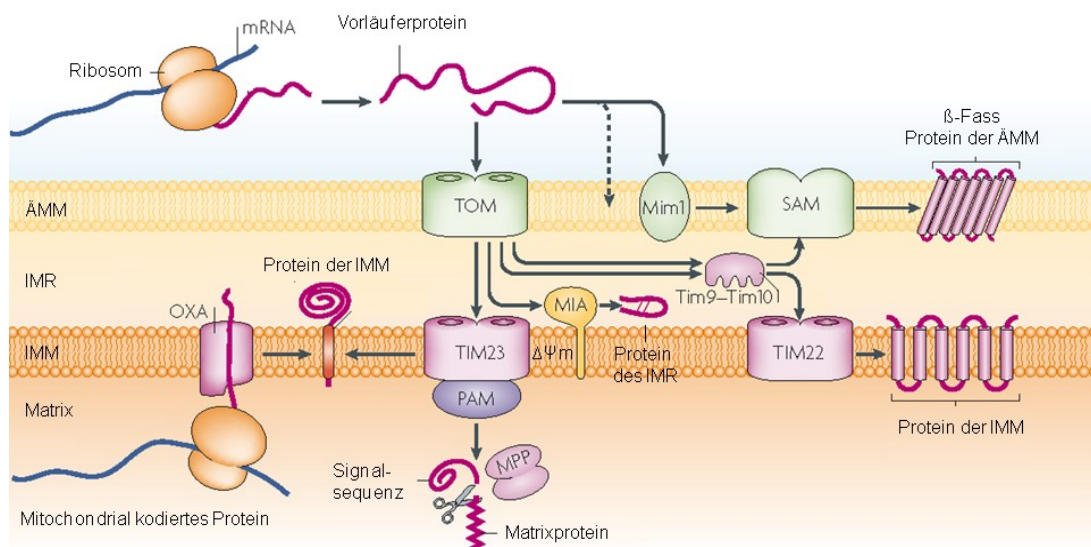
Wird ein Protein zu mehr als einem Zellkompartiment geleitet, spricht man von einer dualen Zielsteuerung (Danpure, 1995; Karniely & Pines, 2005; Small et al, 1998; Yogev & Pines, 2011). Eine multiple Proteinlokalisierung kann über sehr verschiedene Mechanismen vermittelt sein. Häufig wird sie durch verschiedene Gene, mehrere mRNAs eines Gens oder zwei Translationsstartpunkte einer mRNA vermittelt. Diese Möglichkeiten führen in der Regel zu einer Proteinform mit und einer ohne Signalsequenz. Wie oben erwähnt verbleiben Proteine ohne Signalsequenz im Zytosol. Proteine, die hingegen in zwei membranumschlossenen Zellkompartimenten lokalisiert sind, verfügen meist über zwei Signalsequenzen oder ein bivalentes Steuerungssignal. Diese Proteine benötigen üblicherweise Mechanismen zur Regulation der Zielsteuerungsrichtung. Beispiele hierfür sind: Proteinmodifikationen, die Bindung regulierender Interaktionspartner, eine proteolytische Prozessierung zur Freilegung einer alternativen Signalsequenz oder unterschiedliche Affinitäten zu verschiedenen Importrezeptoren (Karniely & Pines, 2005). Weiterführende Informationen zur dualen Zielsteuerung werden in Abschnitt 3.2.2 erläutert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein dualer Zielsteuerungsmechanismus charakterisiert, über den Proteine zum ER und zu den Mitochondrien geleitet werden können. Im Folgenden wird daher ein Überblick über die Signalsequenzen und Importmechanismen von ER- und Mitochondrien-Proteinen gegeben.

1.1.3 Zielsteuerung mitochondrialer Proteine

1.1.3.1 Mitochondriale Signalsequenzen und mitochondriale Importwege

Mitochondrien werden von einer Doppelmembran umschlossen. Hieraus ergibt sich, dass ein Protein in der äußeren Mitochondrienmembran (ÄMM), der inneren Mitochondrienmembran (IMM), im Intermembranraum (IMR) oder in der Matrix der Mitochondrien lokalisiert sein kann (Abb. 2).



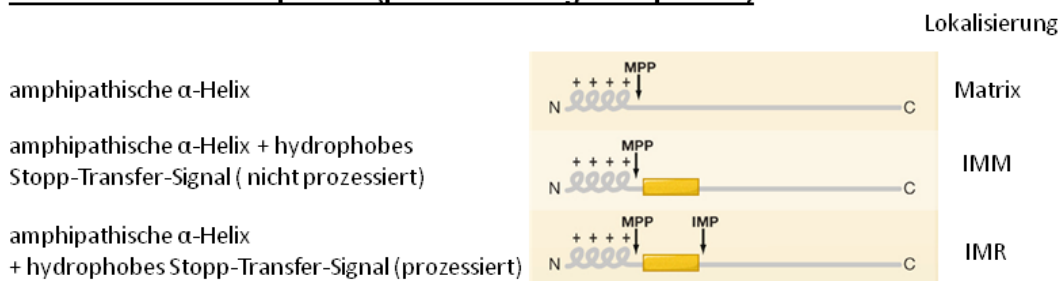
Modifiziert nach (Schmidt et al, 2010).

Abb. 2: Mitochondriale Import-Wege. Die meisten mitochondrialen Proteine sind nukleär kodiert, werden posttranslational zu den Mitochondrien geleitet und über den TOM (*translocase of the outer membrane*)-Komplex ins Mitochondrium importiert. Dort entscheidet die Art des Signalpeptids die weitere Zielsteuerung. Matrixproteine translozieren anschließend unter Mithilfe von PAM (*presequence translocase-associated motor*) durch den TIM (*translocase of the inner membrane*)23-Komplex ins Innere der Mitochondrien. Die N-terminale Präsequenz dieser Proteine kann durch die MPP (*mitochondrial-processing peptidase*) entfernt werden. Weist das Protein neben einer N-terminalen Präsequenz ein Stop-Transfer-Signal auf, verlässt es den TIM23-Komplex lateral und wird in die IMM (innere Mitochondrienmembran) inseriert. Kleine cysteininhaltige-Proteine können im IMR (Intermembranraum) durch Mia40 (*mitochondrial intermembrane space import and assembly*) oxidiert werden. Die dabei gebildeten Disulfidbrücken führen zur Faltung der Proteine und verhindern einen Rücktransport durch den TOM-Komplex. Hydrophobe Proteine im IMR werden durch die Chaperone Tim9 und Tim10 gebunden. β-Fass-Proteine der ÄMM (äußere Mitochondrienmembran) werden durch den SAM (*sorting and assembly*)

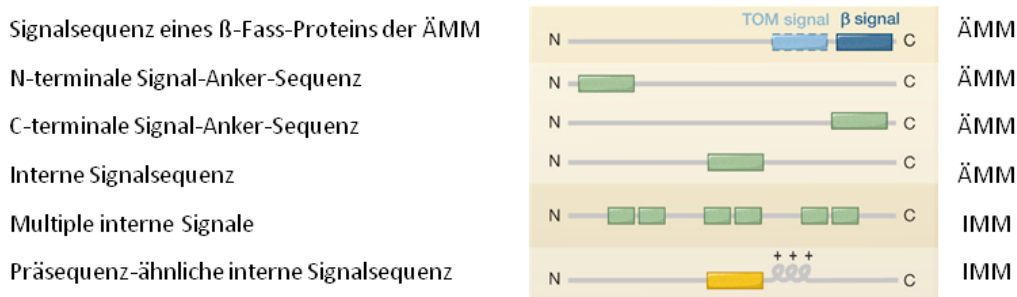
maschinery)-Komplex in die Membran integriert. Der TIM22-Komplex integriert Multitransmembran-Proteine in die IMM. Proteine mit hydrophoben, alpha-helikalen Signal-Anker-Proteinen werden nicht durch TOM importiert. Sie können durch Mim1 (*mitochondrial import 1*) und/oder SAM von außen in die ÄMM integriert werden. Proteine die im mitochondrialen Genom kodiert sind, werden kotranslational über die OXA(oxidase assembly machinery)-Maschinerie in die IMM integriert. $\Delta\Psi_m$ mitochondriales Membranpotential.

In Abhängigkeit von der intramitochondrialen Ziel-Lokalisierung weisen Proteine unterschiedliche Signalsequenzen auf. Abb. 3 zeigt eine Übersicht, mitochondrialer Steuerungssignale.

Mitochondriale Präsequenzen (prozessierte Signalsequenzen)



Nicht prozessierte interne Signalsequenzen



Interne Signalsequenz von Proteinen des IMR



Modifiziert nach (Chacinska et al, 2009).

Abb. 3: Mitochondriale Signalsequenzen. MPP (*mitochondrial-processing peptidase*), IMP (*inner membrane peptidase complex*), ÄMM (Äußere Mitochondrien-membran), IMR (Intermembranraum), IMM (Innere Mitochondrienmembran).

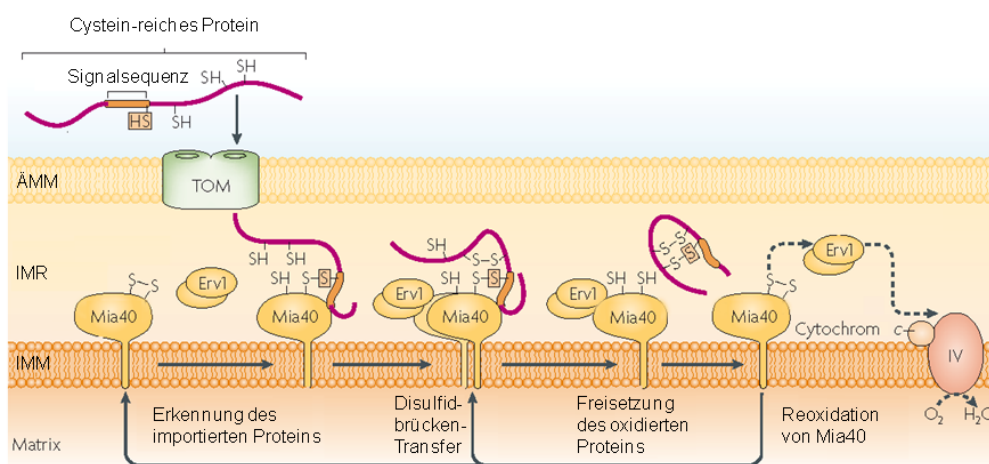
Die mitochondriale Proteine verfügen über sogenannte Präsequenzen. Diese N-terminalen Signalsequenzen leiten, sofern kein hydrophobes Stopp-Transfer-Signal nachfolgt, Proteine in die Mitochondrienmatrix (Hartl & Neupert, 1990; Neupert & Herrmann, 2007). In der Matrix werden Präsequenzen meist von der mitochondrialen Prozessierungspeptidase (MPP, *mitochondrial-processing peptidase*) entfernt (Gakh et al, 2002). Üblicherweise bestehen mitochondriale Präsequenzen aus 15 - 50 AS und bilden eine amphipathische alpha-Helix aus. Die amphipathische Helix wird dabei durch eine hydrophobe und eine positiv geladene Seite charakterisiert (Chacinska et al, 2009). Die Aminosäuresequenz von Präsequenzen folgt keiner Konsensussequenz und ist bei jedem Protein anders.

Proteine mit Präsequenzen werden über den Tom40-Tim23-Weg in die Mitochondrien importiert. Dabei wird zunächst die Präsequenz durch die Proteine Tom20 und Tom22 erkannt und dann das Protein, in einer entfalteten oder/und alpha-helikalen Konformation, durch den Tom40-Importkanal importiert (Saitoh et al, 2007; Schmidt et al, 2010; Yamano et al, 2008). Anschließend wird die Polypeptidkette entweder unter Mithilfe des PAM(*presequence translocase-associated motor*)-Komplexes durch den Tim23-Translokase-Komplex in die Matrix importiert oder, bei Anwesenheit eines Stopp-Transfer-Signals, lateral in die IMM integriert (Abb. 2) (Glick et al, 1992; Neupert & Herrmann, 2007; Schmidt et al, 2010). Einige Proteine mit Stopp-Transfer-Signalen werden nach Integration in die IMM durch die mitochondriale Innermembranpeptidase (IMP, *inner membrane peptidase complex*) prozessiert und dadurch in den IMR freigesetzt (Chacinska et al, 2009). Eine Besonderheit von Proteinen mit Präsequenzen ist, dass deren Translokation über die innere Membran durch das mitochondriale Membranpotential $\Delta\Psi_m$ angetrieben wird (Martin et al, 1991; Schleyer & Neupert, 1985).

Eine weitere Gruppe mitochondrialer Signalsequenzen sind interne Signalpeptide, die Teil der maturen Proteine sind. Diese noch weniger gut charakterisierten Steuerungssignale vermitteln meist die Zielsteuerung von Membranproteinen der ÄMM oder IMM. Hydrophobe Proteine mit internen Signalsequenzen werden ebenfalls durch den Tom40-Translokase-Komplex in die Mitochondrien importiert. Vom Intermembranraum aus können sie über den SAM(*sorting and assembly machinery*)-Komplex in die äußere Membran (Wiedemann et al, 2003) oder über den Tim22-Komplex in die innere Membran integriert werden. Proteine mit alpha-helikalen Signal-Anker-Sequenzen können ohne eine Translokation durch Tom40 in der ÄMM verankert werden. Eine detaillierte Beschreibung dieser

Zielsteuerungsprozesse findet sich beispielsweise in folgenden Quellen: (Chacinska et al, 2009; Neupert & Herrmann, 2007; Schmidt et al, 2010).

Vor einigen Jahren wurde ein neuer, ebenfalls über interne Signalsequenzen vermittelter Importmechanismus für Proteine des Intermembranraums beschrieben (Abb. 4)(Chacinska et al, 2004). Hierbei passieren Proteine, die meist ein geringes Molekulargewicht aufweisen, zunächst den Tom-Komplex und verbleiben anschließend aufgrund der Faltung des Proteins im Intermembranraum. Die Faltung der Proteine wird dabei durch die Ausbildung von Disulfidbrücken induziert. Dieser Prozess wird durch die beiden Proteine Mia40 und Erv1 vermittelt. Mia40 ist ein redoxregulierter Importrezeptor, der Proteine mit internen hydrophoben Signalsequenzen und Cysteinresten erkennt und anschließend Disulfidbrücken auf die importierten Proteine überträgt. Erv1 ist eine Sulfhydryl-Oxidase und dient der Reoxidation von Mia40. Der Elektronenfluss der oxidativen Faltung des importierten Proteins ist dabei wie folgt: importiertes Protein → Mia40 → Erv1 → Cytochrom C → Atmungskette (Abb. 4) (Herrmann & Kohl, 2007; Neupert & Herrmann, 2007; Schmidt et al, 2010).



Modifiziert nach (Schmidt et al, 2010).

Abb. 4: Import Cystein-haltiger Proteine in den Intermembranraum (IMR) der Mitochondrien. Kleine Cystein-haltige IMR-Proteine werden über den TOM-Komplex in den IMR importiert. Im IMR werden sie durch oxidiertes Mia40 erkannt. Durch Interaktion mit Mia40 werden die Sulfhydryl-Gruppen des importierten Proteins zu Disulfidbrücken oxidiert. Durch Ausbildung von Disulfidbrücken bleibt das Protein in einer stabil gefalteten Konformation und kann nicht ins Zytosol zurück. Mia40 wird durch die Erv1 Sulfhydryl-Oxidase reoxidiert. Erv1 katalysiert die *de novo*-Bildung von Disulfidbrücken und führt dadurch Mia40 in den bindungskompetenten Zustand zurück.

1.1.3.2 Kotranslationale Zielsteuerungen der Mitochondrien

Kotranslationale Insertionsprozesse sind an den Mitochondrien vorwiegend für Proteine, die durch das mitochondriale Genom kodiert sind, beschrieben. Rund 98 % aller mitochondrialer Proteine werden über das nukleäre Genom kodiert (Pfanner, 2000). Der Rest, vorwiegend Komponenten der Atmungskette, werden durch Gene der mitochondrialen DNA kodiert. Diese Membranproteine der IMM, werden an mitochondrialen Ribosomen translatiert und kotranslational durch die Oxa1-Importmaschinerie in die IMM inseriert (Abb. 2) (Ott & Herrmann, 2010).

Darüber hinaus könnte es sein, dass auch einige nukleär kodierte Proteine kotranslational in die Mitochondrien importiert werden (Ahmed et al, 2006; Ahmed & Fisher, 2009; Kellems et al, 1975; Lithgow, 2000; Verner, 1993). Diese Hypothese entstand durch die Beobachtung, dass Ribosomen sowie RNA an der Oberfläche von Mitochondrien lokalisiert sind. Den Autoren zufolge könnte es sein, dass vorwiegend kürzere Proteine ins Zytosol freigesetzt und posttranslational geleitet werden, lange Proteine hingegen samt dem Ribosom zur IMM transportiert und dann kotranslational importiert werden.

1.1.3.3 Zielsteuerung vom Zytosol zu den Mitochondrien

Die verschiedenen mitochondrialen Importwege sind in den letzten Jahrzehnten umfangreich charakterisiert worden. Ansatzweise ist dies oben dargelegt worden. Weit weniger ist hingegen über die Mechanismen der Zielsteuerung vom Zytosol zu den Mitochondrien bekannt. Üblicherweise wird angenommen, dass mitochondriale Proteine über zytosolische Steuerungsfaktoren zu den Mitochondrien geleitet werden (Chacinska et al, 2009). Die am besten charakterisierten Beispiele hierfür sind die molekularen Chaperone Hsp70 und Hsp90 sowie das Protein MSF (*mitochondrial import stimulating factor*) (Komiya et al, 1996; Young et al, 2003). Hsp70 und Hsp90 scheinen nach bisherigen Erkenntnissen vor allem für den Import bestimmter multitransmembran Proteine der IMM von Bedeutung zu sein. Die beiden Chaperone verhindern dabei einerseits eine Aggregation der hydrophoben Membranproteine im Zytosol, andererseits vermitteln sie durch eine Interaktion mit Tom70 den mitochondrialen Import. MSF scheint vorwiegend die mitochondriale Zielsteuerung von Proteinen mit einer N-terminalen Präsequenz zu vermitteln (Hachiya et al, 1994).

1.1.4 Zielsteuerung sekretorischer Proteine

1.1.4.1 ER-Signalpeptide und ER-Import Arten

Das Konzept, dass Proteine Sortierungssignale aufweisen, wurde erstmals 1971 mit der Signalthypothese von Günther Blobel formuliert. Diese postulierte, dass Sekretproteine eine N-terminale Erkennungssequenz tragen, die sie zu und durch die ER-Membran leiten (Blobel & Dobberstein, 1975). ER-Signalpeptide stellen daher die ersten beschriebenen Signalsequenzen dar. Mittlerweile weiß man, dass nicht nur Proteine, die sekretiert werden ER-Signalpeptide besitzen, sondern alle sekretorischen Proteine. Die sekundäre Zielsteuerung zur Lokalisierung im ER, im Golgi-Apparat oder in den Lysosomen erfolgt nach dem ER-Import über weitere Signalsequenzen der Proteine (Sonnhammer & Wolfsberg, 2001).

ER-Signalsequenzen können, N-terminal intern oder C-terminal lokalisiert sein (Abb. 5) (Alberts B, 2002; Borgese & Fasana, 2011; Lodish H, 2000). Viele ER-Signalsequenzen befinden sich am N-Terminus und werden beim Import der Polypeptidkette ins ER von der Signalpeptidase (SPase) entfernt (Dalbey & Von Heijne, 1992; Evans et al, 1986). N-terminale ER-Signalpeptide, die nicht prozessiert werden, sowie interne und C-terminale ER-Signalpeptide sind in der Regel hydrophobe Transmembrandomänen und inserieren sekretorische Proteine in der Membran. Je nach Lage dieser Signalsequenzen spricht man von N-terminalen Signal-Anker-Sequenzen, internen Signalsequenzen mit Stopp-Transfer-Eigenschaften oder C-terminalen Signal-Anker-Sequenzen (*Tail-Anchor*-Proteine).

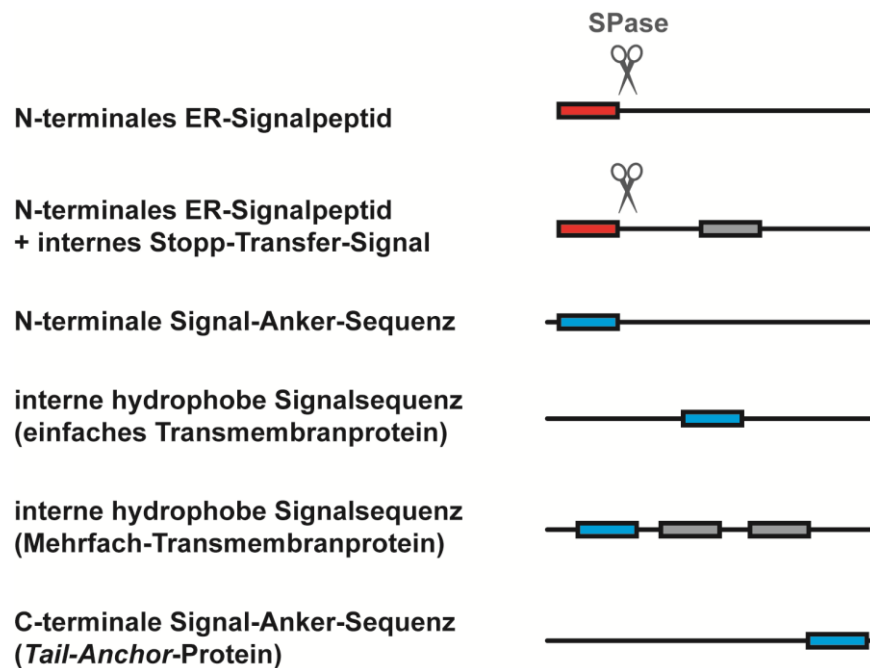


Abb. 5: Signalsequenzen sekretorischer Proteine. ER: Endoplasmatisches Retikulum, SPase: Signalpeptidase, Rot: Signalsequenzen, die durch die SPase entfernt werden, Blau: Hydrophobe Signalsequenzen, die Teil der murenen Proteine sind und Transmembrandomänen darstellen, Grau: Stopp-Transfer-Signale (Transmembran-domänen).

Die klassischen von *Günther Blobel* beschriebenen und im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten ER-Signalpeptide befinden sich am N-Terminus der Proteine und werden durch die Signalpeptidase prozessiert. Diese Signalsequenzen sind meist 15 - 30 Aminosäuren lang und werden durch einen typischen dreiteiligen Aufbau charakterisiert (von Heijne, 1985). Man unterscheidet eine basische N-terminale Domäne, eine oft helikale hydrophobe Mitteldomäne und eine polare ungeladene C-terminale Domäne (Abb 6). Letztere enthält häufig helix-brechende Proline oder Glycine. Am Ende der C-terminalen Region befindet sich die Schnittstelle der Signalpeptidase. Diese wird durch kleine apolare Aminosäuren an den Positionen -3 und -1 definiert (Martoglio & Dobberstein, 1998; von Heijne, 1983; von Heijne, 1990). Darüber hinaus weisen ER-Signalpeptide keine Sequenzhomologie auf. Aufgrund des konservierten Aufbaus sind sie aber dennoch zwischen verschiedenen Proteinen oder Spezies austauschbar (Muller et al, 1982; Talmadge et al, 1980).

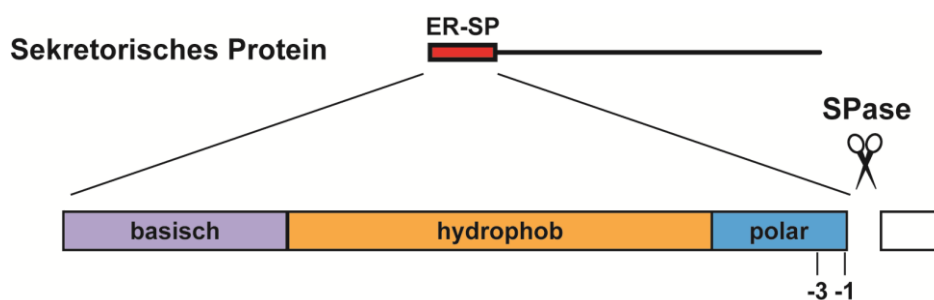


Abb. 6: Klassischer Aufbau eines sekretorischen Signalpeptids. ER: Endoplasmatisches Retikulum, ER-SP: ER-Signalpeptid, SPase: Signalpeptidase.

1.1.4.2 Kotranslationaler ER-Import

In Säugerzellen werden sekretorische Proteine mit N-terminalen und internen ER-Signalpeptiden vorwiegend kotranslational zum ER geleitet. Der genaue Ablauf dieser Zielsteuerung ist am Beispiel eines Proteins mit einem N-terminalen Signalpeptid nachfolgend erläutert und illustriert (Abb. 7):

Bei der kotranslationalen Zielsteuerung zum ER beginnt die Translation eines sekretorischen Proteins an einem freien Ribosom im Zytosol. Die naszierende Polypeptidkette befindet sich dabei zunächst im ribosomalen Austrittstunnel. Im Fall des eukaryotischen 80S Ribosoms ist dieser circa 80 - 100 Å lang und 10 - 20 Å breit (Bhushan et al, 2010). Die Breite des Kanals nimmt dabei in der zweiten Hälfte deutlich zu. Interessanterweise konnte nachgewiesen werden, dass sich im äußeren Bereich des ribosomalen Austrittstunnels bereits alpha-helikale Konformationen, wie beispielsweise die des Signalpeptids, ausbilden können (Bhushan et al, 2010; Fedyukina & Cavagnero, 2011). Sobald sich das Signalpeptid der Polypeptidkette außerhalb des Ribosoms befindet, wird es durch das Signalerkennungs-Partikel (SRP, *signal recognition particle*) erkannt. SRP ist ein zytosolisches Ribonukleoprotein, welches in Säugerzellen aus einem RNA-Grundgerüst und sechs assoziierten Polypeptiden besteht (Walter & Blobel, 1982). Das ER-Signalpeptid wird durch die SRP54-Untereinheit gebunden (Zopf et al, 1990). Zusätzlich bindet SRP über die sogenannte Alu-Domäne an das Ribosom und verlangsamt so die Translation der Polypeptidkette (Siegel & Walter, 1985; Strub & Walter, 1990; Terzi et al, 2004; Wild et al, 2004). Vermittelt durch SRP wird der Ribosom-Peptid-Komplex (RNC, *ribosome-nascent chain complex*) zum ER geleitet.

An der ER-Membran bindet SRP GTP-abhängig an dessen Rezeptor (SR). Anschließend wird der RNC zum Translokon geleitet, wo der SRP-SR-Komplex dissoziiert und die Proteinsynthese fortgesetzt wird (Rapoport, 2007; Wild et al, 2004; Zimmermann et al, 2011). Dieser erste Teil der kotranslationalen Translokation wird häufig als *Targeting*-Phase bezeichnet.

Am ER kommt es zu einem zweiten durch das ER-Signalpeptid vermittelten Prozess, der Öffnung des Translokankanal. Das eukaryotische Sec61-Translokon ist ein heterotrimeres Membranprotein, welches aus den Untereinheiten α , β und γ besteht (Van den Berg et al, 2004). Die Pore des Transmembrantunnels wird von der α -Untereinheit gebildet (Mothes et al, 1994). Dieser heterotrimere Aufbau ist hoch konserviert und leitet sich vom SecY-Komplex, dem Translokon von Bakterien und Archaeen ab. Für SecY konnte gezeigt werden, dass dessen Porengröße ebenfalls ausreicht, um alpha-helikale Proteindomänen im gefalteten Zustand in das ER zu importieren (Cannon et al, 2005; Gumbart & Schulten, 2006; Saparov et al, 2007; Tian & Andricioaei, 2006; Van den Berg et al, 2004). In Abwesenheit eines RNC-SRP-SR-Komplexes ist der Translokantunnel durch eine *Plug*-Domäne verschlossen (Van den Berg et al, 2004). Durch Interaktion des Ribosoms und des ER-Signalpeptids mit dem Translokon wird der Kanal jedoch geöffnet und die Polypeptidkette kann ins ER-Lumen translozieren. Für den Öffnungsprozess (*Gating*) bettet sich das ER-Signalpeptid seitlich im Translokankanal ein (Rapoport, 2007). Üblicherweise bindet das Signalpeptid dabei in einer Orientierung, bei der dessen N-terminales Ende zur zytosolischen Seite zeigt (Abb. 7). Hierdurch wird die Polypeptidkette als wachsende Schlaufe ins ER-Lumen importiert. Dies gewährleistet, dass die Schnittstelle des Signalpeptids auf der luminalen Seite des Translokons liegt und damit für die Signalpeptidase zugänglich ist. Gelingt diese Anordnung nicht, könnte dies dazu führen, dass das Protein nicht erfolgreich ins ER transloziert (Alken & Hegde). Als „Antriebskraft“ der kotranslationalen Protein-Translokation ins ER dient vor allem die fortlaufende Translation der Polypeptidkette. Durch die stetige Verlängerung der naszierenden Kette wird das Protein ins ER-Lumen hineingeschoben. Ist die Translation abgeschlossen, fällt diese Antriebskraft weg. Da eine Polypeptidkette im Translokankanal auch wieder retrograd in Richtung Zytosol zurück translozieren kann (Ooi & Weiss, 1992), gewährleisten dann vermutlich luminalen Hilfsproteine, wie möglicherweise Bip, dass das Protein vollständig ins ER transloziert (Zimmermann et al, 2011).

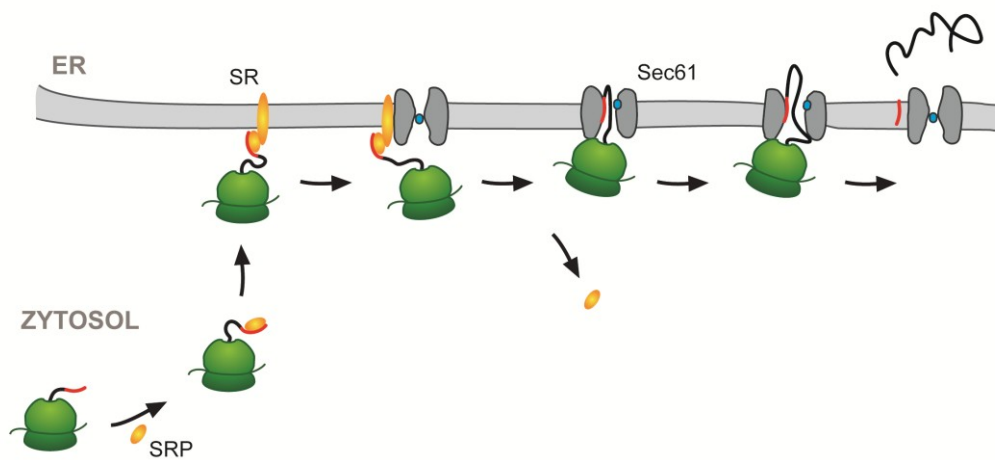


Abb. 7: Kotranslationaler Proteinimport ins Endoplasmatische Retikulum. Die Translation sekretorischer Proteine beginnt an freien Ribosomen im Zytosol. Nach Austritt des ER-Signalpeptids aus dem Ribosom-Exit-Tunnel wird dieses durch SRP erkannt. Die Bindung von SRP verlangsamt die Translation des Proteins. Vermittelt durch SRP wird der Ribosom-Peptid-Komplex zur ER-Membran transportiert. Dort interagiert zunächst SRP mit dessen Rezeptor (SR). Anschließend wird der Ribosom-Peptid-Komplex zum Sec61-Translokator geleitet. SRP wird wieder frei. Durch Interaktion der Signalsequenz und des Ribosoms mit Sec61 öffnet sich das Translokator. Die Translation wird fortgesetzt und das Protein wird während der weiteren Synthese ins ER importiert (kotranslationaler Import). Während der Translokation kann das Signalpeptid eines sekretorischen Proteins (rot) durch die Signalpeptidase entfernt werden. Nach der Translokation wird das Translokator wieder durch die sogenannte *Plug*-Domäne (blau) verschlossen. SRP: Signalerkennungs-Partikel, SRP-R: Rezeptor von SRP, Sec61: Translokator.

1.1.4.3 Posttranslatinaler ER-Import

Der posttranslationale ER-Import von Proteinen mit einem N-terminalen ER-Signalpeptid spielt vorwiegend in niederen Organismen, wie Bakterien und Hefen, eine Rolle. In diesen Organismen konnte gezeigt werden, dass die Art der ER-Translokation von der Hydrophobizität des ER-Signalpeptids abhängt (de Gier et al, 1998; Lee & Bernstein, 2001; Ng et al, 1996). Im Gegensatz zum Säuger-SRP, scheint SRP von Hefe- oder Bakterienzellen Signalpeptide unter einer bestimmten Hydrophobizität nicht mehr effizient zu erkennen. Proteine mit wenig hydrophoben Signalpeptiden werden daher in diesen Organismen vorwiegend über einen SRP-unabhängigen posttranslationalen Weg ins ER importiert.

Auch in Säugerzellen ist ein posttranslationaler ER-Import möglich. Bei sekretorischen Proteinen mit N-terminalen ER-Signalpeptiden bestimmt vermutlich vor allem die Länge der Polypeptidkette, ob ein Protein ko- oder posttranslational zum ER geleitet wird. Verschiedene *in vitro*-Studien konnten zeigen, dass sekretorische Proteine, die weniger als 75 Aminosäuren aufweisen, unabhängig von SRP posttranslational ins ER von Säugerzellen importiert werden (Schlenstedt et al, 1990; Schlenstedt et al, 1992; Schlenstedt & Zimmermann, 1987; Zimmermann et al, 2011; Zimmermann et al, 1990). Da diese Proteine wahrscheinlich aufgrund ihrer kurzen Länge ins Zytosol freigesetzt werden, bevor sie von SRP erkannt werden, scheinen sie über andere Mechanismen zur ER-Membran geleitet zu werden. Ein potentiell beteiligter Faktor ist das Chaperon Hsc70 (Wiech et al, 1987; Zimmermann et al, 1988). Außerdem wurden kürzlich TRC40 (Johnson et al, 2012) und Calmodulin (Shao & Hegde, 2011) als zytosolische Faktoren identifiziert, die kurze sekretorische Proteine binden und posttranslational zum ER leiten können. Diese Studien deuten zudem darauf hin, dass die posttranslationale Translokation kurzer Proteine durch das Sec61-Translokon erfolgt.

Ein weiteres Beispiel für eine posttranslationale Zielsteuerung ist die Zielsteuerung von Proteinen mit C-terminalen Signal-Anker-Sequenzen (*Tail-Anchor*-(TA)-Proteine). TA-Proteine kommen in Eukaryoten, Bakterien und Archaeen vor. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie über eine C-terminale Transmembrandomäne auf der zytosolischen Seite zellulärer Membranen verankert sind. Nicht alle TA-Proteine werden in der ER-Membran verankert. Einige sind mitochondriale Proteine der ÄMM (Kalbfleisch et al, 2007). Im Fall von sekretorischen TA-Proteinen befindet sich das ER-Signalpeptid als Transmembrandomäne am C-Terminus. Dies bedingt, dass die Proteine posttranslational zur ER-Membran geleitet werden müssen. Wie die Zielsteuerung von TA-Proteinen abläuft, ist noch nicht genau bekannt. Derzeit gibt es Hinweise auf verschiedene Zielsteuerungsmechanismen (zusammengefasst in (Borgese & Fasana, 2011)). In Säugerzellen konnte gezeigt werden, dass sekretorische TA-Proteine durch das oben bereits erwähnte Protein TRC40 gebunden und zur ER-Membran geleitet werden (Stefanovic & Hegde, 2007). Die Interaktion mit TRC40 kann dabei durch Hilfsproteine des Bat3-Komplexes vermittelt sein. Bat3 scheint TA-Proteine bereits am Ribosom zu binden und diese anschließend zu TRC40 zu leiten (Mariappan et al, 2010).

1.2 Qualitätskontrollmechanismen des ERs

Der ER-Import sekretorischer Proteine unterliegt verschiedenen Kontrollmechanismen. Der bekannteste ist die sogenannte ER-assoziierte Degradierung (ERAD).

1.2.1 ERAD

Sekretorische Proteine werden während und nach ihrer Translokation ins ER vielfältig modifiziert und gefaltet. Proteinmodifikationen sind beispielsweise die Glykosylierung von Proteinen durch die Oligosaccharyl-Transferase (OST) (Silberstein & Gilmore, 1996) oder die Ausbildung von Disulfidbrücken. Diese Proteinmodifikationen tragen zur Faltung der Proteine bei. Unterstützt wird die Proteinfaltung zudem durch verschiedene Chaperone, Co-Chaperone und Faltungsenzyme des ERs, wie beispielsweise Bip oder die Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) (Gilbert, 1997; Zimmermann et al, 2011). Fehlgefaltete Proteine sind für die Zelle potentiell schädlich und werden durch die Qualitätskontrolle des ERs erkannt und einer proteasomalen Degradierung zugeführt. Bei den dabei ablaufenden Mechanismen sind 4 Schritte unterscheidbar: 1. die Erkennung fehlerhafter Proteine, 2. die Zurückhaltung der Proteine im ER, 3. der Rücktransport ins Zytosol und 4. der proteasomale Abbau. Wie die Erkennung fehlerhafter Proteine abläuft ist noch nicht vollständig aufgedeckt. In Eukaryoten ist diesbezüglich vor allem die Erkennung von fehlgefalteten Glykoproteinen im sogenannten Calnexin/Calretikulin-Zyklus charakterisiert (Caramelo & Parodi, 2008; Helenius, 1994). Bei diesem werden Proteine während ihrer Glykosylierung unter anderem durch die Lektine Calnexin und Calretikulin so lange im ER zurückgehalten, bis sie korrekt gefaltet sind. Gelingt keine korrekte Faltung, werden die Proteine ins Zytosol zurückgeleitet. Wie dies funktioniert, ist noch nicht endgültig geklärt. Es wird vermutet, dass fehlgefaltete Glykoproteine unter anderem durch die Mithilfe der ER α -Mannosidase I sowie bestimmter EDEM(*ER degradation-enhancing -mannosidase-like*)-Proteine erkannt und zu einer noch nicht identifizierten retrograden Translokationspore transportiert werden (Ruddock & Molinari, 2006). Diese könnte das Sec61 Translokon sein (Pilon et al, 1997; Plemper et al, 1997; Zhou & Schekman, 1999). Im Zytosol werden die fehlgefalteten Proteine anschließend deglykosyliert, polyubiquitinyliert und durch das Proteasom abgebaut (Vembar & Brodsky, 2008).

1.2.2 Die „Antwort auf ungefaltete Proteine“

Reicht der Abbau fehlgefalteter Proteine nicht aus und es kommt zur Akkumulation von Proteinen im ER, wird die sogenannte *unfolded protein response* (UPR, Antwort auf ungefaltete Proteine) eingeleitet. Die UPR ist eine komplexe zelluläre ER-Stress-Reaktion, die auf drei Säulen beruht. Erstens wird die Proteinsynthese und die Translokation ins ER reduziert. Damit wird primär die Faltungsmaschinerie des ERs entlastet. Zweitens kommt es zu einer transkriptionellen Hochregulation von Proteinen die an der Erkennung und Degradierung fehlgefalteter Proteine beteiligt sind. Hierdurch soll dem ER ermöglicht werden der erhöhten Menge fehlgefalteter Proteine Herr zu werden. Drittens, falls es nicht gelingt eine normale zelluläre Funktionalität wieder herzustellen, wird über die UPR die Apoptose der Zelle eingeleitet (Ron & Walter, 2007).

1.2.3 Die kotranslationale Qualitätskontrolle

Vor einigen Jahren wurde ein weiterer stressinduzierter Kontrollmechanismus beschrieben, der ebenfalls zur verminderten Translokation von Proteinen ins ER führt, die sogenannte kotranslationale Qualitätskontrolle (kQK, *pre-emptive quality control* oder *cotranslational degradation*) (Kang et al, 2006; Oyadomari et al, 2006). Bei der kQK werden neusynthetisierte Proteine während der Translokation ins ER am Import gehindert und einer proteasomalen Degradierung zugeführt. Da die so ins Zytosol umgeleiteten sekretorischen Proteine ein ungeschnittenes ER-Signalpeptid aufweisen, können sie experimentell von ERAD-Substraten unterschieden werden (Abb. 8). Die molekularen Mechanismen der kQK sind noch weitgehend unbekannt. Verschiedenen Untersuchungen deuten darauf hin, dass das Protein p58^{IPK}, welches auch während der UPR induziert wird, eine zentrale Rolle in diesem Prozess spielt (Miesbauer et al, 2009; Oyadomari et al, 2006). Einer Studie zufolge bindet p58^{IPK} naszierende Proteinketten an der zytosolischen Seite des Sec61-Translokons und initiiert über eine Interaktion mit Hsp70 die proteasomale Degradierung der Proteine (Oyadomari et al, 2006). Zwei andere Studie wiederum deutet darauf hin, dass p58^{IPK} primär im ER-Lumen lokalisiert ist und dort als Chaperon von Bedeutung ist (Petrova et al, 2008; Rutkowski et al, 2007). Es könnte also auch sein, dass p58^{IPK} nur indirekt die Translokation von Proteinen moduliert. Interessanterweise wird die kQK durch Merkmale der naszierenden Proteinkette beeinflusst. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt

werden, dass p58^{IPK} bevorzugt den Import von Proteinen mit einem schwachen ER-Signalpeptid (Kang et al, 2006) oder einer ausgedehnten unstrukturierten N-terminalen Domäne (Miesbauer et al, 2009) hemmt. Diese Studien verdeutlichen, dass die kQK nicht jedes Protein gleichermaßen an der ER-Translokation hindert. Offenbar scheint die kQK ein Mechanismus zu sein, durch welchen der Protein-Import ins ER selektiv reguliert werden kann.

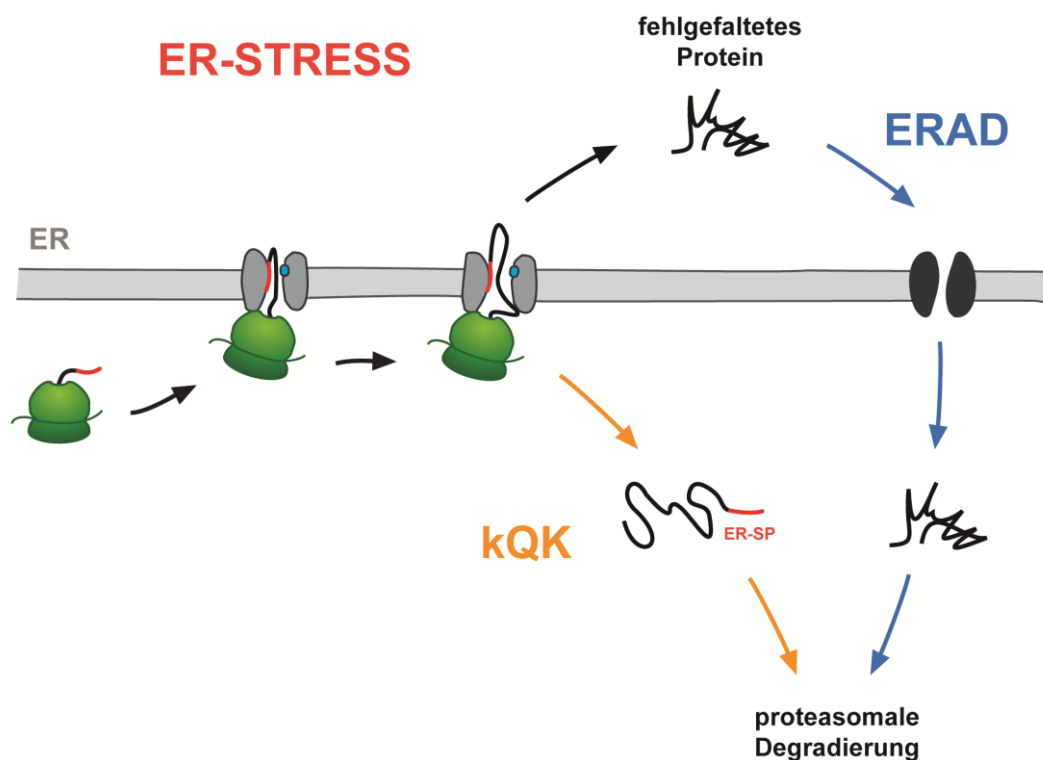
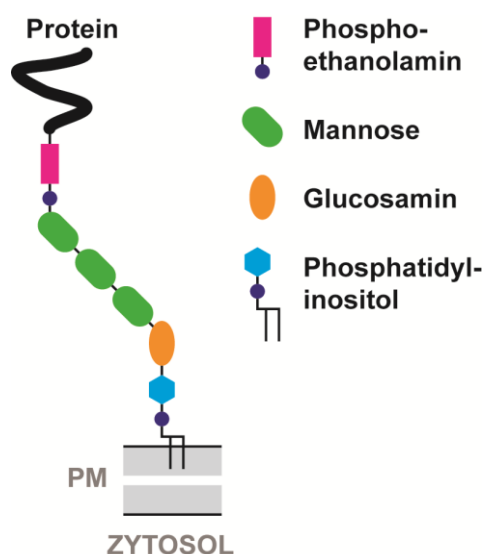


Abb. 8: Gegenüberstellung der ko- und posttranslationalen Qualitätskontrolle des Endoplasmatischen Retikulums (ER). ER-assozierte Degradation (ERAD, blau): Proteine, die nach der Translokation ins ER nicht korrekt falten werden durch die ERAD-Maschinerie erkannt, ins Zytosol zurück geleitet und dort proteasomal degradiert. Kotranslationale Qualitätskontrolle (kQK, orange): Bei der kQK werden Proteine während ihrer Translokation am ER-Import gehindert und einer proteasomalen Degradierung im Zytosol zugeführt. Sowohl ERAD wie auch kQK werden durch ER-Stress induziert. Bei Proteinen mit prozessierten Signalpeptiden sind ERAD- und kQK-Substrate durch die An- beziehungsweise Abwesenheit des Signalpeptids unterscheidbar.

1.3 GPI-verankerte Proteine

Wie bereits erläutert worden ist, können sekretorische Proteine über Transmembrandomänen in der Membran verankert oder eingebettet sein. Eine weitere Möglichkeit einer Membranverankerung stellt ein Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker dar. Die Kernstruktur eines GPI-Ankers ist in Abbildung 9 gezeigt. GPI-Anker sind immer C-terminal lokalisiert und verankern Proteine extrazellulär in der äußeren Lipidschicht der Plasmamembran. In Eukaryoten sind circa 10 - 20 % der sekretorischen Membranproteine GPI-verankert (Orlean & Menon, 2007). GPI-verankerte Proteine können verschiedene Funktionen erfüllen, besonders häufig sind es Oberflächenrezeptoren oder Zelladhäsionsmoleküle. Viele GPI-verankerte Proteine sind in sogenannten *lipid rafts* (Lipid-Flöße) lokalisiert. *Lipid rafts* sind bewegliche Mikrodomänen der Plasmamembran, die sich durch einen hohen Anteil an Cholesterol und Sphingolipiden auszeichnen. Es wird vermutet, dass *Lipid rafts* vorwiegend als Organisationszentren für Signaltransduktions- und Transportprozesse dienen (Brown & London, 1998; Helms & Zurzolo, 2004; Simons & Toomre, 2000). Die GPI-Verankerung stellt eine posttranslationale Proteinmodifikation dar. Proteine, die für eine GPI-Verankerung vorgesehen sind, tragen zwei Signalsequenzen. Ein N-terminales ER-Signalpeptid und eine C-terminale GPI-Anker-Präsequenz. Beide Signalsequenzen werden im ER entfernt und sind nicht Teil des maturen Proteins. Die ER-Signalsequenz wird kotranslational von der Signalpeptidase prozessiert. Die GPI-Signalsequenz wird posttranslational von der GPI-Transamidase entfernt und



durch einen vorgefertigten GPI-Anker ersetzt (Amthauer et al, 1993; Orlean & Menon, 2007). GPI-Signalsequenzen weisen wie ER-Signalsequenzen keine konservierte Aminosäuresequenz auf, sondern werden durch einen typischen Aufbau charakterisiert (Abb. 10).

Abbildung 9: Aufbau des Grundgerüsts eines Glycosylphosphatidylinositol-Ankers.

PM: Plasmamembran

Die carboxyterminale Aminosäure der Polypeptidkette, auf die der GPI-Anker übertragen wird, wird als ω -Position (ω -site) bezeichnet. N-terminal von der ω -Position lokalisierte Aminosäuren werden mit ω -minus, C-terminale mit ω -plus umschrieben. Man unterscheidet vier Regionen (Abb.10): Region 1 umfasst in etwa die Positionen ω -1 bis ω -10 und stellt eine flexible, polare Übergangsdomäne dar. In Region 2 liegt die ω -Aminosäure (typischerweise G, A, S, N, D oder C) sowie die stark restriktierte ω -2 Position (typischerweise G, A oder S). Region 3 ist ein schwach polares Verbindungstück, welches meist 3 bis 9 Aminosäuren lang ist. Region 4 stellt eine hydrophobe Abschlussdomäne dar, die unterschiedlich lang sein kann. (Eisenhaber et al, 2003; Orlean & Menon, 2007)

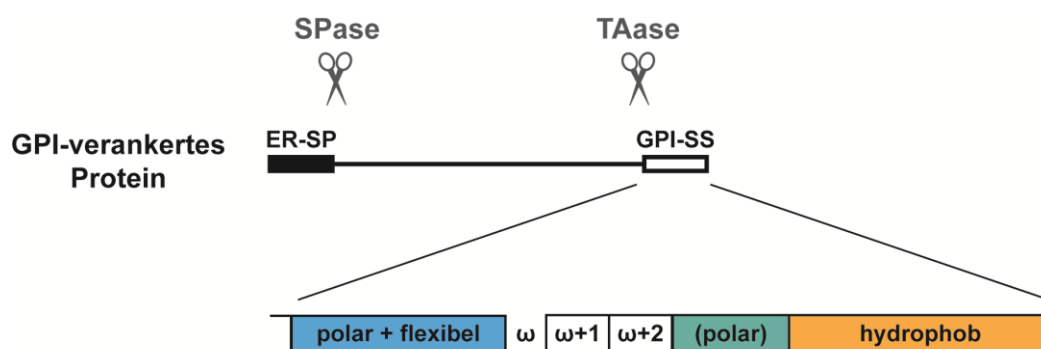


Abb. 10: Aufbau einer GPI-Signalsequenz. ER: Endoplasmatisches Retikulum, ER-SP: ER-Signalpeptid, SPase: Signalpeptidase, GPI: Glycosylphosphatidylinositol SS: Signalsequenz, ω : letzte Aminosäure des murens Proteins, an welche der GPI-Anker kovalent angehängt wird.

Üblicherweise geht man davon aus, dass GPI-Anker-Proteine kotranslational ins ER importiert werden und bis zur C-terminalen GPI-Signalsequenz ins ER translozieren (Orlean & Menon, 2007). Möglicherweise wird die hydrophobe Abschlussdomäne bei der Translokation in die ER-Membran integriert und verankert so das Protein auf der luminalen Seite der ER-Membran. Es könnte aber auch sein, dass Proteine mit einer GPI-Signalsequenz vollständig ins ER translozieren (Dalley & Bulleid, 2003). Im ER wird die GPI-Signalsequenz von der membranständigen GPI-Transamidase entfernt und ein vorgefertigter GPI-Anker kovalent an die ω -Aminosäure gebunden. Durch vesikuläre Transportprozesse werden die so verankerten Proteine anschließend bis zur Plasmamembran geleitet, wobei die Glykane und Lipide des GPI-Ankers modifiziert werden können.

1.4 Proteinstruktur und intrinsisch unstrukturierte Proteine

In dieser Arbeit wird sich zeigen, dass die Sekundärstruktur von sekretorischen Proteinen deren Zielsteuerung beeinflusst und dass eine GPI-Signalsequenz den ER-Import unstrukturierter Proteine moduliert. Er soll daher kurz auf die Struktur von Proteinen und die Bedeutung unstrukturierter Proteine eingegangen werden.

Proteine sind lange Aminosäureketten, welche sich in stabilen räumlichen Strukturen (Konformationen) anordnen können. Bei der Beschreibung von Proteinkonformationen unterscheidet man 4 Stufen: Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur (Alberts B, 2002). Die Abfolge der Aminosäuren wird als Primärstruktur bezeichnet. Unter Sekundärstruktur versteht man die Ausbildung einer stabilen räumlichen Anordnung der Polypeptidkette innerhalb lokaler Bereiche des Proteins. Dies können beispielsweise alpha-helikale Untereinheiten oder β -Faltblattstrukturen sein. Die räumliche Anordnung der verschiedenen Untereinheiten einer Polypeptidkette ist die sogenannte Tertiärstruktur. Bei Proteinkomplexen, die aus mehreren Polypeptidketten aufgebaut sind, benennt man zusätzlich die Anordnung der Untereinheiten zueinander als Quartärstruktur. Die Stabilisierung der Konformation erfolgt je nach Stufe, über hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken, ionische Bindungen und/oder Disulfidbrücken. Grundsätzlich können sich Proteine, angetrieben durch die genannten intramolekularen Wechselwirkungen, aus sich selbst heraus falten (Anfinsen, 1973). Häufig erfolgt dieser Prozess jedoch unter Mithilfe weiterer Proteine, wie Chaperone oder Faltungsenzyme (Hartl & Hayer-Hartl, 2009; Hebert & Molinari, 2007).

In der Regel sind Proteine nicht mehr funktionell, wenn die räumliche Anordnung, beispielsweise durch Erhitzen, zerstört wird. Lange Zeit ging man daher davon aus, dass die Funktion eines Proteins die Ausbildung einer stabilen räumlichen Struktur voraussetzt. Heute weiß man jedoch, dass viele Proteine ungefaltet ihre Funktion erfüllen (Dyson & Wright, 2005; Tompa, 2002). Schätzungsweise besitzen mindestens ein Drittel aller eukaryotischen Proteine eine oder mehrere lange ungefaltete Domänen (> 50 Aminosäuren) und 10 - 25 % aller Proteine scheinen vollständig ungefaltet zu sein (Chouard, 2011; Dunker et al, 2001; Tompa, 2002; Uversky & Dunker, 2010). Proteine, die unter physiologischen Bedingungen *in vitro* keine stabile Sekundärstruktur und/oder Tertiärstruktur aufweisen werden als intrinsisch unstrukturierte Proteine (IUPs; *intrinsically unstructured proteins*,

intrinsically disordered proteins oder *natively unfolded proteins*) bezeichnet (Uversky et al, 2008). Unstrukturierte Polypeptidketten zeichnen sich durch wenig voluminös hydrophobe und viele polare und geladene Aminosäuren aus. Darüber hinaus weisen ungefaltete Domänen häufig eine geringe Komplexität und/oder Wiederholungen in der Aminosäureabfolge auf (Dyson & Wright, 2005). Die Identifizierung IUPs erfolgt entweder, basierend auf den genannten Proteinmerkmalen, über Vorhersageprogramme (Ferron et al, 2006) oder experimentell, wobei der Goldstandard dabei die NMR-Spektroskopie ist (Dyson & Wright, 2001). IUPs können verschiedene Funktionen ausüben. Besonders häufig sind sie an der Zellteilung, Transkription, Translation und Signalweiterleitung beteiligt oder dienen als molekulare Chaperone (Das & Mukhopadhyay, 2011; Dyson & Wright, 2001). Dabei können IUPs entweder in einem ungeordneten Zustand bleiben oder, induziert durch die Bindung an ein anderes Protein, Struktur annehmen (*coupled folding and binding*) (Chouard, 2011; Dyson & Wright, 2001). Die Fähigkeit bindungsinduziert zu falten ermöglicht einigen IUPs über unterschiedliche Konformationen viele verschiedene Proteine zu binden (Uversky, 2011).

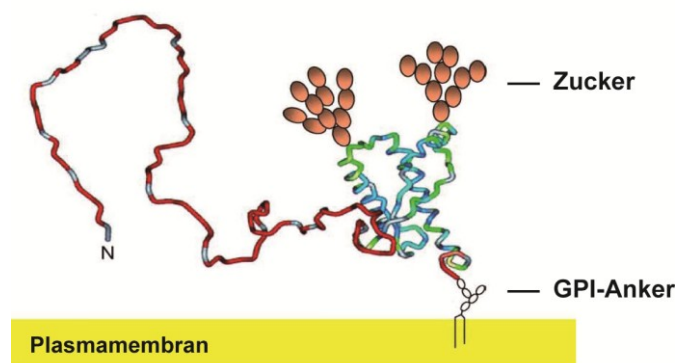
Einige IUPs spielen außerdem eine Rolle bei verschiedenen humanen Erkrankungen wie Krebs, kardiovaskulären oder neurodegenerativen Erkrankungen (Babu et al, 2011; Iakoucheva et al, 2002; Uversky, 2010; Uversky, 2011). Beispielsweise verfügt das Protein p53, welches an der Entstehung vieler Krebsarten beteiligt ist, über ausgedehnte ungeordnete Bereiche (Chouard, 2011; Oldfield et al, 2008). Im Bereich neurodegenerativer Erkrankungen, wie Parkinson, Alzheimer oder Prion Erkrankungen, ist gezeigt worden, dass assoziierte IUPs wie α -Synuclein, Tau oder PrP fehlfallen und aggregieren können (Prusiner et al, 1983; Skrabana et al, 2006; Uversky, 2010).

1.5 Die analysierten Proteine

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Zielsteuerung sekretorischer Proteine erfolgten am Beispiel verschiedener neuronaler Proteine sowie chimärer Modellproteine. Die vier analysierten Wildtyp-Proteine werden im Folgenden kurz vorgestellt:

1.5.1 Das Prion-Protein

Das zelluläre Prion-Protein (PrP oder PrP^c) ist ein hochkonserviertes Protein, das in Amphibien, Reptilien, Vögeln und Säugern vorkommt. Im Menschen wird PrP durch das *PRNP*-Gen auf Chromosom 20 kodiert. Murines PrP, welches in dieser Arbeit analysiert worden ist, ist in der Maus auf Chromosom 2 kodiert (Oesch et al, 1985; Sparkes et al, 1986). Die Expression von PrP erstreckt sich auf fast alle Gewebe, wobei PrP vorrangig von Neuronen und Gliazellen des Zentralen Nervensystems exprimiert wird (Kretzschmar et al, 1986; Linden et al, 2008; Molerés & Velayos, 2005). Matures PrP befindet sich an der Zelloberfläche und ist über einen GPI-Anker in der äußeren Lipidschicht der Plasmamembran verankert (Abb. 11). Als sekretorisches Protein wird PrP in Form eines Vorläuferproteins translatiert. Dieses ist beim Menschen 253 Aminosäuren (AS) und in der Maus 254 AS lang. Die nachfolgend verwendeten AS-Nummerierungen beziehen sich auf murines PrP.



Modifiziert nach (Pinheiro, 2006)

Abb. 11: Schematische Darstellung des muren Prion-Proteins an der Zelloberfläche. Rot: intrinsisch unstrukturierte N-terminale Domäne, Blau/Grün: globulär gefaltete C-terminale Domäne. Braun: Zuckerketten.

In seiner immaturren Form verfügt PrP über zwei Signalsequenzen (Abb. 12), ein N-terminales ER-Signalpeptid (AS 1 - 22) und ein C-terminales GPI-Signalpeptid (AS 231 – 254). Beide Signalpeptide werden im ER entfernt, wo die GPI-Signalsequenz durch einen GPI-Anker ersetzt wird. Während der Maturierung von PrP erfolgen weitere Modifikationen. Dies sind die komplexe Glykosylierung der Asparagine N180 und N196 und die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen C178 und C213. Eine Besonderheit von PrP ist dessen modularer Aufbau. NMR-Analysen des Proteins zeigten, dass matures PrP in einen flexiblen ungefalteten N-terminalen Bereich (AS 23 - 120) sowie einen globulär gefalteten C-terminalen Bereich (AS 121- 231) unterteilt ist (Riek et al, 1997; Wuthrich & Riek, 2001). Der strukturierte Teil kann sich selbständig falten und weist drei alpha-helikale Domänen sowie zwei kurze β -Stränge, die eine antiparallele Faltblattstruktur ausbilden, auf. Die oben erwähnte Disulfidbrücke verbindet Helix 2 und 3. Im intrinsisch unstrukturierten N-terminalen Bereich befinden sich zwei charakteristische Domänen von PrP. Die hochkonservierte *Oktarepeat*(OR)-Domäne, welche eine fünffache Wiederholung der Aminosäuresequenz P(H/Q)GGGWGQ umfasst, sowie die hydrophobe Domäne (HD).

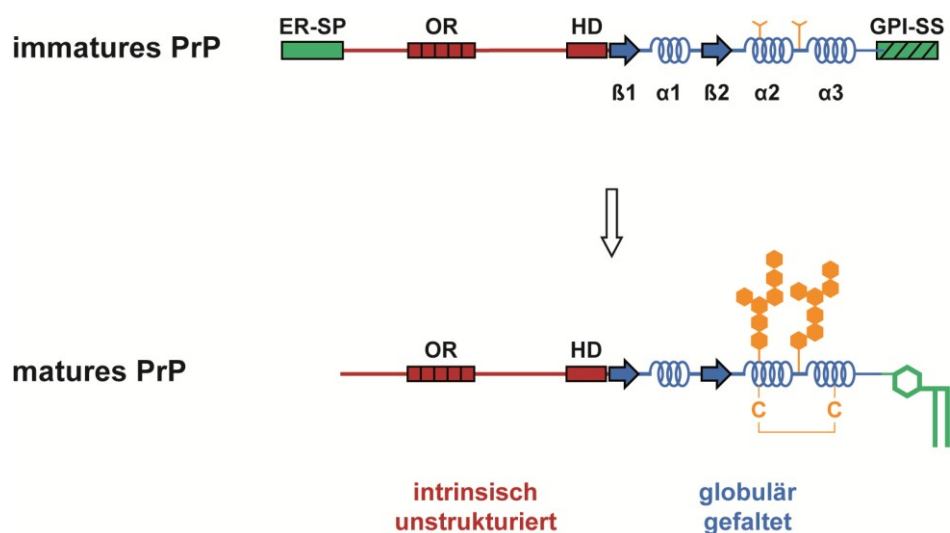


Abb. 12: Maturierung von PrP im sekretorischen Weg. ER-SP: ER-Signalpeptid, OR: *Oktarepeat*-Domäne, HD: Hydrophobe Domäne, GPI-SS: GPI-Signalsequenz, α : alpha-helikale Domäne, β -Faltblatt-Domäne, C-C: Disulfidbrücke, Y: Glykosylierungsstelle, orange Sechsecke: Zuckerreste, grün (matures PrP): stilisierter GPI-Anker.

Die physiologische Funktion von PrP ist nicht bekannt. Untersuchungen von *Knockout*-Mäusen offenbarten nur milde Phänotypen wie beispielsweise einen veränderten zirkadianen Rhythmus, verminderte Angstlevel, Anomalitäten der Myelinisierung oder Veränderungen von elektrophysiologischen Parametern und der synaptischen Funktionalität (Bremer et al, 2010; Collinge et al, 1994; Linden et al, 2008; Nico et al, 2005; Tobler et al, 1996; Vassallo & Herms, 2003). Die normale Entwicklung PrP-defizienter Mäuse zeigte vor allem, dass PrP physiologisch nicht essentiell zu sein scheint (Büeler et al, 1992; Mallucci et al, 2003; Mallucci et al, 2002; Manson et al, 1994). Gemäß den bis heute am besten dokumentierten potentiellen Funktionen könnte PrP als stressprotektives, signaltransduzierendes und Kupfer-bindendes Protein von zellulärer Bedeutung sein. PrP erwies sich als protektiv gegenüber ischämischer, oxidativen und exzitatorischen Stressbedingungen (Haigh & Brown, 2006; McLennan et al, 2004; Rambold et al, 2008; Rangel et al, 2007; Sakthivelu et al, 2011; Shyu et al, 2002; Watt et al, 2005). Bemerkenswerterweise ist die Anwesenheit der intrinsisch unstrukturierten N-terminalen Domäne von PrP essentiell für dessen neuroprotektive Aktivität (Mitteregger et al, 2007; Rambold et al, 2008; Sakthivelu et al, 2011). Da intrinsisch unstrukturierte Domänen häufig der Interaktion mit anderen Proteinen dienen (Tompa et al, 2009), könnte es sein, dass PrP als Oberflächenrezeptor über seinen flexiblen ungefalteten Teil einen oder mehrere, noch nicht identifizierte Faktoren bindet. Auf diese Art könnte PrP auch als signalübertragendes Protein für verschiedene extrazelluläre Interaktionspartner dienen. Bereits bekannt ist, dass PrP über mehrere Histidine der unstrukturierten Domäne Kupferionen bindet. Hieraus entstand die Vermutung, dass PrP im Kupferstoffwechsel eine Rolle spielt. Da PrP verstärkt an der präsynaptischen Membran lokalisiert ist und PrP-defiziente Mäuse reduzierte synaptosomale Kupferkonzentrationen aufweisen, könnte PrP beispielsweise der Wiederaufnahme von freigesetzten Kupferionen dienen (Collinge et al, 1994; Fournier et al, 1995; Herms et al, 1999; Kramer et al, 2001; Kretschmar et al, 2000). Kupfer könnte zudem die Konformation des intrinsisch unstrukturierten Bereichs von PrP modulieren und so die Bindung zu anderen Proteinen modifizieren. Beispielsweise deuten kürzlich veröffentlichte Untersuchungen darauf hin, dass die Bindung von Kupfer-Ionen an PrP dessen Interaktion mit dem NMDA-Rezeptor moduliert (Stys et al, 2012; You et al, 2012).

Am bekanntesten ist PrP aufgrund seiner pathophysiologischen Bedeutung. PrP liegt in seiner physiologischen Form in der oben erläuterten Struktur vor. Unter pathophysiologischen Bedingungen kommt es jedoch zur Umfaltung des Proteins in eine β -faltblattreiche Konformation, die man PrP-Scrapie (PrP^{Sc}) nennt. PrP^{Sc} zeichnet sich dadurch aus, dass es Detergenz-unlösliche, teilweise PK-resistente, infektiöse Aggregate ausbildet. Stanley Prusiner bezeichnete diese PrP^{Sc}-haltigen Partikel 1982, als die Proteinkomponente dieses Krankheitsaggregats noch gar nicht bekannt war, als **Prion** (*proteinaceous infectious particle*) (Prusiner, 1982). Später wurde das zugrundeliegende Protein daher Prion-Protein und die assoziierten Erkrankungen Prion-Erkrankungen genannt. Der Zusatz „Scrapie“ leitet sich von der ersten entdeckten Prion-Erkrankung namens Scrapie ab. Scrapie ist eine Erkrankung von Schafen und wurde erstmals vor über 200 Jahren von Hirten in Großbritannien beschrieben (McGowan, 1922). Da ein auffälliges Symptom der Erkrankung das Kratzen des Fells (*to scrape*, kratzen) ist, wurde die Krankheit dementsprechend benannt. Prion-Erkrankungen kommen beim Mensch und Tier vor und sind bislang immer tödlich verlaufende neurodegenerative Erkrankungen. Charakteristische neuropathologische Veränderungen sind vor allem eine spongiforme Vakuolisierung von Gehirngewebe, astrozytäre Gliose und/oder die Ablagerung von amyloiden PrP-Aggregaten im Gehirn (Glatzel & Aguzzi, 2001). Die heute wahrscheinlich bekanntesten Prion-Erkrankungen sind die BSE-Erkrankung beim Rind und die humanen Creutzfeldt-Jakob-Erkrankungen. Da die meisten Prion-Erkrankungen infektiös sind, werden sie auch „Transmissible spongiforme Enzephalopathien“ (TSE) genannt. Die Infektiösität stellt dabei eine einzigartige Eigenschaft innerhalb der neurodegenerativen Erkrankungen dar. Die meisten Prion-Erkrankungen sind mit der spontanen Konformationsänderung von PrP in PrP^{Sc} assoziiert. Einige sind jedoch auch auf Mutationen des PrP-Gens zurückzuführen.

Bemerkenswerterweise entwickelt das eigentlich neuroprotektive sekretorische Protein PrP bei einer zytosolischen Fehllokalisierung eine neurotoxische Aktivität (Ma & Lindquist, 2002; Rambold et al, 2006; Wang et al, 2009). Dies scheint beispielsweise bei der humanen Prion-Erkrankung Gerstmann–Sträussler–Scheinker Syndrom (GSS) eine Rolle zu spielen. Für zwei mit GSS assoziierte Stopp-Mutanten von PrP konnte gezeigt werden, dass diese nicht mehr effizient ins ER translozieren, infolgedessen im Zytosol fehllokalisiert sind und dort über eine

Interaktion mit Bcl-2 Apoptose induzieren (Heske et al, 2004; Miesbauer et al, 2009; Rambold et al, 2006). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass eine fehlerhafte Zielsteuerung von PrP an der Pathogenese verschiedener Prion-Erkrankungen beteiligt sein könnte.

1.5.2 Shadoo

Shadoo (Sho) gehört zur sogenannten PrP-Familie, zu der neben Sho noch das Protein Doppel zählt (Watts & Westaway, 2007; Westaway et al, 2011). Sho ist ein hochkonserviertes Protein, welches in Fisch-, Amphibien- und Säugerarten vorkommt. Im Menschen wird Sho durch das *SPRN*-Gen auf Chromosom 10 kodiert. Expressionsanalysen deuten darauf hin, dass sich die Synthese von Sho auf Zellen des zentralen Nervensystems beschränkt (Watts & Westaway, 2007). Der Name Shadoo (japanisch für Schatten) bezeichnet die Ähnlichkeiten zu PrP. Sho ist, wie PrP, ein Glykoprotein, welches über einen GPI-Anker extrazellulär in der Plasmamembran verankert ist. Humanes Sho wird als 151 AS langes Vorläuferprotein synthetisiert. Wie PrP verfügt es über ein N-terminales ER-Signalpeptid (AS 1 - 24) und eine C-terminale GPI-Signalsequenz (AS 127 - 151). Weitere Gemeinsamkeiten beider Proteine sind eine N-terminale Region, in der sich positiv geladene Aminosäuren wiederholen, eine zentrale hydrophobe Domäne (HD) und (mindestens) eine C-terminalen Glykosylierungsstelle (Abb. 13). Die basische *Tetrarepeat*(TR)-Domäne von Sho, die mit der OR-Domäne von PrP vergleichbar ist, zeichnet sich durch Wiederholung der Aminosäuren Arginin (R) und Glycin (G) aus. Die repetitive Konsensussequenz ist dabei XXRG. Ursprünglich entdeckt wurde Sho während einer Datenbank-Analyse (Premzl et al, 2003). Hier zeigte sich, dass die HD von Sho eine hochkonservierte Sequenzhomologie zur HD von PrP aufweist. Dementsprechend wurde das neu identifizierte Gen „*shadow of the prion protein*“ (*SPRN*) genannt. Ein weiteres Merkmal von Sho ist dessen strukturelle Ähnlichkeit zur N-terminalen Region von PrP. Strukturanalysen mittels CD(*circular dichroism*)-Spektroskopie von rekombinanten Maus-Sho offenbarten, dass der gesamte mature Teil von murinem Sho (AS 25-122) keine stabile Sekundärstruktur aufweist. Aufgrund der konservierten Sequenz von Sho ist es sehr wahrscheinlich, dass auch der mature Teil von humanen Sho, welches in dieser Arbeit analysiert worden ist, intrinsisch unstrukturiert ist.

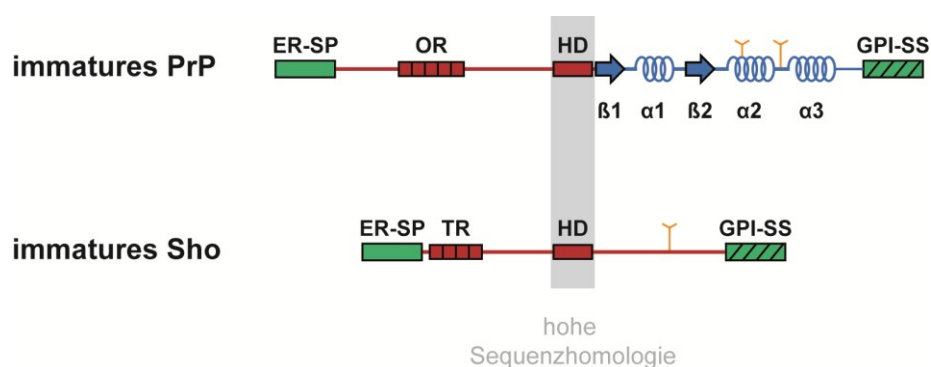


Abb. 13: Gegenüberstellung von immatrem PrP und immatrem Sho. ER-SP: ER-Signalpeptid, OR: *Oktarepeat*-Domäne, TR: *Tetrarepeat*-Domäne, HD: Hydrophobe Domäne, GPI-SS: GPI-Signalsequenz, α : alpha-helikale Domäne, β -Faltblatt-Domäne, Y: Glykosylierungsstelle.

Die physiologische Funktion von Sho ist noch nicht bekannt, da Sho^{0/0}- sowie Sho^{0/0}/PrP^{0/0}-Mäuse keine auffälligen Phänotypen zeigen (Büeler et al, 1992; Daude et al, 2012). Es gibt Hinweise, dass Sho in der frühen Embryogenese oder, aufgrund der konservierten RGG-Box in der TR-Domäne, als RNA-bindendes Protein von Bedeutung ist (Corley & Gready, 2008; Young et al, 2009). Da Sho, wie PrP, als GPI-verankertes Protein in *Lipid rafts* der Zelloberfläche lokalisiert ist, wäre es auch denkbar, dass Sho ein Signal-transduzierendes Protein ist. Die strukturellen Gemeinsamkeiten zwischen Sho und PrP könnten zudem darauf hinweisen, dass beide Proteine ähnliche Funktionen erfüllen. In der Tat weist Sho, wie PrP, eine neuroprotektive Wirkung auf. Vor einigen Jahren wurde publiziert, dass Sho protektiv gegenüber neurotoxischen Konstrukten, wie beispielsweise PrP Δ HD, ist (Watts et al, 2007). Außerdem zeigte unsere Gruppe kürzlich, dass die Expression von Sho Zellen gegen die Exzitotoxizität von Glutamat schützen kann (Sakthivelu et al, 2011). Gleichzeitig konnte dargelegt werden, dass sowohl bei Sho wie auch bei PrP, die stressprotektive Wirkung von der Anwesenheit einer N-terminalen Region abhängt. Konstrukte, bei denen N-terminale Sequenzabschnitte um die TR-beziehungsweise OR-Domäne deletiert worden waren, zeigten einen signifikant reduzierten protektiven Effekt. Zudem war ein chimäres PrP-Konstrukt mit einer N-terminalen Domäne von Sho (AS 1-63 von Sho + AS 89 – 251 von PrP) vergleichbar stressprotektiv wie Wildtyp-PrP.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die intrinsisch unstrukturierte Domäne von Sho beziehungsweise PrP essentiell für die stressprotektive Wirkung der Proteine ist.

1.5.3 Somatostatin

Somatostatin ist ein Peptidhormon, welches als längeres Vorläuferprotein, dem sogenannten Prä-Pro-Somatostatin (Som), synthetisiert wird. Im Menschen befindet sich das Gen von Somatostatin auf Chromosom 3 (Naylor et al, 1983). Humanes Som ist 116 AS lang und untergliedert sich in ein N-terminales ER-Signalpeptid (AS 1 – 24), eine nachfolgende Prodomäne (AS 25 - 88) und eine C-terminale Peptidomäne (AS 89 - 116) (Abb. 14). Das ER-Signalpeptid sowie die Prodomäne werden nach der ER-Translokation des Proteins entfernt. Das Präfix „Prä“ bezeichnet dabei die Proteinform mit ungeschnittenem ER-Signalpeptid. Das Präfix „Pro“ verweist auf die Anwesenheit der Prodomäne. Über die Struktur des Vorläuferproteins Som ist bislang nur wenig bekannt. Gemäß Vorhersagen ist Som, ähnlich wie PrP, modular aufgebaut. Für die Prodomäne von Som wird eine alpha-helikale Konformation vorhergesagt, die Peptidomäne hingegen soll intrinsisch unstrukturiert sein (*JPred*-Vorhersage). Somatostatin ist in zwei Formen biologisch aktiv, Somatostatin-14 und Somatostatin-28 (Barnett, 2003; Dasgupta, 2004; Patel & Galanopoulou, 1995). Beide Isoformen werden während des sekretorischen Weges durch proteolytische Prozessierung der unstrukturierten Peptidomäne gebildet und nachfolgend sekretiert (Galanopoulou et al, 1993). Durch Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen C105 und C116 können beide Isoformen in einer zyklischen Konformation vorliegen. Vor kurzem wurde entdeckt, dass auch in der Prodomäne von Som ein hormonell aktives Peptid kodiert ist. Dieses wurde Neuronostatin genannt und scheint ebenfalls in unterschiedlichen Längen gebildet zu werden (Samson et al, 2008). Über die Funktion von Neuronostatin ist bislang wenig bekannt. Es wird postuliert, dass es in der Regulation von neuronalen Migrationsprozessen, Blutdruck, Nahrungsaufnahme und Trinkverhalten eine Rolle spielt (Samson et al, 2008).

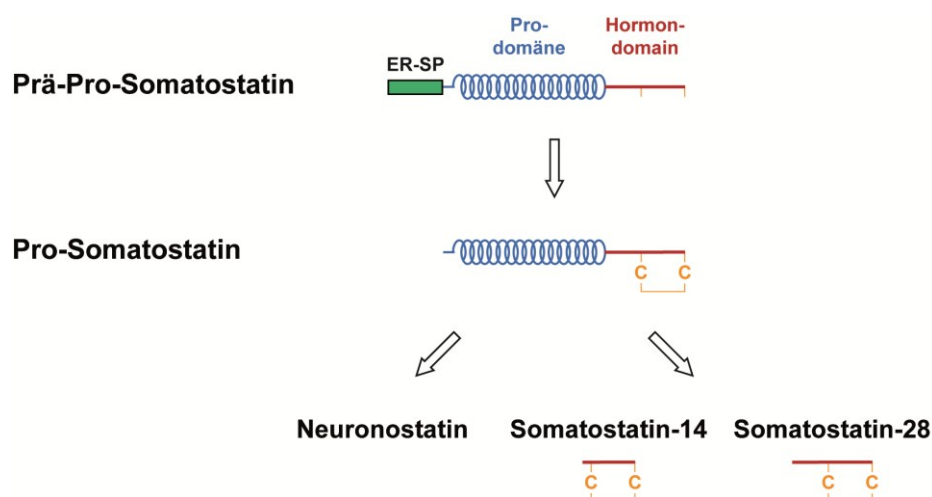


Abb. 14: Biosynthese von Somatostatin und Neuronostatin.

ER-SP: ER-Signalpeptid, C–C: Disulfidbrücke.

Von den hier beschriebenen Proteinen ist die physiologische Funktion von Somatostatin am besten charakterisiert. Somatostatin wurde erstmals 1973 aus dem Hypothalamus von Schafen isoliert und dabei als Gegenspieler des humanen Wachstumshormons Somatotropin (GH, *growth hormone*) identifiziert (Brazeau et al, 1973). Nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass Som ubiquitär exprimiert wird und, neben Zellen des Hypothalamus, vorwiegend im Gastrointestinaltrakt (GIT) synthetisiert wird. Im GIT wird Somatostatin, neben Magen- und Darmzellen, vor allem von D-Zellen des Pankreas sekretiert. Den beiden Somatostatin-Isoformen stehen sechs verschiedene G-Protein gekoppelte Somatostatin-Rezeptoren gegenüber (Barnett, 2003). Über diese vermittelt Somatostatin eine Vielzahl verschiedener Funktionen. Vereinfacht kann man Somatostatin dabei als eine Art „Universalhemmstoff“ beschreiben. Somatostatin hemmt nicht nur die Freisetzung von GH sondern auch von mehreren anderen Hormonen wie beispielsweise Gastrin, Motilin, Insulin oder Glucagon. Zudem hemmt Somatostatin die Peristaltik des GITs, die Magensäuresekretion und die Sekretion von Pankreasenzymen (Barnett, 2003). Ausgehend von seinen physiologischen Funktionen ist Somatostatin auch als Arzneistoff von Bedeutung. Da endogenes Somatostatin jedoch nur eine sehr kurze Plasmahalbwertszeit hat, wird es meistens durch synthetische Analoga wie Octreotid ersetzt. Indikationen, bei denen Somatostatin oder Somatostatin-Analoga eingesetzt werden, sind beispielsweise akute Blutungen im GIT, Akromegalie oder neuroendokrine Tumore (Dasgupta, 2004).

Pathophysiologisch spielt Som hauptsächlich indirekt eine Rolle. Beispielsweise gibt es bösartige Tumore, welche Somatostatin in hohen Mengen ausschütten, sogenannte Somatostatine (Ganda et al, 1977). Andererseits wurde berichtet, dass es aufgrund einer Infektion mit *Helicobacter pylori* zu einer Abnahme von gastrointestinalem Somatostatin kommen kann (Calam, 1998; Odum et al, 1994). Auch in neurodegenerativen Erkrankungen, wie die Alzheimer- oder Parkinson-Krankheit, wurde immer wieder eine Beteiligung von Somatostatin untersucht (Burgos-Ramos et al, 2008; Epelbaum et al, 1983; Shiraishi et al, 2010; Tundo et al, 2012). Derzeitig stehen hier jedoch andere Pathomechanismen im Fokus der Forschung.

1.5.4 Das Amyloid-Vorläuferprotein

Ein zentrales Merkmal der Alzheimer-Erkrankung ist das Auftreten von extrazellulären Ablagerungen der Amyloid- β -Peptide (Braak et al, 1996). Amyloid- β -Peptide entstehen durch proteolytische Prozessierung des Amyloid-Vorläuferproteins (APP, *Amyloid precursor protein*). APP ist ein integrales Membranprotein, welches hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert ist. Es wird ubiquitär exprimiert, wobei die höchste Expression im Gehirn vorliegt (Tran, 2011; Zheng & Koo, 2006). Im Menschen ist das Gen für APP auf Chromosom 21 lokalisiert. Durch alternatives Spleißen der mRNA von APP entstehen verschiedene Proteinisoformen, die zwischen 365 und 770 AS lang sein können. Die wichtigsten Isoformen sind APP770, APP751, APP695. Abhängig von der Art des Gewebes werden diese unterschiedlich stark exprimiert. Beispielsweise dominiert APP751 in nicht-neuronalen Geweben, wohingegen APP695 die vorherrschende Form in neuronalen Zellen ist (Wertkin et al, 1993). Nachfolgende AS-Nummerierungen beziehen sich auf APP770.

Das primäre Translationsprodukt von APP verfügt über ein N-terminales ER-Signalpeptid (AS 1-17), welches von der Signalpeptidase entfernt wird. Weitere Modifikationen von APP innerhalb des sekretorischen Weges sind N- und O-Glykosylierungen, Phosphorylierungen und Sulfatierungen (De Strooper & Annaert, 2000; Weidemann et al, 1989). Darüber hinaus kann APP an mehreren Stellen Disulfidbrücken ausbilden (Dahms et al, 2010; Multhaup et al, 1998). APP ist ein

Typ-1-Membranprotein, dessen Transmembrandomäne (TM) die AS 700 – 723 umfasst. Aufgrund der weit am C-Terminus liegenden TM weist APP eine lange extrazelluläre Domäne (Ektodomäne; AS 18 – 699) und eine kurze intrazelluläre Domäne (AS 724 – 770) auf (Abb. 15). Die Sekundärstruktur von APP ist aufgrund seiner Länge äußerst komplex. Eine Bestimmung der kompletten Kristallstruktur von Vollängen-APP war bislang nicht möglich. Das Wissen um die Faltung von APP beschränkt sich daher auf Untersuchungen isolierter Teilstrukturen. Generell weisen die charakterisierten Subdomänen von APP hohe Anteile alpha-helikaler und/oder β -faltblattreicher Konformationen auf. Eine genauere Beschreibung der Strukturanalysen von APP findet sich beispielsweise in folgenden Referenzen: (Barnham et al, 2003; Dulubova et al, 2004; Reinhard et al, 2005; Rossjohn et al, 1999; Wang & Ha, 2004).

APP wird über den sekretorischen Weg in der Plasmamembran integriert. Dort kann das Protein über Clathrin-vermittelte Endozytose wieder internalisiert werden und entweder lysosomal abgebaut oder über endosomales *Recycling* wieder zur Plasmamembran transportiert werden (Golde et al, 1992; Haass et al, 1992; Koo & Squazzo, 1994; Vetrivel & Thinakaran, 2006). Während dieser Transportprozesse wird Vollängen-APP durch verschiedene Proteasen gespalten. Man unterscheidet dabei vor allem die Prozessierung durch die α -, β - und/oder γ -Sekretase (Haass & Steiner, 2002; O'Brien & Wong, 2011; Zheng & Koo, 2006). Alle drei Proteasen schneiden im Bereich der sogenannten Amyloid- β -Region (A β -Region) von APP (Abb. 15). Nach Art der proteolytischen Prozessierung von APP unterscheidet man zwei Wege, den amyloidogener und den anti-amyloidogener Weg. Ersterer bedeutet, dass APP zunächst durch die β -Sekretase und anschließend durch die γ -Sekretase gespalten wird. Dies führt zur Freisetzung verschieden langer A β -Peptide. Die wichtigsten sind A β 42 und A β 40, da sie die Hauptschnittprodukte sind und maßgeblich an der Entstehung der Alzheimer-Erkrankung beteiligt sind (Querfurth & LaFerla, 2010). A β -Peptide sind einerseits neurotoxisch, andererseits aggregieren sie extrazellulär in sogenannten senilen Plaques. Letztere werden zusammen mit weiteren histopathologischen Kennzeichen zur *post mortem* Diagnose der Alzheimer-Erkrankung herangezogen. Im anti-amyloidogenen Weg hingegen wird APP zunächst durch die α -Sekretase und anschließend durch die γ -Sekretase gespalten. Da die α -Sekretase innerhalb der A β -Region schneidet, entstehen keine neurotoxischen Peptide. Eines der derzeitigen Hauptziele der

Alzheimer-Forschung ist es daher, Therapieansätze zu finden, über die der amyloidogene-Weg unterdrückt werden kann (Thorsett & Latimer, 2000).

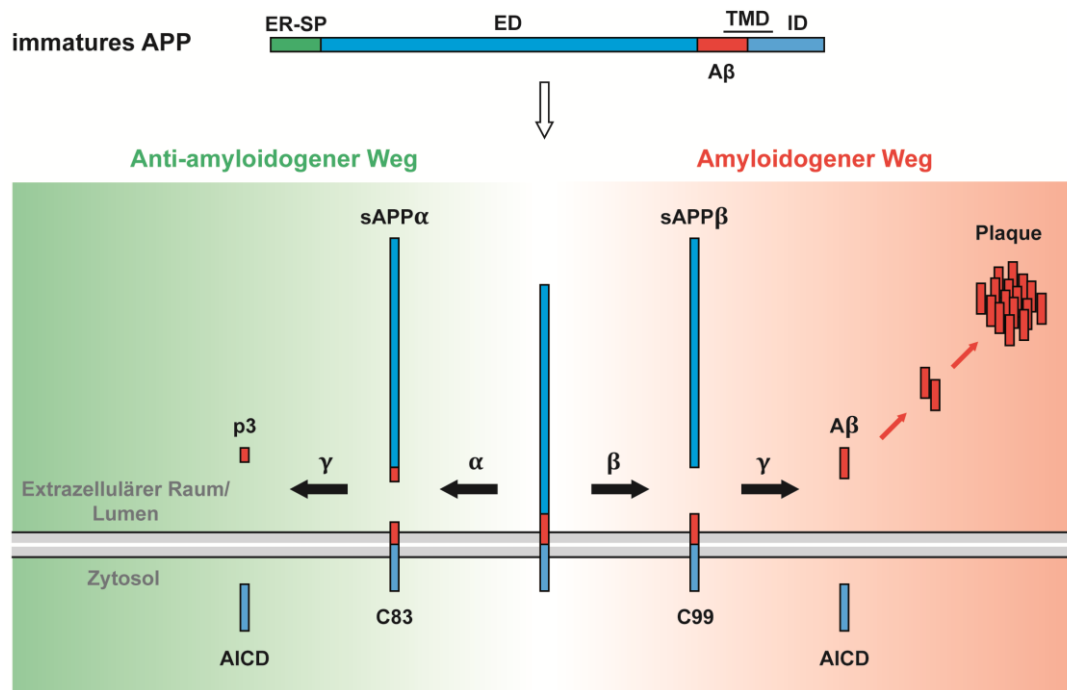


Abb. 15: Schematische Darstellung von APP und dessen proteolytischer Prozessierung. ER-SP: ER-Signalpeptid, ED: Ektodomäne, TMD: Transmembrandomäne, ID: intrazelluläre Domäne, Aβ: Amyloid-β-Peptid (Domäne), α: α-Sekretase, β: β-Sekretase, γ: γ-Sekretase, sAPPα/sAPPβ: lösliche extrazelluläre Spaltprodukte, AICD: intrazelluläre C-terminale Domäne, p3: extrazelluläres Spaltprodukt des anti-amyloidogenen Wegs.

Obwohl APP als Vorläufer Protein der toxischen Aβ-Peptide umfangreich charakterisiert worden ist, ist immer noch unklar, welche physiologische Funktion es erfüllt (O'Brien & Wong, 2011). APP könnte beispielsweise an der Ausbildung von Synapsen beteiligt sein (Priller et al, 2006). Zudem ist nicht auszuschließen, dass vor allem die Spaltprodukte von APP funktional aktiv sind (Turner et al, 2003).

Eine weitere Unklarheit ist die Rolle von unprozessiertem APP in der Pathogenese von Alzheimer. Einige Veröffentlichungen deuten darauf hin, dass nicht nur die Aβ-Peptide pathogen sind, sondern auch Vollängen-APP ein toxisches Agens darstellen könnte. Beispielsweise wurde beobachtet, dass APP in Gehirnen von Alzheimer-Patienten an den Mitochondrien akkumuliert und zu einer Schädigung der Mitochondrien führt (Anandatheerthavarada et al, 2003; Devi et al, 2006; Lin & Beal, 2006). Ähnliches ist auch für Aβ beschrieben. Verschiedenen Gruppen zufolge wird

A β zu den Mitochondrien geleitet und induziert Störungen der mitochondrialen Funktionalität (Casley et al, 2002; Lustbader et al, 2004; Manczak et al, 2006). Mitochondriale Dysfunktionen sind als Merkmal der Alzheimer-Erkrankung mehrfach beschrieben (Bubber et al, 2005; Moreira et al, 2006; Parker et al, 1994). Inwiefern mitochondriale Fehllokalisierungen von APP oder A β hierbei zur Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung beitragen, ist jedoch noch nicht geklärt.

1.6 Zielsetzung

In dieser Arbeit wurden zwei Fragestellungen adressiert:

TEIL 1: Regulation des ER-Imports intrinsisch unstrukturierter Proteine

Vorangegangene Studien unserer Forschungsgruppe ergaben, dass die Sekundärstruktur von sekretorischen Proteinen deren Zielsteuerung ins ER beeinflusst (Heske et al, 2004; Miesbauer et al, 2009). Während Untersuchungen zum ER-Import von PrP zeigte sich, dass intrinsisch unstrukturierte Modellproteine deutlich schlechter ins ER geleitet werden als Konstrukte mit einem hohen Anteil gefalteter Domänen. Diese Beobachtung führte zu der Vermutung, dass ungefaltete Domänen den Translokationsprozess ins ER behindern. Dieser Hypothese widersprach jedoch der Tatsache, dass das endogene sekretorische Protein Shadoo (Sho), obwohl es größtenteils ungefaltet ist, sehr effizient ins ER geleitet wird. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde daher die Biogenese von Sho in neuronalen Zellen untersucht. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Charakterisierung von Domänen, die für den ER-Import von Sho und anderen intrinsisch unstrukturierten Proteinen von Bedeutung sein könnten.

TEIL 2: Mitochondriale Zielsteuerung sekretorischer Proteine

Während der Untersuchungen zur Zielsteuerung intrinsisch unstrukturierter Proteine wurde eine überraschende Beobachtung gemacht. Bei einigen sekretorischen Proteinen zeigte sich, dass die Deletion von alpha-helikalen Domänen eine mitochondriale Lokalisierung zur Folge hatte. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte deshalb untersucht werden, welche Merkmale der Polypeptidkette an der mitochondrialen Zielsteuerung beteiligt sind, welche Auswirkungen eine mitochondriale Lokalisierung sekretorischer Proteine möglicherweise hat und wie die beobachtete mitochondriale Zielsteuerung sekretorischer Proteine reguliert sein könnte.

2 Ergebnisse

2.1 TEIL 1: Die Rolle der GPI-Signalsequenz beim ER-Import intrinsisch unstrukturierter Proteine

Für Proteine des sekretorischen Weges (*secretory pathway*) ist die Translokation in das Endoplasmatische Retikulum (ER) der erste entscheidende Schritt auf dem Weg zu ihrem Zielorganell. Lange Zeit ging man davon aus, dass die Anwesenheit eines ER-Signalpeptids ausreicht, um einen effizienten ER-Import eines Proteins zu gewährleisten. Verschiedene Studien der letzten Jahre zeigten jedoch, dass die ER-Translokation von Proteinen ein hoch-regulierter Prozess ist und das Vorhandensein eines ER-Signalpeptids nicht zwangsläufig garantiert, dass ein Protein ins ER transloziert (Hegde & Kang, 2008; Miesbauer et al, 2009). Die molekularen Mechanismen, über welche die Protein-Translokation ins ER reguliert werden, sind bislang nur in Ansätzen bekannt. Neben zellulären Faktoren wie dem Co-Chaperon p58^{IPK} (1.2.3 und 2.2.10) scheinen auch Merkmale der Polypeptidkette selbst deren Translokation zu modulieren. So beeinflusst die Aminosäuresequenz des N-terminalen ER-Signalpeptids die Effizienz der Protein-Translokation (Heller et al, 2003; Kang et al, 2006). Ob ein sekretorisches Protein quantitativ ins ER importiert wird, scheint jedoch auch von internen Sequenzabschnitten des Proteins abzuhängen. Studien unserer Forschungsgruppe zeigten, dass der Faltungszustand der Polypeptidkette entscheidend für eine erfolgreiche Zielsteuerung ins ER ist (Heske et al, 2004; Miesbauer et al, 2009). Analysen pathogener Mutanten des Prion-Proteins (PrP) und verschiedener Modellsubstrate ergaben, dass sekretorische Proteine mit einem hohen Anteil intrinsisch unstrukturierter Domänen dazu neigen nicht quantitativ ins ER zu importieren. Zudem zeigte sich, dass durch Fusion alpha-helikaler Domänen an intrinsisch unstrukturierte Proteine deren ER-Import signifikant verbessert wird. Gleiches ist nicht durch die Fusion eines sehr effizienten ER-Signalpeptids möglich.

Das Fehlen von stabil gefalteten Domänen scheint also ein Hindernis für die ER-Translokation eines Proteins darstellen zu können. Dies spiegelt sich ebenfalls in einer bioinformatischen Analyse, die wir in Kooperation mit Nir Ben-Tal (*Department of Biochemistry, George S. Wise Faculty of Life Sciences, Tel Aviv University,*

Israel) durchgeführt haben, wieder. Es zeigte sich, dass nur 10 % der humanen Proteine mit einem N-terminalen ER-Signalpeptid intrinsisch unstrukturiert sind. Als intrinsisch unstrukturiert wurde dabei ein Protein betrachtet, wenn mindestens 70 % der Polypeptidkette durch die Programme RONN, POODLE-W und IUPred als unstrukturiert vorhergesagt werden. Im Gegensatz dazu sind intrinsisch unstrukturierte Proteine im gesamten humanen Proteom mit 31 % deutlich häufiger vertreten. Offenbar scheinen sekretorische Proteine also seltener einen hohen Anteil ungefalteter Domänen aufzuweisen. Kürzlich wurde beschrieben, dass das neuronale Glykoprotein Shadoo (Sho) komplett unstrukturiert ist (Daude et al, 2010; Watts et al, 2007). Dennoch wird Sho quantitativ ins ER importiert (Sakthivelu et al, 2011) und 2.1.1. Hieraus ergab sich die Frage, weshalb Sho trotz eines Mangels an stabiler Sekundärstruktur effizient ins ER importiert wird und welche weiteren Faktoren, neben alpha-helikalen Domänen, die Translokation unstrukturierter Domänen fördern könnten. Dies wurde im ersten Ergebnisteil dieser Arbeit untersucht.

2.1.1 Die GPI-Signalsequenz von Shadoo ist essentiell für dessen ER-Import

Sho zählt zur sogenannten Prion-Protein(PrP)-Familie. Eine Gemeinsamkeit von Sho und PrP ist, dass beide Proteine über eine lange unstrukturierte Domäne verfügen. Außerdem sind beide Proteine komplex glykosyliert und über einen Glykosylphosphatidylinositol(GPI)-Anker extrazellulär in der Plasmamembran fixiert (Abb. 16 A, B und 17).

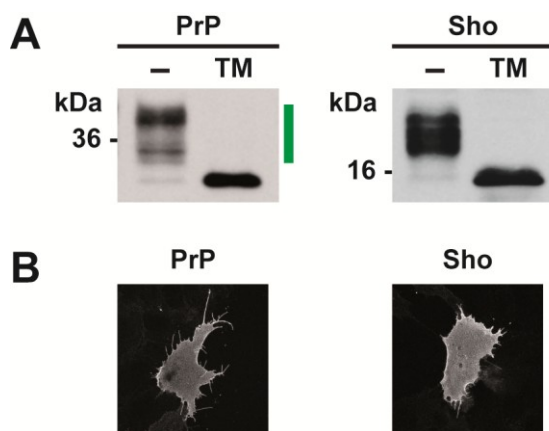


Abb. 16: PrP und Sho werden effizient ins ER importiert. (A) PrP und Sho werden effizient posttranslational glykosyliert. N2a Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transient transfiziert. Zur Identifizierung glykosylierter Proteinfractionen wurden die Zellen für 16 h mit dem Glykosylierungs-Inhibitor Tunicamycin (TM) behandelt. Unbehandelte Zellen (-) wurden in dieser Zeit in MEM-Vollmedium kultiviert. Gesamtzell-Lysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Signale, dessen Laufverhalten sich unter Behandlung mit TM ändern, repräsentieren glykosylierte Proteinfractionen. Die grünen Balken markieren die glykosylierten Proteinfractionen. *Immundetektion:* Anti-PrP Antikörper 3F4, Monoklonaler Anti-V5 Antikörper (Sho), HRP-Anti-Maus Antikörper. **(B) PrP und Sho sind an der Zelloberfläche lokalisiert.** SHSY-5Y Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transient transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und die Konstrukte in nicht permeabilisierten Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz an der Plasmamembran detektiert. *Immundetektion:* Anti-PrP Antikörper 3F4, Monoklonaler Anti-V5 Antikörper (Sho), Alexa Fluor 488 Anti-Maus Antikörper.

Für PrP ist bekannt, dass dessen hochstrukturierter C-Terminus unerlässlich für einen effizienten ER-Import des Proteins ist (Heske et al, 2004; Miesbauer et al, 2009). Deletiert man die strukturierten C-terminalen Domänen von PrP schrittweise, so sinkt dessen ER-Import proportional zum Verlust stabiler Sekundärstruktur. Beispielsweise wird die PrP-Mutante *PrP•115* (Abb. 17), welche ausschließlich aus dem unstrukturierten N-terminalen Teil von PrP besteht, trotz der Anwesenheit des ER-Signalpeptids nicht mehr ins ER importiert und stattdessen im Zytosol proteasomal abgebaut (Miesbauer et al, 2009).

Eine frühere Studie unserer Arbeitsgruppe deutet darauf hin, dass *PrP•115* aufgrund seiner fehlenden stabilen Sekundärstruktur nicht ins ER importiert wird. Zudem zeigten weitere Analysen, dass unstrukturierte Proteine unabhängig von ihrer Länge oder Primärsequenz dazu neigen ineffizient ins ER zu translozieren (Miesbauer et al, 2009). Vergleicht man die beiden unstrukturierten Proteine *PrP•115* und Sho stellt sich die Frage weshalb Sho effektiv ins ER importiert wird, *PrP•115* hingegen nicht.

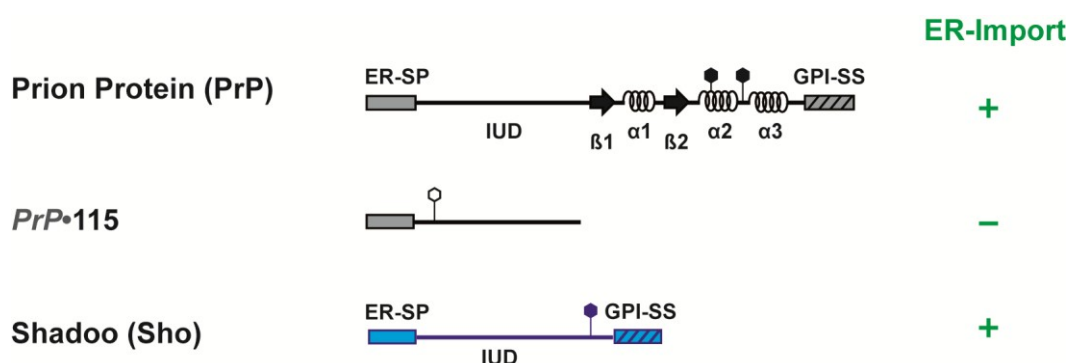


Abb. 17: Schematische Darstellung der Konstrukte. ER-SP: ER-Signalpeptid, IUD: intrinsisch unstrukturierte Domäne, β : β -Faltblatt Domäne, α : α -helikale Domäne, ausgefülltes Sechseck: endogene Glykosylierungsstelle, unausgefülltes Sechseck: artifizielle Glykosylierungsstelle, GPI-SS: GPI-Signalsequenz, +: effizienter ER-Import, -: ineffizienter ER-Import.

Ein auffälliger Unterschied zwischen Sho und PrP•115 ist die nur bei Sho vorhandene C-terminale GPI-Signalsequenz. Deletiert man die GPI-Signalsequenz von Sho (AS 127 – 151) wird das Protein nicht mehr quantitativ ins ER importiert (Abb. 18 A). Ersichtlich ist dies an folgenden Ergebnissen: Erstens weist Sho Δ GPI nach Behandlung mit dem Glykosylierungs-Inhibitor Tunicamycin kein verändertes elektrophoretisches Laufverhalten auf (Abb. 18 B). Offenbar wird die Glykosylierungsstelle von Sho Δ GPI also nicht glykosyliert. Da die Glykosylierung von Proteinen im ER und im Golgi-Apparat stattfindet, kann die fehlende Glykosylierung von Sho Δ GPI ein Hinweis für einen gescheiterten ER-Import sein. Zweitens weist Sho Δ GPI ein langsames elektrophoretisches Laufverhalten als ein korrespondierendes Konstrukt ohne N-terminales ER-Signalpeptid (Δ SP•Sho Δ GPI) auf (Abb. 18 C). Da das ER-Signalpeptid von Sho im ER von der Signalpeptidase entfernt wird, deutet dies ebenfalls an, dass Sho Δ GPI nicht ins ER transloziert. Drittens wird Sho Δ GPI nicht sekretiert (Abb. 18 D, links), was zusammen mit den oberen Analysen ein Indiz dafür ist, dass Sho Δ GPI nicht den sekretorischen Weg durchläuft. Als effizient sekretiertes Kontrollprotein diente PrP Δ GPI (Abb. 18 D, rechts). Zellkultur- und transgene Tiermodelle ergaben, dass PrP seine GPI-Signalsequenz nicht für den ER-Import benötigt und PrP Δ GPI infolge der fehlenden Membranverankerung sekretiert wird (Chesebro et al, 2005; Miesbauer et al, 2009; Winklhofer et al, 2003).

Abbildung 18 D illustriert außerdem, dass Sho Δ GPI nach Behandlung mit dem proteasomalen Inhibitor MG-132 im Vergleich zu Δ SP•Sho Δ GPI deutlich weniger stabilisiert wird. Δ SP•Sho Δ GPI ist aufgrund des fehlenden ER-Signalpeptids zytosolisch fehllokalisiert und wird vom Proteasom degradiert. Weshalb Sho Δ GPI, trotz eines gescheiterten ER-Imports und der sich daraus ergebenden Freisetzung des Proteins ins Zytosol, kaum einem proteasomalen Abbau unterliegt, wird im zweiten Ergebnisteil dieser Arbeit deutlich (Abschnitt 2.2.1 ff.).

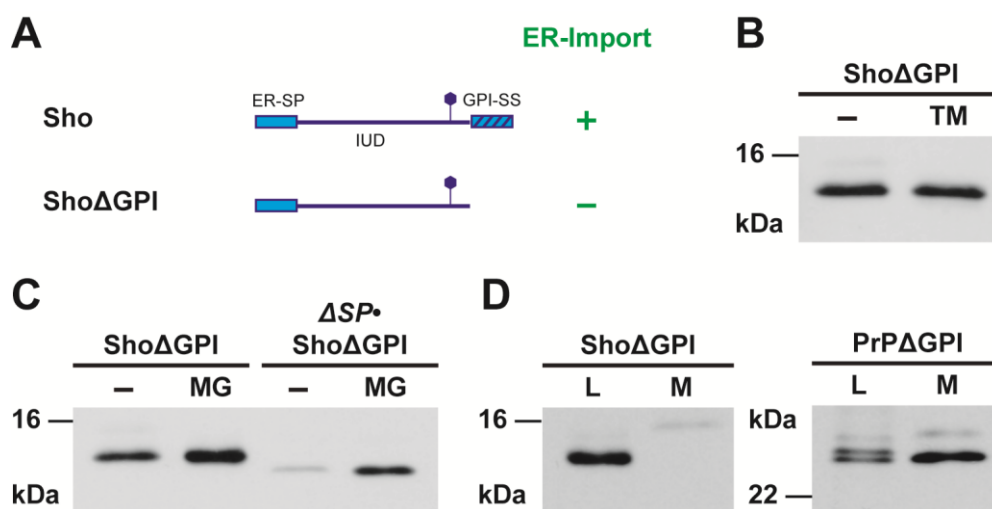


Abb. 18: Die GPI-Signalsequenz von Sho ist essentiell für einen quantitativen ER-Import des Proteins. Schematische Darstellung von Sho und Sho Δ GPI. ER-SP: ER-Signalpeptid, IUD: intrinsisch unstrukturierte Domäne, Sechseck: Glykosylierungsstelle, GPI-SS: GPI-Signalsequenz, +: Effizienter ER-Import, -: ineffizienter ER-Import. **(B,C,D)** N2a Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transient transfiziert. *Immunodetektion:* Monoklonaler Anti-V5 Antikörper, HRP-Anti-Maus Antikörper. **(B) Sho Δ GPI ist nicht glykosyliert.** Zur Identifizierung glykosylierter Proteinfraktionen wurden die Zellen für 16 h mit dem Glykosylierungs-Inhibitor Tunicamycin (TM) behandelt oder unbehandelt gelassen (-). Gesamtzell-Lysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. **(C) Das ER-Signalpeptid von Sho Δ GPI wird nicht prozessiert.** Transfizierte Zellen wurden 3 h vor Ernte mit dem proteasomalen Inhibitor MG-132 (MG) oder DMSO (-) inkubiert. Gesamtzell-Lysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. **(D) Sho Δ GPI wird nicht sekretiert.** Proteine im Gesamt-Zelllysat (L) und im Zellkulturmedium (M) wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Das sekretierte Protein PrP Δ GPI wurde als Positivkontrolle eingesetzt.

2.1.2 Die GPI-Signalsequenz von Shadoo ist kein eigenständiges ER-Import-Signal

Zwei Publikationen der letzten Jahre deuten darauf hin, dass eine GPI-Signalsequenz als eigenständiges posttranslationales ER-Import-Signal dienen kann (Gu et al, 2008; Holscher et al, 2001). Um zu überprüfen, ob dies für Sho der Fall ist, wurde eine Mutante getestet, bei der das N-terminale ER-Signalpeptid, jedoch nicht die C-terminale GPI-Signalsequenz, deletiert worden ist (ΔSP •Sho) (Abb. 19 A). ΔSP •Sho ist mittels Western Blot Analyse nur nach Inhibition des Proteasoms durch MG-132 (MG) detektierbar (Abb. 19 B). Ein derartig starker proteasomaler Abbau ist typisch für zytosolische Mutanten sekretorischer Proteine (Miesbauer et al, 2009). Zudem erscheint für ΔSP •Sho im Western Blot keine glykosylierte Proteinfraction und das Protein zeigt in der IF keine Lokalisation an der Plasmamembran. Beides wäre zu erwarten, wenn die Mutante ins ER transloziert und die GPI-Signalsequenz durch einen GPI-Anker ersetzt werden würde. Da ΔSP •Sho außerdem nicht sekretiert wird, schließt sich die Möglichkeit aus, dass das Protein zwar ins ER transloziert, dort jedoch keine GPI-Verankerung erfolgt (Abb. 19 B, M).

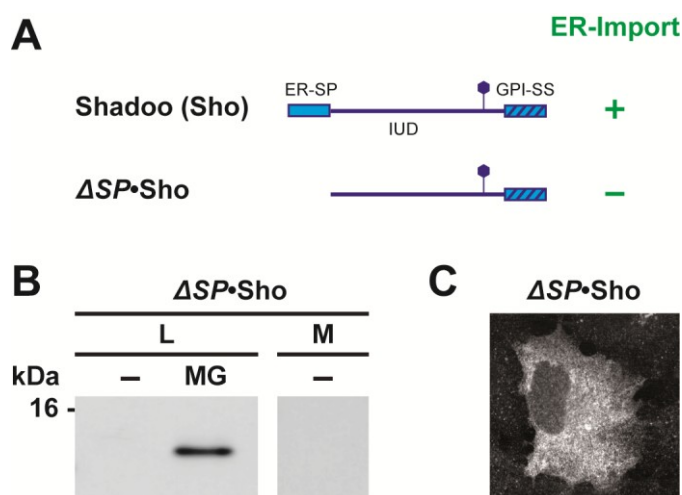


Abb. 19: Die GPI-Signalsequenz von Sho ist kein eigenständiges ER-Import Signal. (A) Schematische Darstellung des analysierten Konstrukts im Vergleich zum Wildtyp-Protein Sho. ER-SP: ER-Signalpeptid, IUD: intrinsisch unstrukturierte Domäne, Sechseck: Glykosylierungsstelle, GPI-SS: GPI-Signalsequenz, +: effizienter ER-Import, -: ineffizienter ER-Import. (B) Sho wird ohne sein ER-Signalpeptid nicht sekretiert und unterliegt einem starken proteasomalen Abbau. N2a Zellen wurden transient transfiziert und ΔSP •Sho im Gesamt-Zelllysat (L) sowie im Zellkulturmedium (M) mittels SDS-PAGE und Western

Blot analysiert. Für die Analyse des Zelllysates wurden die Zellen vor der Ernte 3 h mit dem proteasomalen Inhibitor MG-132 (MG) oder DMSO (-) inkubiert. *Immundetektion*: Monoklonaler Anti-V5 Antikörper, HRP-Anti-Maus Antikörper. **(C) $\Delta SP\cdot Sho$ zeigt eine rein zytosolische Lokalisation.** SHSY-5Y Zellen wurden transient mit $\Delta SP\cdot Sho$ transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und das Konstrukt in permeabilisierten Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz detektiert. *Immundetektion*: Monoklonaler Anti-V5 Antikörper, Alexa Fluor 488 Anti-Maus Antikörper.

Die zytosolische Immunfärbung (Abb. 19 C) sowie das Fehlen von Glykosylierung und Sekretion zeigen, dass $\Delta SP\cdot Sho$ nicht ins ER importiert wird. Die GPI-Signalsequenz von Sho ist demnach kein eigenständiges ER-Import-Signal.

2.1.3 Eine GPI-Signalsequenz verbessert den ER-Import unstrukturierter Proteine

Wie in Abschnitt 2.1.1 gezeigt wurde, ist im Fall des intrinsisch unstrukturierten Proteins Sho dessen C-terminale GPI-Signalsequenz unerlässlich für einen effektiven ER-Import des Proteins. Um der Frage nachzugehen, ob dieses Phänomen nur für Sho zutrifft oder eine GPI-Signalsequenz generell den ER-Import unstrukturierter Proteine verbessern kann, wurden weitere Proteine untersucht.

Das Modellprotein *PrP*•115, ist wie bereits erwähnt, unstrukturiert und wird nicht ins ER importiert. Um den ER-Import des Konstrukts besser untersuchen zu können, verfügt es über eine artifizielle N-Glykosylierungsstelle an der AS-Position 31 (Miesbauer et al, 2009). *PrP*•115 ist nicht glykosyliert und wird im Western Blot als Einzelbande detektiert (Abb. 20 B links). *PrP*•115GPI, welches durch Fusion der GPI-Signalsequenz von PrP an *PrP*•115 generiert worden ist, zeigt hingegen zwei Banden im Western Blot (Abb. 20 B rechts). Durch Behandlung der Zellen mit dem Glykosylierungs-Inhibitor Tunicamycin wurde die zusätzliche Bande von *PrP*•115GPI als glykosylierte Proteinfraction identifiziert. Offensichtlich fördert eine GPI-Signalsequenz also auch im Fall von *PrP*•115 den ER-Import. Bemerkenswerterweise ist dieser Effekt nicht abhängig von der Primärstruktur der GPI-Signalsequenz. Abb. 20 C zeigt, dass das Konstrukt *PrP*•115GPI α , bestehend aus dem N-Terminus von PrP und der heterologen GPI-Signalsequenz des Proteins GFR α (GDNF Rezeptor alpha), ebenfalls einen verbesserten ER-Import aufweist.

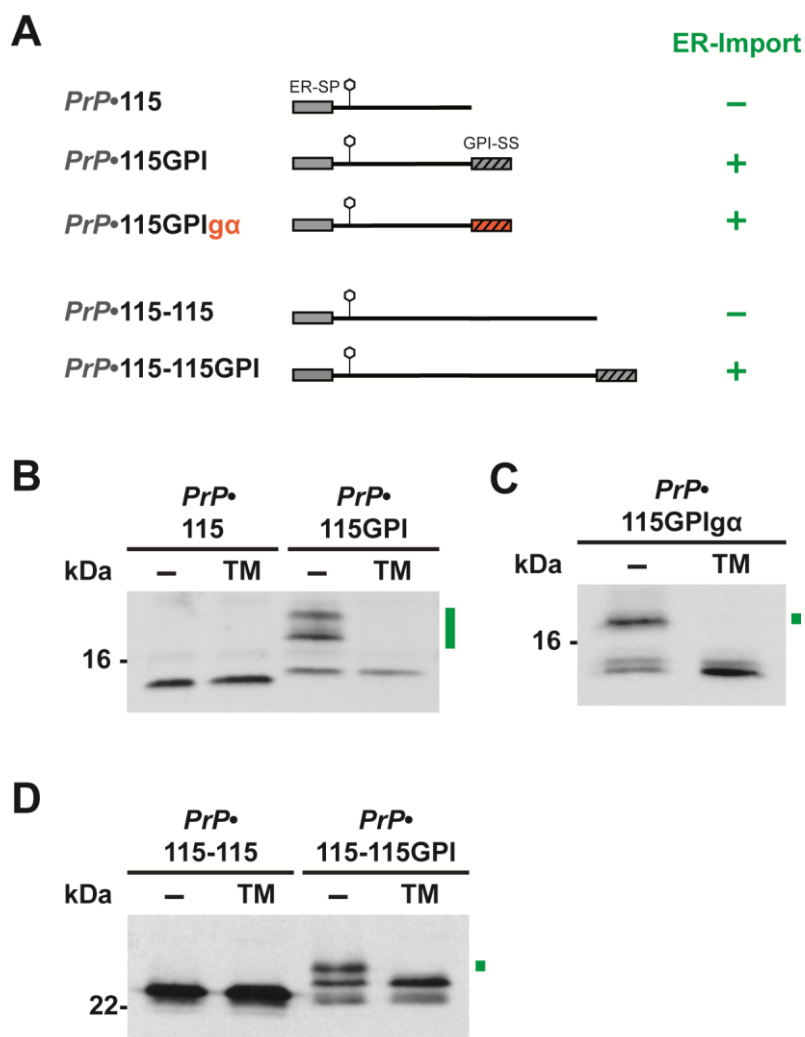


Abb. 20: Eine GPI-Signalsequenz verbessert den ER-Import unstrukturierter Proteine (A) Zusammenfassung der analysierten Konstrukte. ER-SP: ER-Signalpeptid, unausgefülltes Sechseck: artifizielle Glykosylierungsstelle, GPI-SS: GPI-Signalsequenz, +: effizienter ER-Import, -: ineffizienter ER-Import. **(B,C,D) Eine GPI-Signalsequenz verbessert die Translokation eines unstrukturierten Proteins unabhängig von der Primärsequenz der GPI-Signalsequenz (C) und unabhängig von der Länge der unstrukturierten Domäne (D).** N2a Zellen wurden transient mit den angegebenen Konstrukten transfiziert. Die Identifizierung effizient ins ER importierter Proteinfractionen erfolgte durch Nachweis der Glykosylierung. Hierzu wurden die transfizierten Zellen für 16 h mit dem Glykosylierungs-Inhibitor Tunicamycin (TM) behandelt oder unbehandelt gelassen (-). Gesamtzell-Lysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die grünen Balken markieren glykosylierte Proteinfractionen. *Immundetektion:* Anti-PrP Antikörper 3F4, HRP-Anti-Maus Antikörper.

Um auszuschließen, dass eine GPI-Signalsequenz nicht nur die Translokation verhältnismäßig kleiner unstrukturierter Proteine wie Sho oder *PrP*•115 verbessert, wurde das längere Modellprotein *PrP*•115-115 analysiert. *PrP*•115-115 besteht aus dem ER-Signalpeptid von PrP (*PrP*•), gefolgt von zwei Kopien der unstrukturierten Domäne von PrP (115-115). Auch dieses Konstrukt enthält die artifizielle Glykosylierungs-Stelle. Wie bereits in vorherigen Studien unserer Gruppe gezeigt, wird *PrP*•115-115 nicht ins ER importiert und ist deshalb auch nicht glykosyliert (Miesbauer et al, 2009). Durch Fusion der GPI-Signalsequenz von PrP an *PrP*•115-115 (*PrP*•115-115GPI) erscheint auch bei dieser längeren Mutante eine zusätzliche glykosylierte und demnach importierte Proteinfraction (Abb. 20 D, grüne Markierung).

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass der bei Sho beobachtete Effekt auch bei heterologen unstrukturierten Proteinen unterschiedlicher Längen und unter Einsatz unterschiedlicher GPI-Signalsequenzen auftritt. Der positive Effekt einer C-terminalen GPI-Signalsequenz auf die Translokation eines unstrukturierten Proteins scheint also unabhängig von der Proteinlänge, der Primärsequenz der unstrukturierten Domäne und der Primärsequenz der GPI-Signalsequenz zu sein.

2.1.4 Die Zytotoxizität der pathogenen PrP-Mutante Q159X kann durch Fusion einer GPI-Signalsequenz signifikant gesenkt werden

Die humane Prion-Erkrankung Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS-Syndrom) wird durch dominant-vererbte Mutationen im Gen des zellulären Prion-Proteins *PRNP* ausgelöst. Unter anderem ist die Erkrankung mit den beiden Stopp-Mutanten Q160X und W145X assoziiert (Finckh et al, 2000; Kitamoto et al, 1993). „X“ bezeichnet die Integration eines Stopp-Codons, der Buchstabe und die Nummer die betreffende Aminosäure des humanen Prion-Proteins. Da beiden Proteinen, aufgrund der Stopp-Mutation, große Anteile des globulär gefalteten C-Terminus von PrP fehlen, sind sie überwiegend unstrukturiert. Analysen der korrespondierenden Mutanten des murinen PrPs (Q159X und W145X) ergaben, dass die Proteine daher nicht effizient ins ER translozieren. Außerdem zeigte sich, dass Q159X und W145X aufgrund der Fehllokalisation im Zytosol Apoptose induzieren (Heske et al, 2004; Miesbauer et al, 2009; Rambold et al, 2006).

In den vorherigen Abschnitten wurde gezeigt, dass eine GPI-Signalsequenz den ER-Import intrinsisch unstrukturierter Proteine begünstigt. Abschließend sollte daher untersucht werden, ob eine GPI-Signalsequenz auch die Menge an zytosolisch fehllokalisiertem Q159X reduziert und ob dies zu einer verringerten Zytotoxizität des Konstrukts führt. Um eine erfolgreiche ER-Translokation leichter nachweisen zu können, verfügt das Konstrukt Q159X über eine artifizielle N-Glykosylierungsstelle. Q159X wird nicht quantitativ ins ER importiert (Miesbauer et al, 2009) und daher unglykosyliert (Abb. 21 B, links). Die Fusion der GPI-Signalsequenz von PrP führt offenbar zu einer gesteigerten ER-Translokation. Erkennbar ist dies an der glykosylierten Proteinfraction von Q159GPI (Abb. 21 B, grüne Markierung). Abbildung 21 C illustriert, dass sich der bessere ER-Import von Q159GPI in der Tat in einer geringeren Toxizität des Konstrukts widerspiegelt. Im Vergleich zur pathogenen Mutante Q159X, die in rund 24 % der transfizierten Zellen Apoptose induzierte, führte Q159GPI zu einer Apoptoserate von nur circa 15 %. Dieses Ergebnis bestätigt, dass die Toxizität der pathogenen PrP-Mutante Q159X mit dessen ER-Import-Effizienz korreliert (Rambold et al, 2006).

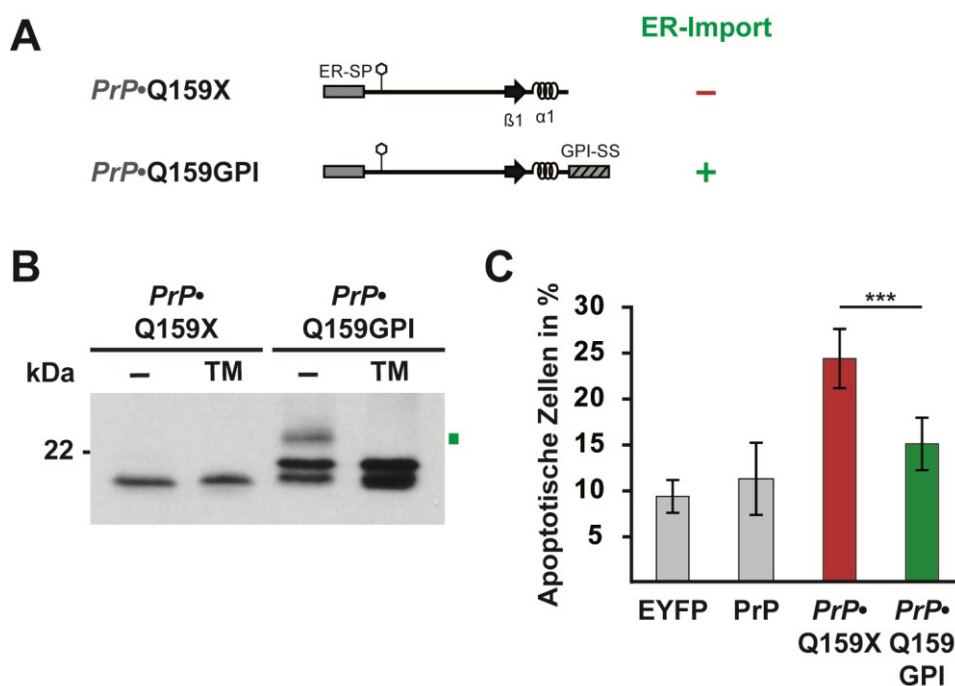


Abb. 21: Eine Verbesserung des ER-Imports der pathogenen PrP-Mutante Q159X führt zu einer signifikant verringerten Toxizität. (A) Schematische Darstellung der pathogenen PrP-Mutante Q159X und des korrespondierenden Konstrukts mit der GPI-Signalsequenz von PrP. ER-SP: ER-Signalpeptid, unausgefülltes Sechseck: artifizielle Glykosylierungsstelle, β : β -Faltblatt Domäne, α : α -helikale Domäne, GPI-SS: GPI-Signalsequenz, +: effizienter ER-Import, -: ineffizienter ER-Import. **(B) Durch Fusion einer GPI-Signalsequenz wird der ER-Import von Q159X verbessert.** N2a Zellen wurden transient mit den angegebenen Konstrukten transfiziert. Die Identifizierung effizient ins ER importierter Proteinfraktionen erfolgte durch Nachweis der Glykosylierung. Hierzu wurden die Zellen für 16 h mit dem Glykosylierungs-Inhibitor Tunicamycin (TM) behandelt oder unbehandelt gelassen (-). Gesamtzell-Lysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Die grünen Balken markieren glykosylierte Proteinfraktionen. *Immundetektion*: Anti-PrP 3F4 Antikörper, HRP-Anti-Maus Antikörper. **(C) Durch Verbesserung des ER-Imports nimmt die Toxizität der pathogenen PrP-Mutante Q159X signifikant ab.** SH-SY5Y Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten und dem Transfektionsmarker EYFP kotransfiziert. Da die untersuchte PrP Mutante Q159X eine höhere Toxizität unter proteasomaler Inhibition aufweist, wurden die Zellen vor dem Fixieren für 3 h in Vollmedium mit 30 μ M MG132 kultiviert. Im Anschluss daran wurde eine indirekte Immunfluoreszenz-Analyse permeabilisierter Zellen durchgeführt. Zur Bestimmung der Apoptoserate wurden die Proben unter Verwendung eines Axioscope 2 plus Fluoreszenzmikroskops ausgewertet. Hierfür wurde der Anteil an transfizierten Zellen mit einer aktivierten Caspase-3 ermittelt. Zur statistischen Auswertung wurden mindestens 4000 transfizierte Zellen aus mindestens 4 unabhängigen Experimenten blind gezählt. Gezeigt sind die Mittelwerte mit der jeweils zugehörigen Standardabweichung. Signifikanz (Studentscher *t*-Test): *** $p < 0,0005$. *Immundetektion*: Anti-ACTIVE Caspase-3 Antikörper, Alexa Fluor 555 Anti-Kaninchen Antikörper.

2.2 TEIL 2: Mitochondriale Zielsteuerung durch N-terminale Signalpeptide sekretorischer Proteine

Im ersten Ergebnisteil wurde dargelegt, dass sekretorische Proteine mit einem hohen Anteil unstrukturierter Domänen häufig nicht quantitativ ins ER translozieren und eine GPI-Signalsequenz die korrekte Zielsteuerung ins ER fördern kann. Der zweite Teil dieser Arbeit adressiert die Frage, was mit nicht-translozierten sekretorischen Proteinen geschieht. Üblicherweise werden zytosolisch fehllokalisierte sekretorische Proteine proteasomal degradiert (Hessa et al, 2011). Im Folgenden wird jedoch deutlich, dass einige nicht-translozierte Proteine einer sekundären Zielsteuerung unterliegen können.

2.2.1 Mitochondriale Zielsteuerung nicht-translozierter Shadoo- und Somatostatin-Mutanten

Wie in Abschnitt 2.1.1 beschrieben wurde, ist die GPI-Signalsequenz von Sho essentiell für dessen korrekte Zielsteuerung zur Plasmamembran. Das Konstrukt Sho Δ GPI transloziert nicht ins ER und weist ein unprozessiertes N-terminales ER-Signalpeptid auf. Außerdem wird Sho Δ GPI kaum proteasomal degradiert (Abb. 18 C). Um der Frage nachzugehen, wo Sho Δ GPI zellulär lokalisiert ist, wurde das Protein mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht. Überraschenderweise zeigte Sho Δ GPI nicht wie erwartet eine vorrangig zytosolische Lokalisierung. Abbildung 22 illustriert, dass Sho Δ GPI eine Kolokalisation mit dem Mitochondrien-Markerfarbstoff *Mitotracker Red CMXRos* aufweist (Abb.22, rechts, Vergrößerung). Für das Wildtyp-Protein Sho wurde hingegen eine starke Anfärbung des Golgi-Apparates sowie eine Dekoration der Plasmamembran beobachtet (Abb. 22, links). Die Färbung des Golgi-Apparates wurde durch Kolokalisation mit dem Markerprotein Giantin verifiziert. Der Beleg, dass sich Sho an der Plasmamembran befindet, wurde mit der bereits gezeigten Immunfluoreszenz nicht-permeabilisierter Zellen erbracht (Abb. 16 B, rechts). Sehr selten wurde auch für das Wildtyp-Protein Sho eine schwache Lokalisierung an den Mitochondrien beobachtet (Quantifizierung, Abb. 24).

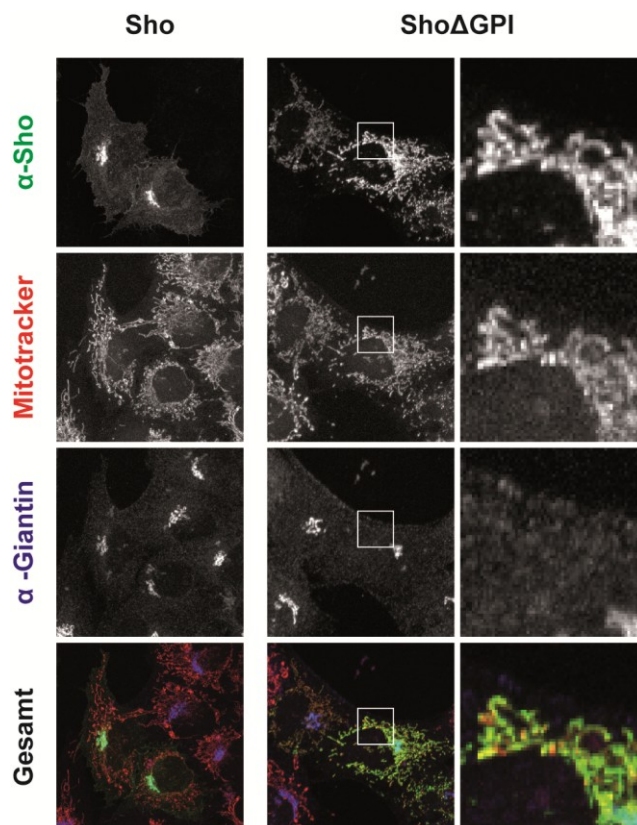


Abb. 22: Sho Δ GPI kolokalisiert mit den Mitochondrien. SHSY-5Y Zellen wurden transient mit den angegebenen Konstrukten transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und die transfizierten Konstrukte in permeabilisierten Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz detektiert. Der Nachweis der mitochondrialen Lokalisation von Sho Δ GPI erfolgte durch Kolokalisation mit dem Mitochondrien-Marker Mitotracker Red CMXRos. Sho zeigt eine für sekretorische Proteine charakteristische starke Färbung des Golgi-Apparates. Diese wurde durch Kofärbung des Golgi-Markerproteins Giantin verifiziert. *Immunodetektion:* Sho-Konstrukte (polyklonaler Anti-V5 Antikörper, Alexa Fluor 488 Anti-Kaninchen Antikörper), Golgi-Apparat (Anti-Giantin Antikörper, Alexa Fluor 647 Anti-Maus Antikörper), Mitochondrien: Fluoreszenzfarbstoff Mitotracker Red CMXRos.

Derzeit wird in einem anderen Projekt unserer Arbeitsgruppe das sekretorische Protein Prä-Pro-Somatostatin (Som) charakterisiert. Im Rahmen der hierfür durchgeführten Analysen zeigte sich, dass eine nicht ins ER translozierende Mutante von Som ebenfalls mitochondrial lokalisiert ist.

Som ist das primäre Translationsprodukt des humanen Peptidhormons Somatostatin. Es setzt sich aus einem N-terminalen ER-Signalpeptid, einer alpha-helikalen Prodomäne und einer unstrukturierten Hormon-Domäne zusammen (Abb. 23 A). Das N-terminale ER-Signalpeptid von Som wird im ER durch die

Signalpeptidase abgespalten. Wie im Fall von PrP ist auch bei Som die alpha-helikale Domäne essentiell für einen quantitativen ER-Import des Proteins. Deletiert man die Prodomäne (Som Δ pro), transloziert das Protein nicht mehr ins ER (unveröffentlichte Daten). Erkennbar ist dies beispielsweise daran, dass Som Δ pro nicht sekretiert wird (Abb. 23 B). Wie bereits für die Mutante Sho Δ GPI beschrieben, zeigt auch die Immunfluoreszenz-Analyse von Som Δ pro eine mitochondriale Lokalisation des Proteins (Abb. 23 C, rechts, Vergrößerung). Das Wildtyp-Protein Som weist hingegen keine Kolo-kalisation mit Mitochondrien auf. Som zeigt die für sekretorische Proteine typische Kolo-kalisation mit dem Golgi-Markerprotein Giantin (Abb. 23 C, links).

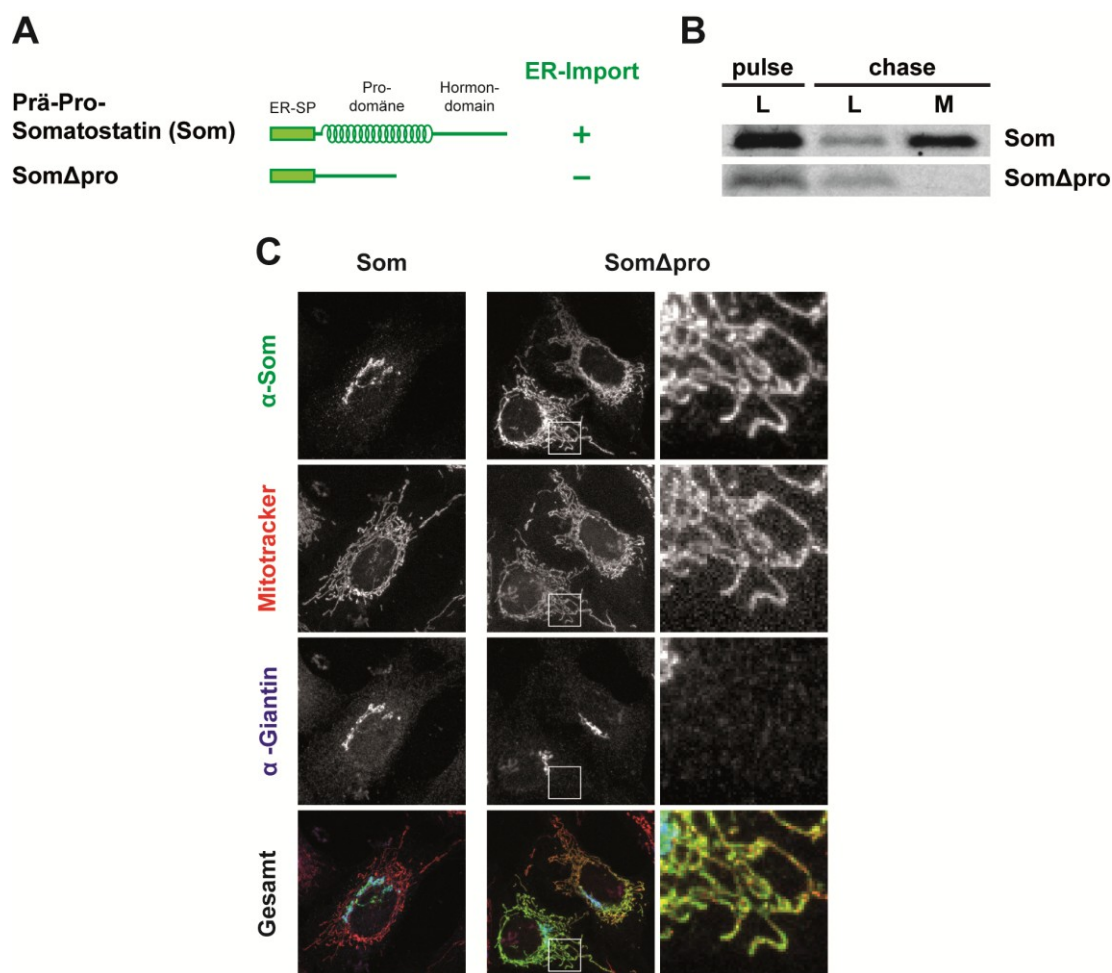


Abb. 23: Som Δ pro wird zu den Mitochondrien geleitet. (A, B) Die alpha-helikale Prodomäne von Som ist essentiell für einen effizienten ER-Import des Proteins. (A) Schematische Darstellung der analysierten Konstrukte. ER-SP: ER-Signalpeptid, +: effizienter ER-Import, -: ineffizienter ER-Import. (B) **Pulse-chase-Analyse der angegebenen Konstrukte.** N2a Zellen wurden transient mit den gezeigten Konstrukten transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für 30 min

in Methionin-freiem MEM-Medium kultiviert und anschließend für 15 min mit 300 $\mu\text{Ci/ml}$ L-[^{35}S]-Methionin (Hartmann Analytics; $>37\text{TBq/mmol}$) in Methionin-freiem MEM-Medium radioaktiv markiert. Anschließend wurden die Zellen entweder direkt geerntet (*pulse*) oder für weitere 60 min in MEM-Vollmedium kultiviert (*chase*). Die transfizierten Konstrukte wurden unter Verwendung des monoklonalen Anti-V5 Antikörpers aus den Gesamtzell-Lysaten (L) beziehungsweise dem Chase-Medium (M) immunopräzipitiert. Die anschließende Analyse der radioaktiv markierten Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE, Trocknung des Gels und Exposition eines Röntgenfilms. **(C) Som Δpro kolokalisiert mit den Mitochondrien.** SHSY-5Y Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und die transfizierten Konstrukte in permeabilisierten Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz detektiert. Der Nachweis der mitochondrialen Lokalisation von Som Δpro erfolgte durch Kolokalisation mit dem Mitochondrien-Marker Mitotracker Red CMXRos. Som zeigt eine für sekretorische Proteine charakteristische starke Färbung des Golgi-Apparates. Diese wurde durch Kofärbung des Golgi-Markerproteins Giantin verifiziert. *Immundetektion:* Sho-Konstrukte (polyklonaler Anti-V5 Antikörper, Alexa Fluor 488 Anti-Kaninchen Antikörper), Golgi-Apparat (Anti-Giantin Antikörper, Alexa Fluor 647 Anti-Maus Antikörper), Mitochondrien: Fluoreszenzfarbstoff Mitotracker Red CMXRos.

Eine Quantifizierung der gezeigten Immunfluoreszenzen ergab, dass die nicht ins ER translozierenden Mutanten Sho ΔGPI und Som Δpro im Großteil der transfizierten Zellen zu den Mitochondrien geleitet werden (Abb. 24). Die Deletion der GPI-Signalsequenz von Sho beziehungsweise der alpha-helikalen Prodomäne von Som führt offensichtlich zu einer signifikant veränderten Zielsteuerung der Proteine.

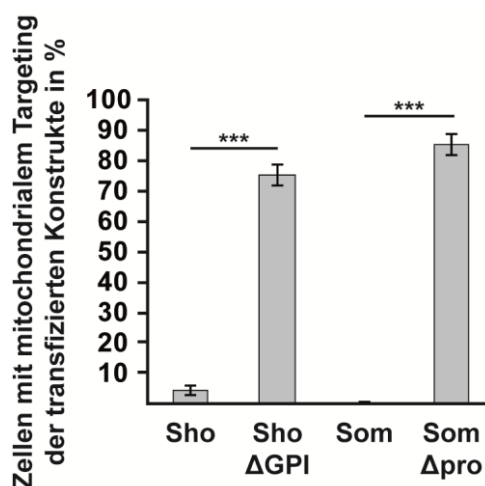


Abb. 24: Nicht-translozierte Sho- und Som-Mutanten unterliegen einer signifikanten Umleitung zu den Mitochondrien. Zur Quantifizierung der mitochondrialen Zielsteuerung der analysierten Konstrukte wurden Immunfluoreszenz-Analysen, wie in Abbildung 22 und 23 C beschrieben, durchgeführt. Anschließend wurden aus drei unabhängigen Versuchen mindestens 600 transfizierte Zellen pro Konstrukt gezählt und der Prozentsatz an transfizierten Zellen mit einer Kolokalisation von Konstrukt und Mitochondrien bestimmt. Gezeigt

sind die Mittelwerte mit der jeweils zugehörigen Standardabweichung. Signifikanz (Studentscher *t*-Test): *** $p < 0,0005$

2.2.2 Die ER-Signalpeptide von Shadoo, Somatostatin und APP leiten nicht-translozierte Proteine zu den Mitochondrien

Die im vorangegangenen Abschnitt dargelegten Ergebnisse weisen darauf hin, dass Sho und Som über eine mitochondriale Signalsequenz verfügen. Da die mitochondrial lokalisierten Mutanten Sho Δ GPI und Som Δ pro nicht ins ER importiert werden, weisen sie vermutlich ein unprozessiertes ER-Signalpeptid auf. Sowohl die Zielsteuerung zum ER wie auch die zu den Mitochondrien kann über N-terminale Signalsequenzen vermittelt werden. Es könnte daher sein, dass die Signalpeptide von Sho und Som keine „reinen“ ER-Signalsequenzen sind, sondern auch eine Zielsteuerung zu den Mitochondrien vermitteln können. Um dies zu untersuchen, wurden die beiden Signalpeptide im Kontext verschiedener chimärer Modellproteine analysiert. Zudem wurde ein weiteres ER-Signalpeptid in die Analyse mitaufgenommen – das Signalpeptid von APP (Amyloid-Vorläuferprotein; *Amyloid-Precursor-Protein*). APP ist ein mit der Alzheimer-Erkrankung assoziiertes Membranprotein, für welches eine pathogene Fehllokalisierung an den Mitochondrien beobachtet worden ist (Anandatheerthavarada et al, 2003; Devi et al, 2006). Zudem ist beschrieben, dass APP über ein N-terminales prozessierbares ER-Signalpeptid sowie eine nachfolgende mitochondriale Signalsequenz verfügt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob das isolierte ER-Signalpeptid (AS 1 – 24) eine Zielsteuerung zu den Mitochondrien vermittelt.

Zunächst wurden die ER-Signalpeptide von Sho, Som und APP an die beiden Modellproteine 115 und Tau fusioniert (Abb. 25). Das Konstrukt 115 ist bereits in Abschnitt 2.1.1 eingeführt worden und entspricht dem unstrukturierten N-Terminus von PrP. Das Konstrukt Tau ist ein Fragment des unstrukturierten

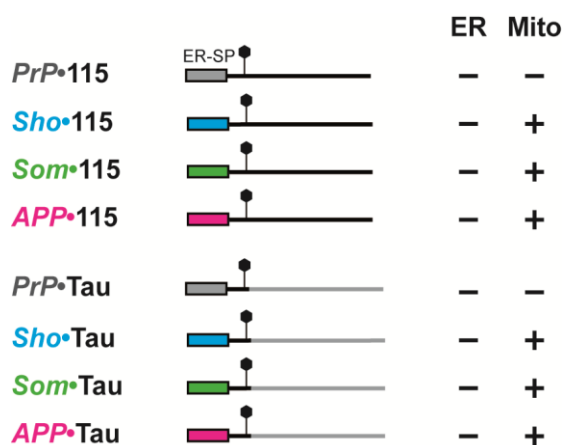
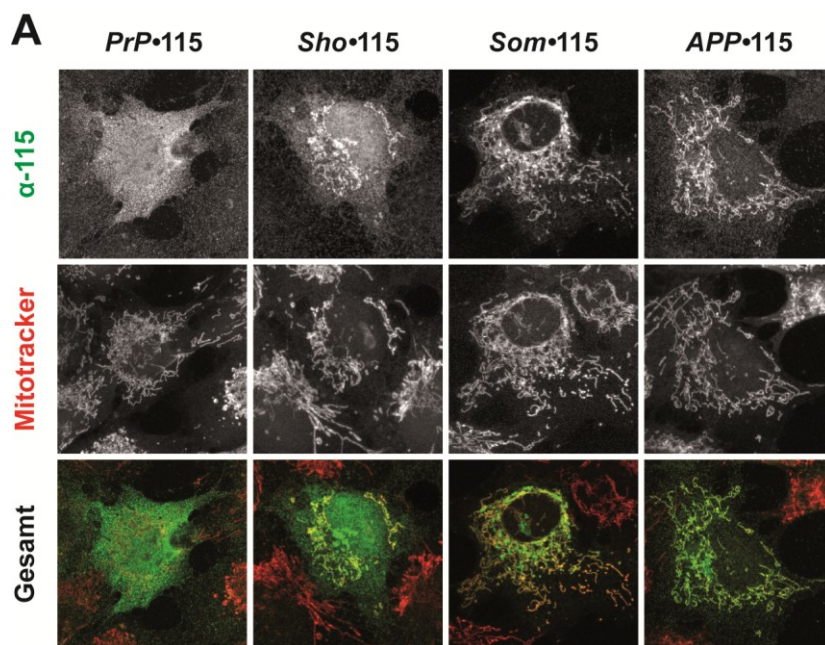


Abbildung 25: Schematische Darstellung der analysierten Konstrukte. ER: ER-Import; Mito: mitochondriales Targeting.

humanen Tau-Proteins (AS 103-197). Als Kontroll-Signalpeptid wurde das ER-Signalpeptid von PrP (*PrP*•) verwendet. *PrP*•115 und *PrP*•Tau translozieren nicht ins ER (Miesbauer et al, 2009). In der Immunfluoreszenz-Analyse zeigen beide Konstrukte daher eine zytosolische Färbung (Abb. 26). Fusioniert man jedoch die ER-Signalpeptide von Sho, Som und APP an 115 beziehungsweise Tau, ändert sich die zelluläre Lokalisation der Proteine. *Sho*•115, *Som*•115 und *APP*•115 sowie *Sho*•Tau, *Som*•Tau und *APP*•Tau sind mitochondrial lokalisiert (Abb. 26). In der Immunfluoreszenz überlappt die Färbung der Konstrukte weitgehend mit der Färbung der Mitochondrien (*Mitotracker*-Färbung).



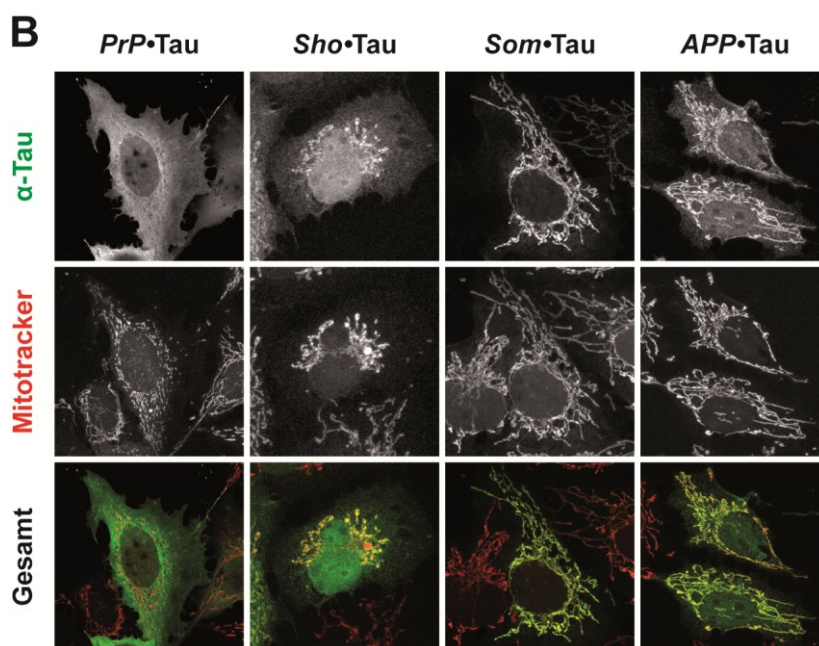


Abb. 26: Die N-terminalen Signalpeptide von Sho, Som und APP leiten unstrukturierte Proteine zu den Mitochondrien. (A,B) SHSY-5Y Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transient transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und die Konstrukte in permeabilisierten Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz detektiert. Der Nachweis einer mitochondrialen Lokalisation erfolgte durch Kolo-kalisation mit dem Mitochondrien-Marker Mitotracker Red CMXRos. *Immundetektion:* 115-Konstrukte (Anti-PrP 3F4 Antikörper, Alexa Fluor 488 Anti-Maus Antikörper), Tau-Konstrukte (Anti-Tau Antikörper HT-7, Alexa Fluor 488 Anti-Maus Antikörper), Mitochondrien (Fluoreszenzfarbstoff: Mitotracker Red CMXRos).

Die Western Blot Analysen von *Sho*•115, *Som*•115 und *APP*•115 sowie *Sho*•Tau, *Som*•Tau und *APP*•Tau zeigen, dass die Proteine ein langsames Laufverhalten als die korrespondierenden Mutanten ohne N-terminales ER-Signalspeptid (Δ SP•115, Δ SP•Tau) aufweisen (Abb. 27 A und B). Dies deutet darauf hin, dass die Proteine über unprozessierte ER-Signalpeptide verfügen. Zudem werden die genannten 115- und Tau-Konstrukte nicht sekretiert (Abb. 27 C). Beide Ergebnisse sind ein Indiz dafür, dass die mitochondrial lokalisierten Konstrukte *Sho*•-, *Som*•- und *APP*•115 sowie *Sho*•-, *Som*•- und *APP*•Tau nicht ins ER translozieren.

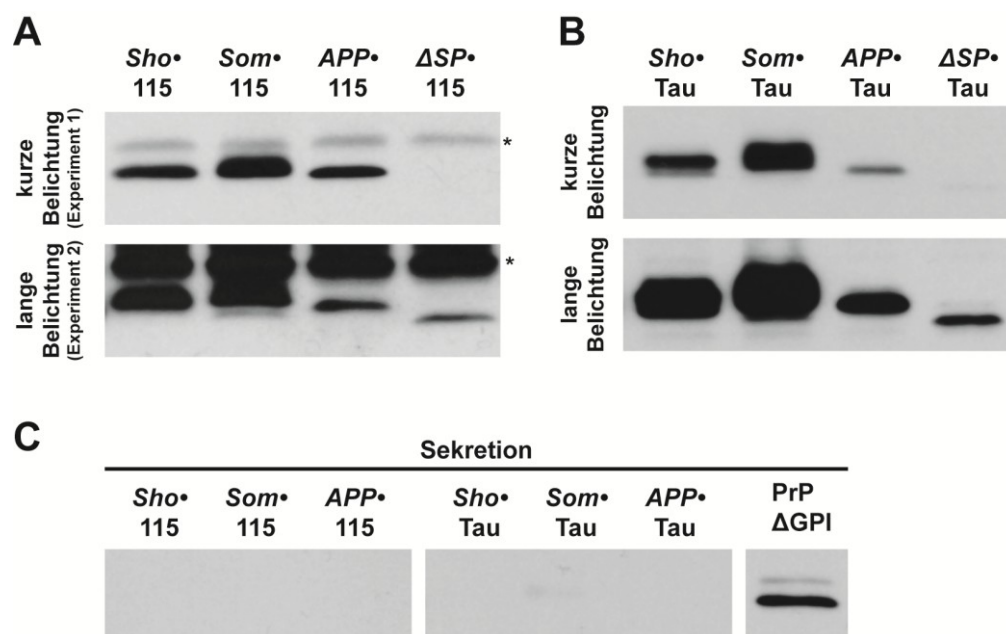


Abb. 27: Unstrukturierte Proteine werden unabhängig von deren ER-Signalpeptid nicht effizient ins ER importiert. (A, B) Die ER-Signalpeptide der Konstrukte Sho•115, Som•115 und APP•115 sowie Sho•Tau, Som•Tau und APP•Tau werden nicht prozessiert. N2a Zellen wurden transient mit den angegebenen Konstrukten transfiziert. Gesamtzell-Lysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Der Nachweis eines unprozessierten ER-Signalpeptids erfolgte durch Vergleich des elektrophoretischen Laufverhaltens eines korrespondierenden Konstrukts ohne ER-Signalpeptid (Δ SP). **(C) Sho•-, Som•- und APP•115 sowie Sho•-, Som•- und APP•Tau werden nicht sekretiert.** N2a Zellen wurden transient mit den angegebenen Konstrukten transfiziert. 3 h vor Ernte wurde das Zellkulturmedium gegen MEM-Medium ohne Zusätze ersetzt und die in dieser Zeit sekretierten Proteine anschließend durch eine TCA-Fällung aufgereinigt. Die weitere Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot. Das sekretierte Protein PrP Δ GPI diente als Positivkontrolle. **(A,B,C) Immundetektion:** 115-Konstrukte (Anti-PrP 3F4 Antikörper), Tau-Konstrukte (Anti-Tau Antikörper HT-7), HRP-Anti-Maus Antikörper.

Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass die ER-Signalpeptide von Sho und Som isoliert von „ihren Proteinen“ eine Zielsteuerung zu den Mitochondrien vermitteln können. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die mitochondriale Lokalisierung der Konstrukte Sho Δ GPI und Som Δ pro durch deren ER-Signalpeptide vermittelt wird. Desweiteren ergab die obige Analyse, dass das isolierte ER-Signalpeptid von APP ebenfalls heterologe Proteine zu den Mitochondrien leitet.

2.2.3 Die mitochondriale Zielsteuerung sekretorischer Proteine wird durch strukturelle Merkmale der Polypeptidkette gesteuert

Die bisherigen Ergebnisse legen nahe, dass die Signalpeptide von Sho, Som und APP bivalente Signalsequenzen darstellen und sowohl eine Zielsteuerung zum ER wie auch eine mitochondriale Zielsteuerung vermitteln können. Da die bisher analysierten mitochondrial lokalisierten Konstrukte alle komplett unstrukturiert waren, könnte es sein, dass die Art der vermittelten Zielsteuerung von der Sekundärstruktur der Polypeptidkette abhängt. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden chimäre Modellproteine, bestehend aus dem ER-Signalpeptid von Sho, Som oder APP und dem strukturierten Protein PrP untersucht (Abb. 28 A). Wildtyp-PrP (*PrP*•PrP) wird nahezu vollständig ins ER importiert, posttranslational glykosyliert und über einen GPI-Anker in der Plasmamembran verankert. Erkennbar ist dies im Western Blot durch die ausgeprägte glykosylierte Proteinfraction sowie in der Immunfluoreszenz durch die Detektion des Proteins an der Plasmamembran nicht-permeabilisierter Zellen (Abb.28 B, grüne Markierung und 28 C). Beide Merkmale treten auch bei *Sho*•PrP, *Som*•PrP und *APP*•PrP auf, was belegt, dass die chimären Konstrukte quantitativ ins ER importiert werden. Darüber hinaus ergab die Immunfluoreszenz-Analyse permeabilisierter Zellen, dass keines der chimären PrP-Konstrukte eine mitochondriale Lokalisierung aufweist (Abb. 28 D).

Offensichtlich leiten die ER-Signalpeptide von Sho, Som und APP das strukturierte Protein PrP nicht zu den Mitochondrien. Zusammen mit den Analysen der vorangegangenen Abschnitte deutet dies darauf hin, dass die mitochondriale Zielsteuerungs-Aktivität der genannten Signalpeptide von strukturellen Merkmalen der Polypeptidkette abhängt.

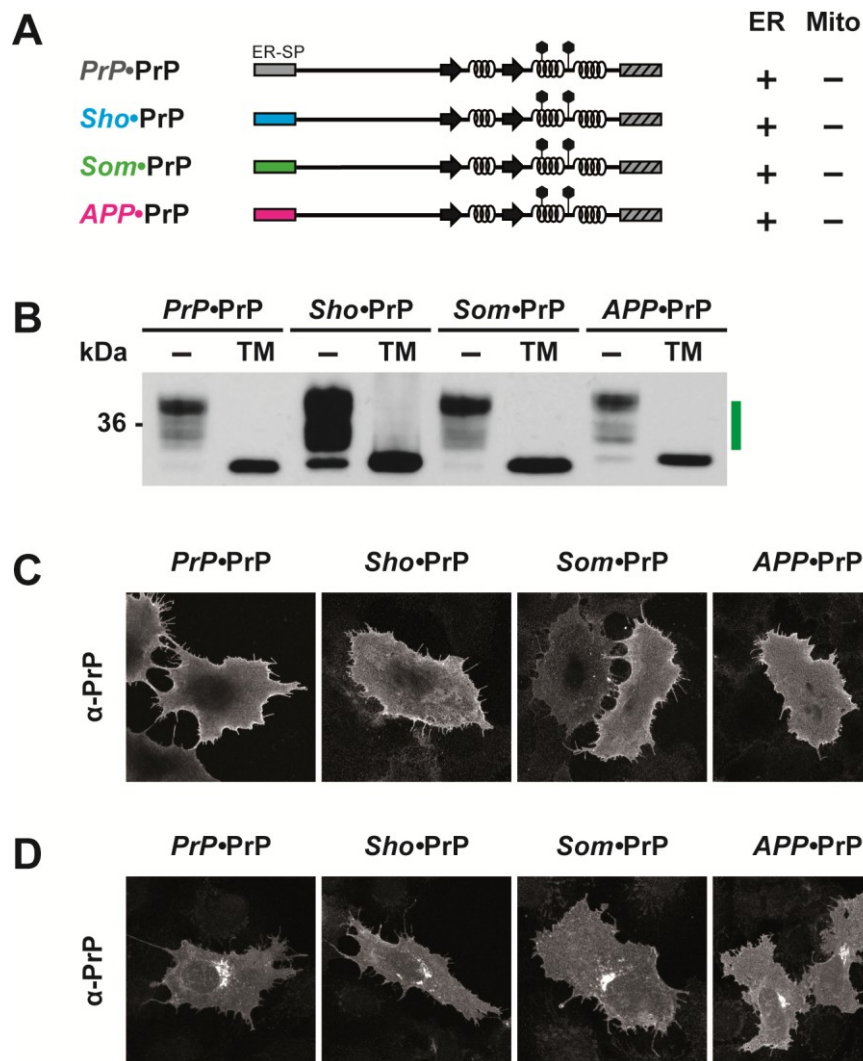


Abb. 28: Die N-terminalen Signalpeptide von Sho, Som und APP vermitteln einen effizienten ER-Import strukturierter Proteine. (A) Schematische Darstellung der analysierten Konstrukte. ER: ER-Import; Mito: mitochondriale Lokalisierung. (B) Vollängen-PrP wird unabhängig von der Art des ER-Signalpeptids ins ER importiert und posttranslational glykosyliert. N2a Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transient transfiziert. Zur Identifizierung glykosylierter Proteinfractionen wurden die Zellen 16 h mit dem Glykosylierungs-Inhibitor Tunicamycin (TM) behandelt oder unbehandelt gelassen (-). Gesamtzell-Lysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Glykosylierte Proteinfractionen sind mit einem grünen Balken markiert. Immundetektion: Anti-PrP 3F4 Antikörper, HRP-Anti-Maus Antikörper. (C) Vollängen PrP wird unabhängig von der Art des ER-Signalpeptids zur Plasmamembran geleitet. SHSY-5Y Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und die Konstrukte in nicht-permeabilisierten Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz an der Plasmamembran detektiert. Immundetektion: Anti-PrP 3F4 Antikörper, Alexa Fluor 488 Anti-Maus Antikörper. (D) Die Signalpeptide von Sho, Som und APP leiten Vollängen-PrP nicht zu den Mitochondrien. Die Versuchsdurchführung entspricht (C) mit der Ausnahme, dass die Zellen permeabilisiert worden sind.

2.2.4 Die Signalpeptide von Sho, Som und APP sind unterschiedlich starke ER-Import-Signale

Um weitere Hinweise zum Mechanismus der dualen Zielsteuerung zu erhalten, wurden die ER-Signalpeptide von Sho, Som und APP im Kontext des Modellproteins 115 α 2 α 3 untersucht. 115 α 2 α 3 besteht aus dem unstrukturierten N-Terminus (115) und der zweiten und dritten alpha-helikalen Domäne von PrP (α 2 α 3) (Abb. 29 A). 115 α 2 α 3 verfügt über weniger strukturierte Domänen als das im vorherigen Abschnitt untersuchte Vollängen-PrP. Eine vorangegangene Studie zeigte, dass *PrP*•115 α 2 α 3, das entsprechende Konstrukt mit dem ER-Signalpeptid von PrP, daher nur teilweise ins ER importiert wird (Miesbauer et al, 2009). Im Western Blot zeigt *PrP*•115 α 2 α 3 eine glykosylierte Proteinfraction und zwei unglykosylierte Fraktionen (Abb. 29 B). Die unglykosylierte Bande mit höherem Molekulargewicht stellt eine zytosolische Proteinfraction ohne ER-Signalpeptid dar. Diese Proteine wurden vermutlich ins ER importiert und durch die ER-assoziierte Degradierung (ERAD) wieder ins Zytosol zurückgeleitet. Die zweite unglykosylierte Proteinfraction, repräsentiert nicht-translozierte Polypeptidketten mit einem unprozessierten ER-Signalpeptid (Miesbauer et al, 2009).

Die Analyse der chimären Modellproteine *Sho*•115 α 2 α 3, *Som*•115 α 2 α 3 und *APP*•115 α 2 α 3 ergab interessanterweise, dass diese unterschiedlich effizient ins ER importiert werden. Erkennbar ist dies an den unterschiedlichen Anteilen glykosylierter Proteinfractionen. In der Western Blot Analyse der Konstrukte zeigten sich folgende Unterschiede: *Sho*•115 α 2 α 3 liegt größtenteils glykosyliert vor, *Som*•115 α 2 α 3 weist eine schwache glykosylierte Bande auf, *APP*•115 α 2 α 3 wird nur zu einem kaum detektierbaren Anteil glykosyliert und liegt nahezu vollständig als nicht-importierte Proteinfraction mit unprozessiertem ER-Signalpeptid vor (Abb. 29 B). Die Identifizierung der glykosylierten Proteinfraction erfolgte durch Deglykosylierung mit dem Enzym PNGase F.

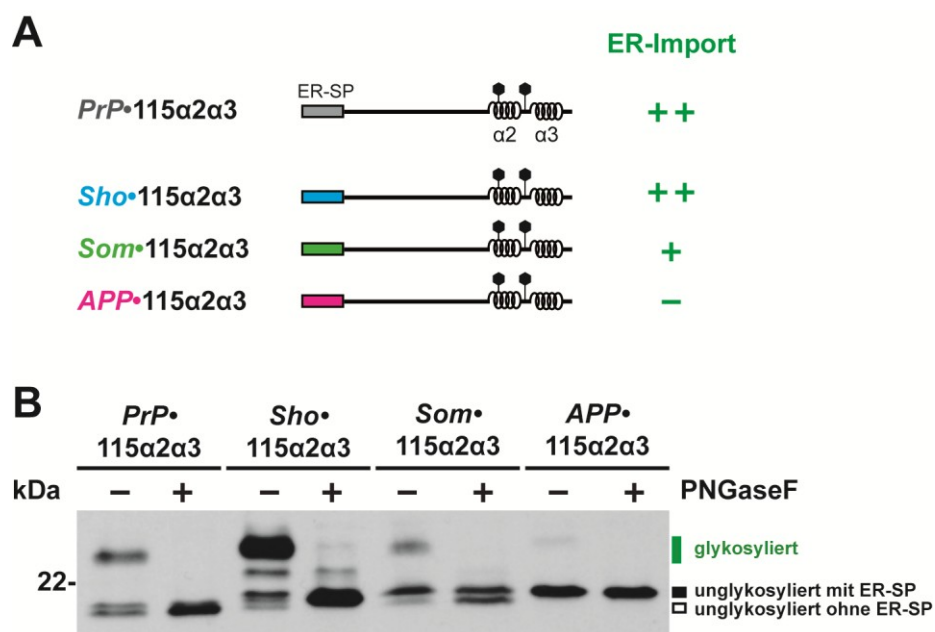


Abb. 29: Die ER-Signalpeptide von Sho, Som und APP unterscheiden sich in ihrer Stärke einen effizienten ER-Import zu vermitteln. (A) Schematische Darstellung der analysierten Konstrukte. ER-SP: ER-Signalpeptid, α : alpha-helikale Domäne, +: effizienter ER-Import, -: ineffizienter ER-Import, ausgefülltes Sechseck: Glykosylierungsstelle. **(B) Sho-, Som-, und APP-115a2a3 werden unterschiedlich stark glykosyliert.** N2a Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transient transfiziert. Die Identifizierung glykosylierter Proteinfractionen erfolgte durch Behandlung von Gesamtzell-Lysaten mit PNGase F. Dieses Enzym spaltet N-glykosidisch verknüpfte Oligosaccharide, wodurch sich das elektrophoretische Laufverhalten der glykosylierten Proteine beschleunigt. Dies ist als Signalverstärkung der unglykosylierten Bande ohne ER-Signalpeptid erkennbar. Gesamtzell-Lysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Glykosylierte Proteinfractionen sind mit einem grünen Balken markiert. ■ unglykosylierte Proteinfraction mit ER-Signalpeptid (nicht-transloziert). □ unglykosylierte Proteinfraction ohne ER-Signalpeptid (ins ER transloziert, ERAD-Substrat). *Immundetektion:* Anti-PrP 3F4 Antikörper, HRP-Anti-Maus Antikörper.

Dieses Experiment zeigt, dass die ER-Signalpeptide von Sho, Som und APP, im Kontext eines partiell ins ER importierten Proteins, unterschiedlich effiziente ER-Import-Signale darstellen. Derartige sequenzabhängige Einflüsse auf die Translokationseffizienz sind auch für andere ER-Signalpeptide beschrieben (Heller et al, 2003; Kang et al, 2006).

2.2.5 Die mitochondriale Lokalisation von sekretorischen Proteinen kann zur Schädigung von Mitochondrien führen

Als nächstes wurde die zelluläre Lokalisation der im vorherigen Abschnitt beschriebenen chimären 115 α 2 α 3-Konstrukte bestimmt. Hierfür wurden *Sho*•115 α 2 α 3, *Som*•115 α 2 α 3 und *APP*•115 α 2 α 3 einer Immunfluoreszenz-Analyse unterzogen. Überraschenderweise wurde beobachtet, dass viele transfizierte Zellen keine Färbung der Mitochondrien durch den Farbstoff *Mitotracker Red CMXRos* aufwiesen (Abb. 30 B, links, weiße Umrandungen). Eine Zweitfärbung des endogenen mitochondrialen Proteins Tom 20 ergab, dass die Mitochondrien vorhanden waren. Da der Farbstoff *Mitotracker Red CMXRos* Membranpotential-abhängig in Mitochondrien aufgenommen wird, werden nur Organellen mit intaktem Membranpotential angefärbt. Geschädigte Mitochondrien hingegen sind nicht sichtbar. Offenbar führt die Expression von *Sho*•-, *Som*•- und *APP*•115 α 2 α 3 also in einigen Zellen zu einer Schädigung des mitochondrialen Membranpotentials. Die Tom 20-Färbung zeigte außerdem, dass die Mitochondrien der transfizierten Zellen fragmentiert sind und dass *Sho*•-, *Som*•- und *APP*•115 α 2 α 3 mit den Mitochondrien kolokalisieren. Dies lässt vermuten, dass die mitochondriale Dysfunktion der transfizierten Zellen durch eine Zielsteuerung der Konstrukte zu den Mitochondrien bedingt ist. Die in den vorherigen Abschnitten analysierten mitochondrial lokalisierten Konstrukte wiesen ein unprozessiertes ER-Signalpeptid auf. Es ist daher wahrscheinlich, dass im Fall der 115 α 2 α 3-Konstrukte nur die nicht-translozierte Proteinfraction mit ungeschnittenem ER-Signalpeptid einer mitochondrialen Zielsteuerung unterliegt (Abb. 29 B, ■).

Zur genaueren Charakterisierung der mitochondrialen Toxizität wurden drei weitere Konstrukte in die Analyse mit aufgenommen, *PrP*•115 α 2 α 3, Δ *SP*•115 α 2 α 3 und *UCR*•115 α 2 α 3 (Abb. 30 B, rechts). Zellen, die mit *PrP*•115 α 2 α 3, dem Konstrukt mit dem ER-Signalpeptid von PrP oder Δ *SP*•115 α 2 α 3, einem Konstrukt ohne ER-Signalpeptid transfiziert worden waren, wiesen intakte Mitochondrien auf. Dies kann als Hinweis dafür gesehen werden, dass keine unspezifische Schädigung der Mitochondrien durch eine Überexpression schlecht oder nicht ins ER translozierter Proteine vorliegt.

Das Konstrukt *UCR*•115 α 2 α 3 mit der mitochondrialen Signalsequenz des Proteins UCR1 (Ubiquinol Cytochrom C Reduktase Komplex Untereinheit 1) war erwartungsgemäß mitochondrial lokalisiert, induzierte jedoch kein verringertes Membranpotential. Dieses Ergebnis zeigt, dass eine Schädigung der Mitochondrien offenbar nur auftritt, wenn 115 α 2 α 3 durch das ER-Signalpeptid von Sho, Som oder APP zu den Mitochondrien geleitet wird.

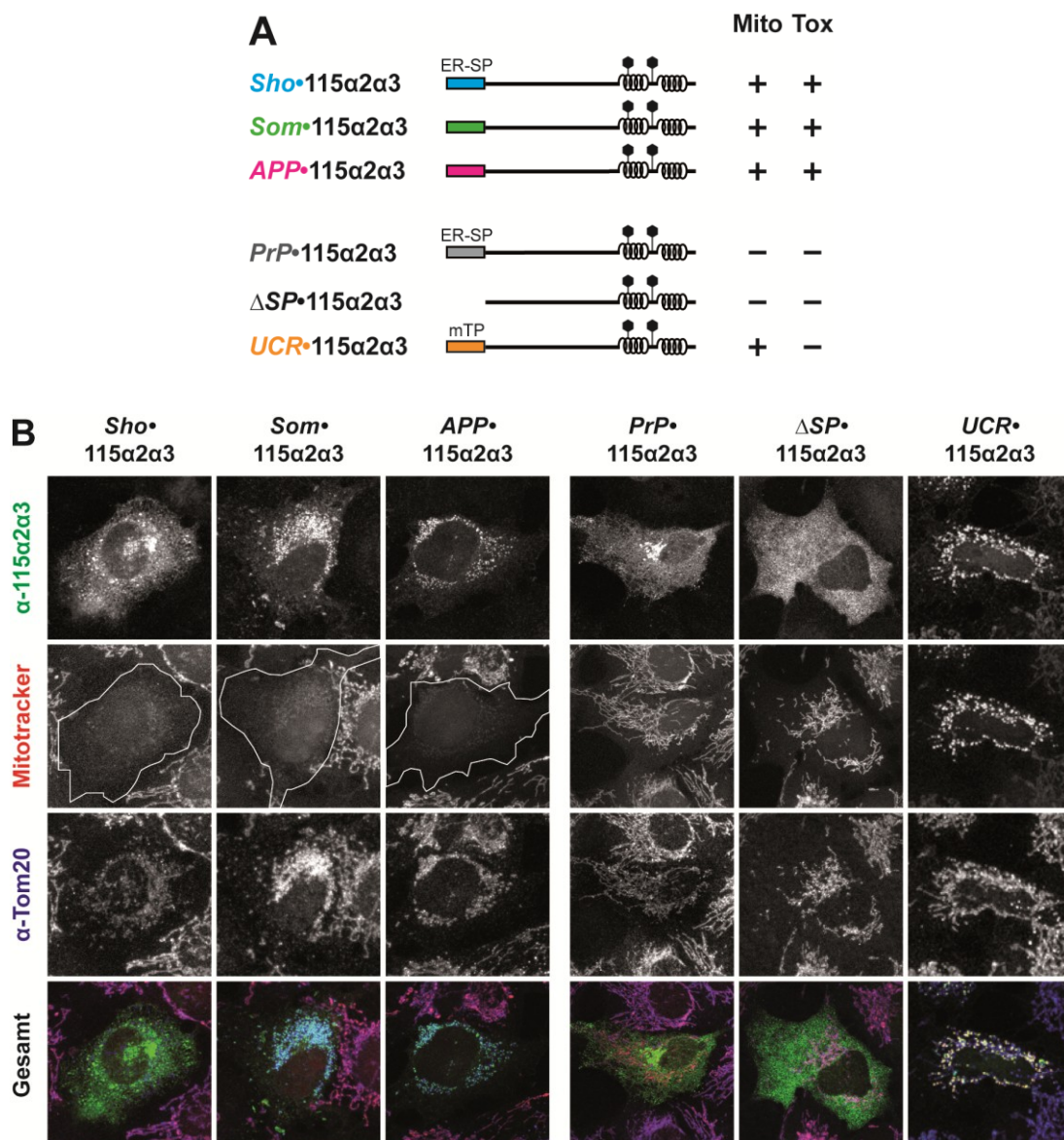


Abb. 30: Mitochondriale Schädigung durch Fehllokalisierung sekretorischer Proteine. (A) Schematische Darstellung der analysierten Konstrukte. ER-SP: ER-Signalpeptid, mTP: mitochondriales *Targeting*peptid (mitochondriale Signalsequenz), Mito: mitochondriale Lokalisierung, Tox: Schädigung des mitochondrialen Membranpotentials. (B) Die Expression von *Sho*•-, *Som*•- und *APP*•115 α 2 α 3 führt zur

Fragmentierung von Mitochondrien sowie zur Schädigung des Membranpotentials.

SHSY-5Y Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und die Konstrukte in permeabilisierten Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz detektiert. Der Nachweis einer Kolo-kalisation mit Mitochondrien erfolgte durch Färbung der Mitochondrien mittels Detektion des endogenen Proteins TOM 20. Eine Schädigung des mitochondrialen Membranpotentials wurde durch Färbung mit Mitotracker Red CMXRos nachgewiesen. Mitochondrien mit geschädigtem Membranpotential werden durch diesen Fluoreszenzfarbstoff nicht angefärbt. Zellen ohne Mitotracker-Färbung sind weiß umrandet. *Immundetektion:* 115α2α3-Konstrukte (Anti-PrP 3F4 Antikörper, Alexa Fluor 488 Anti-Maus Antikörper), Mitochondrien (Anti-Tom 20 Antikörper, Alexa Fluor 647 Anti-Kaninchen Antikörper; Mitotracker Red CMXRos).

Die Quantifizierung der mitochondrialen Schädigung belegt außerdem einen deutlichen Unterschied im Ausmaß der Toxizität (Abb.31). Nach Überexpression von APP•115α2α3 ist in rund 80 % der transfizierten Zellen das mitochondriale Membranpotential geschädigt. Sho•115α2α3 und Som•115α2α3 führen nur zu einer moderaten Toxizität.

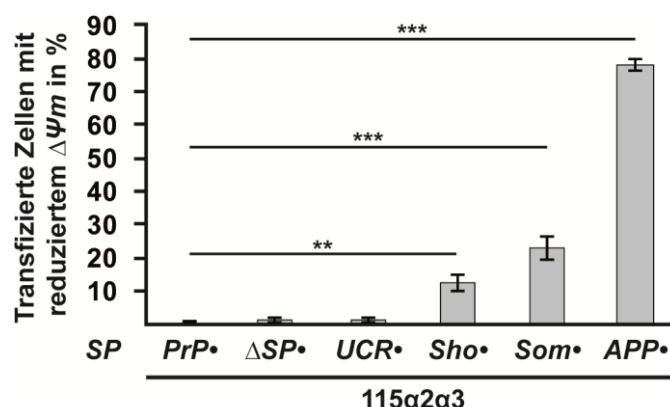


Abb. 31: Sho-, Som- und APP•115α2α3 unterscheiden sich im Ausmaß der mitochondrialen Schädigung.

SHSY-5Y Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und die transfizierten Konstrukte in permeabilisierten Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz detektiert. Eine Schädigung des mitochondrialen Membranpotentials wurde durch Färbung der Mitochondrien mit dem Fluoreszenzfarbstoff Mitotracker Red CMXRos nachgewiesen. Zur Quantifizierung der mitochondrialen Toxizität wurde der prozentuale Anteil transfizierter Zellen mit geschädigtem Membranpotential bestimmt. Die Auswertung basiert auf drei unabhängigen Versuchen. Je Konstrukt wurden mindestens 600 transfizierte Zellen ausgewertet. Gezeigt sind die Mittelwerte mit der jeweils zugehörigen Standardabweichung. Signifikanz (Studentscher t-Test): ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$. *Immundetektion:* 115α2α3-Konstrukte (Anti-PrP 3F4 Antikörper, Alexa Fluor 488 Anti-Maus Antikörper), Mitochondrien (Mitotracker Red CMXRos). $\Delta\Psi_m$: mitochondriales Membranpotential.

2.2.6 Charakterisierung der mitochondrialen Toxizität von *APP•115α2α3*

Eine genauere Charakterisierung der im vorherigen Abschnitt beschriebenen mitochondrialen Schädigung erfolgte anhand des am stärksten toxischen Konstruktes *APP•115α2α3*.

2.2.6.1 Die Überexpression von *APP•115α2α3* führt zu einem verminderten mitochondrialen Import von TRAP-1

Zunächst wurde der Frage nachgegangen inwieweit die Mitochondrien durch die Fehllokalisierung sekretorischer Proteine funktionell geschädigt werden. Hierfür wurde am Beispiel des Chaperons TRAP-1 (tumor necrosis factor receptor associated *protein-1*) untersucht, ob die Biogenese mitochondrialer Proteine beeinträchtigt ist. TRAP-1 ist ein nukleär kodiertes mitochondriales Matrixprotein (*TNF receptor-associated protein 1*, (Matassa et al, 2012)). Während des Imports des Proteins in die Mitochondrienmatrix wird die N-terminale Signalsequenz von TRAP-1 entfernt. Da die importierte Proteinfraction von TRAP-1 daher eine geringere Molekularmasse besitzt, kann sie im Western Blot von der nicht-importierten Fraction unterschieden werden.

Abbildung 32 zeigt die Koexpression von TRAP-1 mit dem mitotoxischen Konstrukt *APP•115α2α3* oder nicht-toxischen Kontroll-Konstrukten. Deutlich ist zu erkennen, dass die Koexpression mit *APP•115α2α3* zur Akkumulation der nicht-importierten Proteinfraction von TRAP-1 führt (Abb. 32 A, ○). Dieses Ergebnis bestätigt sich in der Immunfluoreszenz-Analyse (Abb. 32 B). Unter Koexpression von *APP•115α2α3* wird TRAP-1 in signifikanten Mengen im Zytosol detektiert. Gleiches passiert jedoch nicht unter Koexpression von *UCR•115α2α3*, der Mutante mit einer endogenen mitochondrialen Signalsequenz.

Die Akkumulation von TRAP-1 im Zytosol zeigt, dass die durch *APP•115α2α3* geschädigten Mitochondrien TRAP-1 nicht mehr korrekt importieren.

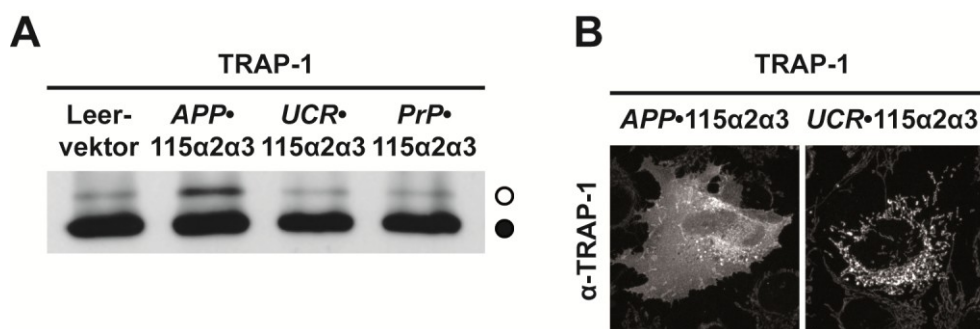


Abb. 32: Die Expression von *APP•115α2α3* verringert den mitochondrialen Import des Proteins TRAP-1. (A) Unter Koexpression mit *APP•115α2α3* akkumuliert die nicht-translozierte Fraktion von TRAP-1. SHSY-5Y Zellen wurden transient mit TRAP-1 und den angegebenen Konstrukten oder pcDNA3.1 zeo(+) (Leervektor) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und Gesamtzell-Lysate mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. ○: Nicht in die Mitochondrienmatrix translozierte Proteinfraction mit ungeschnittener mitochondrialer Signalsequenz, ●: In die Mitochondrienmatrix translozierte Proteinfraction mit prozessierter mitochondrialer Signalsequenz. *Immunodetektion:* Anti-TRAP 1 Hsp75 (42) Antikörper, HRP-Anti-Maus Antikörper. **(B) Die Koexpression mit *APP•115α2α3* führt zur Akkumulation von TRAP-1 im Zytosol.** SHSY-5Y Zellen wurden mit TRAP-1 und den angegebenen Konstrukten kotransfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und die transfizierten Konstrukte in permeabilisierten Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz detektiert. Die Kontroll-Detektion der 115α2α3-Konstrukte ist nicht gezeigt. *Immunodetektion:* TRAP-1 (Anti-TRAP 1 Hsp75 (42) Antikörper, Alexa Fluor 555 Anti-Maus Antikörper), 115α2α3-Konstrukte (Anti-PrP A7 Antikörper, Alexa Fluor 488 Anti-Kaninchen Antikörper).

2.2.6.2 *APP•115α2α3* wird in die Mitochondrien importiert

Um weitere Einblicke in den Mechanismus der Toxizität von *APP•115α2α3* zu erhalten, wurde die mitochondriale Lokalisierung des Proteins näher charakterisiert. Hierzu wurden Mitochondrien aus transfizierten SHSY-5Y Zellen isoliert und anschließend einer proteolytischen Behandlung mit Proteinase K (PK) unterzogen. Nach PK-Verdau sind im Western Blot nur noch Proteine detektierbar, welche innerhalb der Mitochondrien lokalisiert sind. Proteine, die nur äußerlich mit den Mitochondrien assoziiert sind oder Proteine der mitochondrialen Außenmembran, werden durch PK degradiert. Der post-mitochondriale Überstand (pmÜ), welcher zytosolische Proteine enthält, wurde zusätzlich analysiert.

Die Western Blot Analyse ergab, dass *APP*•115 α 2 α 3 nur in der mitochondrialen Fraktion signifikant vorhanden ist und demzufolge sehr effizient zu den Mitochondrien geleitet wird (Abb. 33). Darüber hinaus nimmt die Signalstärke von *APP*•115 α 2 α 3 unter PK-Verdau (ohne Detergenz) nicht ab, was darauf hinweist, dass sich das Protein innerhalb der Mitochondrien befindet. Die Möglichkeit, dass *APP*•115 α 2 α 3 nicht durch PK abgebaut wird, da es PK-resistent ist, wurde durch Zugabe von Triton X-100 adressiert. Das Detergenz zerstört die Integrität der Mitochondrienmembranen, wodurch *APP*•115 α 2 α 3 nicht mehr protektiert ist und von PK degradiert wird.

Als Kontroll-Proteine dienten die endogenen Proteine Tim 23, Tom 20 und Aktin. Tim 23 befindet sich in der inneren Mitochondrienmembran und ist daher in intakten Mitochondrien vor einem PK-Verdau geschützt. Tom 20 ist ein Protein der äußeren Mitochondrienmembran und wurde, wie das zytosolische Markerprotein Aktin, durch PK abgebaut.

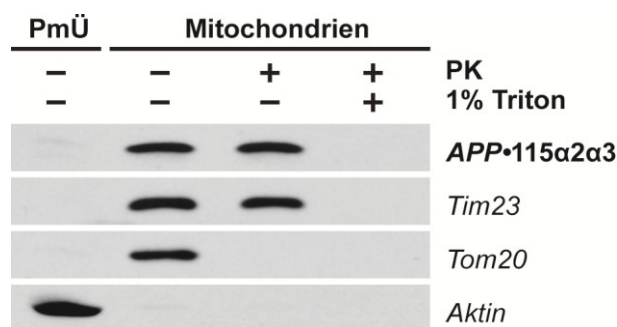


Abb. 33: *APP*•115 α 2 α 3 wird effizient zu den Mitochondrien geleitet und in diese importiert. SHSY-5Y Zellen wurden transient mit *APP*•115 α 2 α 3 transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet, in Mitopuffer (MP) resuspendiert und mehrmals durch eine 27G-Kanüle gezogen. Die so aufgeschlossenen Zellen wurden anschließend einer differentiellen Zentrifugation unterzogen. Zunächst wurden bei 700 g unaufgeschlossene Zellen und Zellkerne entfernt. Anschließend wurden durch Zentrifugation bei 10.000 g die Mitochondrien abzentrifugiert. Der dabei erhaltene Überstand (post-mitochondrialer Überstand) enthält die zytosolischen Proteine und wurde ebenfalls analysiert. Die isolierten Mitochondrien wurden zu gleichen Teilen aliquotiert und für 30 min auf Eis mit MP ohne Zusätze, MP mit Proteinase K (PK) oder MP mit PK und Triton inkubiert. Nach Zugabe des Proteaseinhibitors DMSO wurden alle Proben mit Laemmli-Probenpuffer versetzt und gleiche Proteinmengen mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Als Kontrollen wurden die endogenen Proteine Tim 23, Tom 20 und Aktin detektiert. *Immundetektion:* Monoklonaler Anti-PrP 3F4 Antikörper, monoklonaler Anti-Tim 23 Antikörper, polyklonaler Anti-Tom 20 Antikörper, monoklonaler Anti-Aktin Antikörper; HRP-Anti-Maus Antikörper, HRP-Anti-Kaninchen Antikörper.

Obige Analyse weist darauf hin, dass *APP*•115 α 2 α 3 in die Mitochondrien importiert wird und nicht nur äußerlich mit diesen assoziiert ist. Dieses Ergebnis legt nahe, dass das ER-Signalpeptid von APP nicht nur eine Zielsteuerung zu den Mitochondrien vermittelt, sondern auch einen Import in die Mitochondrien. Eine Aussage darüber in welchem Kompartiment der Mitochondrien (Matrix, Intermembranraum, innere oder äußere Membran) sich *APP*•115 α 2 α 3 befindet, kann auf Basis dieser Analyse jedoch nicht getroffen werden.

2.2.6.3 Die mitochondriale Toxizität von *APP*•115 α 2 α 3 hängt mit der Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke zusammen

Wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben, werden die beiden unstrukturierten Proteine *APP*•115 und *APP*•Tau zu den Mitochondrien geleitet. Im Gegensatz zu *APP*•115 α 2 α 3 induzieren sie aber weder eine Fragmentierung der Mitochondrien noch eine Schädigung des Membranpotentials. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass der strukturierte Teil von *APP*•115 α 2 α 3 für die Toxizität des Konstrukts von Bedeutung ist. Für das alpha-helikale PrP-Fragment α 2 α 3 ist bekannt, dass die beiden darin enthaltenen Cysteine unter oxidierenden Bedingungen eine Disulfidbrücke ausbilden (Abb. 34 A). Vor einigen Jahren wurde entdeckt, dass im Intermembranraum der Mitochondrien ein Disulfidbrücken-Transfersystem existiert, das sogenannte Mia40/Erv1-System (1.1.3.1) (Herrmann & Kohl, 2007; Stojanovski et al, 2012). Falls *APP*•115 α 2 α 3 beim Import in die Mitochondrien Zugang zum Intermembranraum hat, könnte es daher sein, dass dessen Cysteinreste eine Disulfidbrücke ausbilden. Um dieser Möglichkeit nachzugehen, wurden die Cysteine *APP*•115 α 2 α 3 durch Alanine substituiert. Die entsprechende Mutante *APP*•115 α 2 α 3AA zeigte in der Western Blot Analyse keine Unterschiede zu *APP*•115 α 2 α 3 (Abb. 34 B). Dies war in der Immunfluoreszenz-Analyse anders. Obwohl beide Konstrukte mitochondrial lokalisiert sind, war in Zellen, die mit *APP*•115 α 2 α 3AA transfiziert worden waren deutlich seltener eine Fragmentierung der Mitochondrien und/oder Schädigung des Membranpotentials zu beobachten (Abb. 34 C). Ein quantitativer Vergleich der mitochondrialen Toxizität beider Konstrukte verdeutlichte, dass die Expression von *APP*•115 α 2 α 3AA signifikant seltener zur Dysfunktion der Mitochondrien führt (Abb. 34 D). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Toxizität *APP*•115 α 2 α 3 mit der Ausbildung einer Disulfidbrücke im Zusammenhang steht. Außerdem könnte es ein Hinweis dafür

sein, dass *APP*•115α2α3 in den Intermembranraum der Mitochondrien transloziert und dort durch Mia40 oxidiert wird.

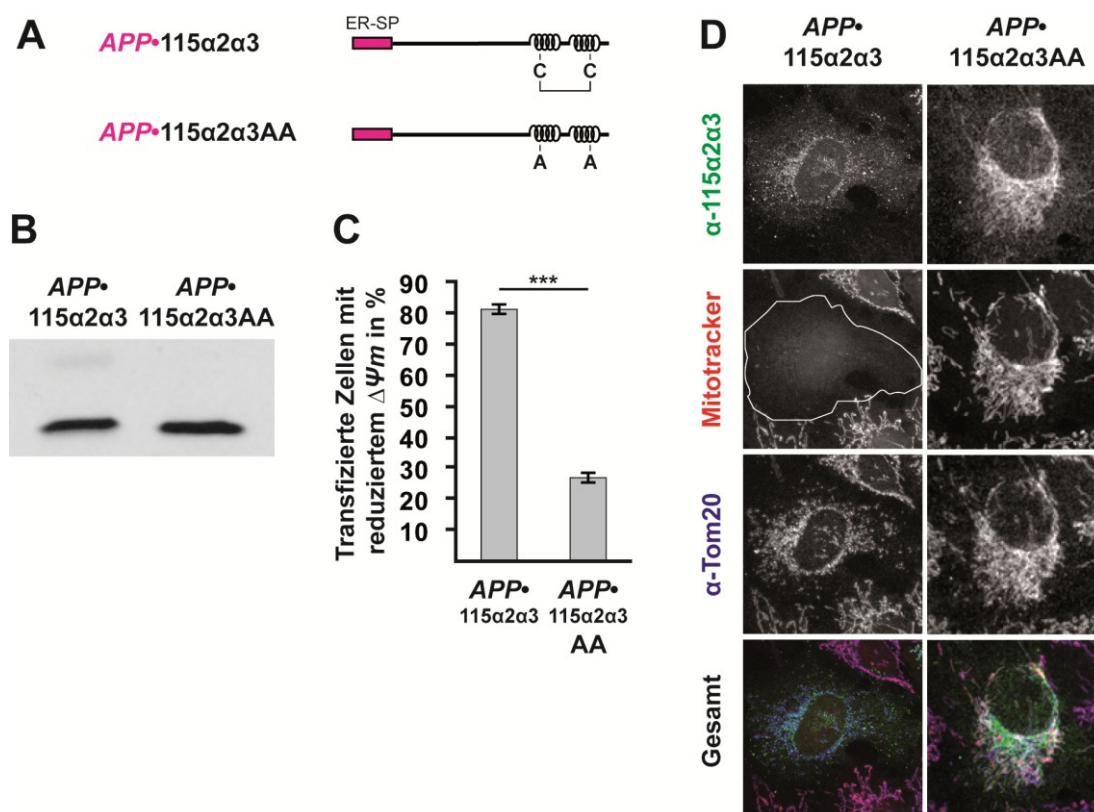


Abb. 34: Die Tertiärstruktur von *APP*•115α2α3 beeinflusst dessen mitochondriale Toxizität. (A) Schematische Darstellung der analysierten Konstrukte. ER-SP: ER-Signalpeptid, C: Cystein, A: Alanin. (B) *APP*•115α2α3AA wird nicht ins ER importiert. N2a Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transient transfiziert und Gesamtzell-Lysate mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Immunodetektion: Anti-PrP 3F4 Antikörper, HRP-Anti-Maus Antikörper. (C) *APP*•115α2α3AA zeigt im Großteil der Zellen eine Kolokalisation mit intakten Mitochondrien. SHSY-5Y Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transient transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und die Konstrukte in permeabilisierten Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz detektiert. Der Nachweis einer Kolokalisation mit Mitochondrien erfolgte durch Färbung der Mitochondrien mittels Detektion des endogenen Proteins TOM 20. Eine Schädigung des mitochondrialen Membranpotentials wurde durch Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Mitotracker Red CMXRos nachgewiesen. Mitochondrien mit geschädigtem Membranpotential werden durch diesen Farbstoff nicht angefärbt. Immunodetektion: 115α2α3-Konstrukte (Anti-PrP 3F4 Antikörper, Alexa Fluor 488 Anti-Maus Antikörper), Mitochondrien (Anti-Tom 20, Alexa Fluor 647 Anti-Kaninchen Antikörper; Mitotracker Red CMXRos). (D) Durch Substitution der Cysteine von *APP*•115α2α3 wird dessen Toxizität signifikant reduziert. SHSY-5Y Zellen wurden

mit den angegebenen Konstrukten transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und die transfizierten Konstrukte in permeabilisierten Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz detektiert. Eine Schädigung des mitochondrialen Membranpotentials wurde durch Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Mitotracker Red CMXRos nachgewiesen. Zur Quantifizierung der mitochondrialen Toxizität wurde der prozentuale Anteil transfizierter Zellen mit geschädigtem Membranpotential bestimmt. Die Auswertung basiert auf drei unabhängigen Versuchen. Je Konstrukt wurden mindestens 600 transfizierte Zellen ausgewertet. Gezeigt sind die Mittelwerte mit der jeweils zugehörigen Standardabweichung. Signifikanz (Studentischer *t*-Test): *** $p < 0,0005$. *Immundetektion*: Anti-PrP 3F4 Antikörper, Alexa Fluor 488 Anti-Maus Antikörper, Mitotracker Red CMXRos. $\Delta\Psi_m$: mitochondriales Membranpotential.

2.2.7 Bioinformatische Charakterisierung der Signalpeptide von Sho, Som und APP

Um die Frage zu adressieren, welche Merkmale der ER-Signalpeptide von Sho, Som und APP die mitochondriale Zielsteuerung vermitteln, wurden diese mittels bioinformatischer Analysen näher charakterisiert. Als Kontroll-Signalpeptide dienen das ER-Signalpeptid von PrP sowie die mitochondriale Signalsequenz von UCR1.

Zunächst erfolgte eine *TargetP*-Analyse der genannten Signalpeptide im Kontext des jeweiligen Wildtypproteins. *TargetP* ist ein Programm zur Aminosäuresequenz-basierten Vorhersage N-terminaler Signalsequenzen und erkennt sowohl ER-Signalpeptide (ER-SP) als auch mitochondriale Signalsequenzen (mTP, *mitochondrial targeting peptide*) (Emanuelsson et al, 2000). Die *TargetP*-Analyse von Shadoo, Somatostatin und APP ergab, dass bei keinem der Proteine eine mitochondriale Signalsequenz vorhergesagt wird (Abb. 35). Alle drei Signalpeptide werden als reine ER-Signalpeptide erkannt. Die Vorhersagesicherheit lag dabei vergleichbar hoch wie für PrP. Umgekehrt erkennt das Programm bei dem endogenen mitochondrialen Protein UCR1 (Ubiquinol Cytochrom C Reduktase Komplex Untereinheit 1) mit hoher Sicherheit dessen mitochondriale Signalsequenz. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit den Vorhersageprogrammen *SignalP*, *MitoProt*, *Protein Prowler*, *Predator* und *Wolf Psort* erzielt.

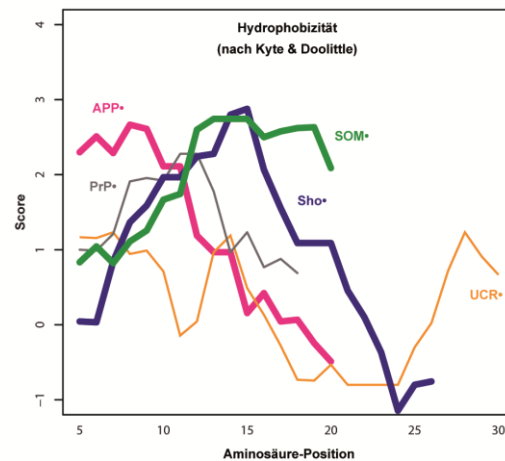
Diese Analyse ergab, dass die derzeit verfügbaren Vorhersage-Algorithmen nicht für die Vorhersage einer durch ER-Signalpeptide vermittelten mitochondrialen Zielsteuerung geeignet sind.

Zur weiteren Analyse wurden die biophysikalischen Eigenschaften der genannten Signalpeptide charakterisiert. Hierfür wurde deren Hydrophobizität, Polarität und Helizität mit dem Programm *ProtScale* vorhergesagt und die Ergebnisse mit Hilfe des Statistikprogramms „R“ (www.r-project.org) in je einer Abbildung vereint (Abb. 35 B, C und D). Falls die mitochondriale Zielsteuerung der Signalpeptide *Sho*^{*}, *Som*^{*} und *APP*^{*} durch die untersuchten biophysikalischen Eigenschaften vermittelt wird, wären Unterschiede zum Signalpeptid von PrP und eventuell eine Ähnlichkeit zum mTP von UCR1 zu erwarten. Die Vorhersagen zeigen allerdings, dass die Signalpeptide von Sho, Som und APP in den untersuchten Eigenschaften kein Merkmal aufweisen, welches sie klar von der Kontroll-Signalsequenz PrP unterscheidet. Andererseits zeigen die Signalpeptide auch keine deutlichen Gemeinsamkeiten mit dem mTP *UCR*^{*}.

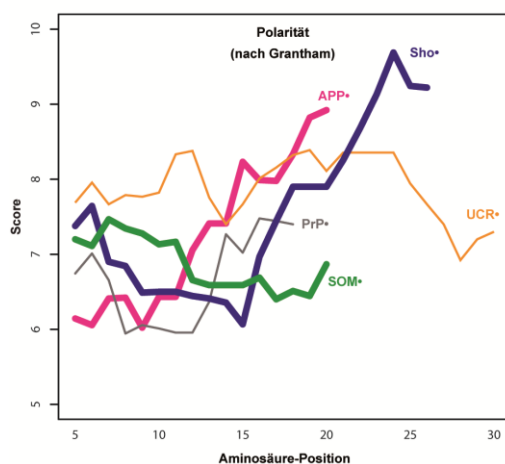
A

Protein	TargetP	
	ER-SP	mTP
PrP	0.943	0.021
Sho	0.971	0.045
Som	0.827	0.139
APP	0.937	0.035
UCR1	0.022	0.944

B



C



D

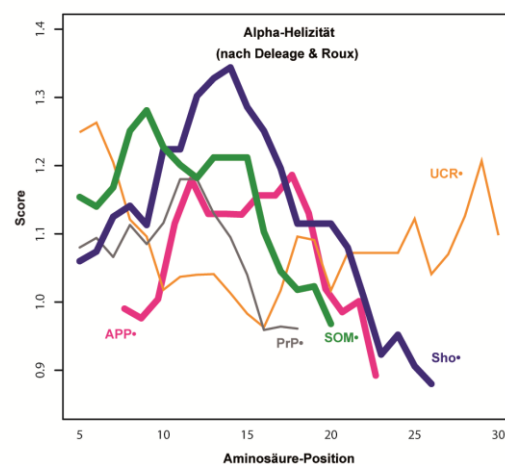


Abb. 35: Bioinformatische Analysen der untersuchten Signalpeptide. (A) Vorhersage der zellulären Lokalisation durch das Programm TargetP. Die Vorhersage erfolgte durch Analyse der Wildtyp-Proteine. Verwendete Einstellungen: *non-plant* und *no-cutoffs*. Protein: analysiertes Wildtyp-Protein, ER-SP: Vorhersagewahrscheinlichkeit für die Anwesenheit eines ER-Signalpeptids, mTP: Vorhersagewahrscheinlichkeit für die Anwesenheit einer mitochondrialen Signalsequenz (*mitochondrial targeting peptide*). **(B,C,D) Protscale-Vorhersagen der Hydrophobizität nach Kyte & Doolittle (B), Polarität nach Grantham (C) und Alpha-Helizität nach Deleage & Roux (D).** Die Vorhersage erfolgte durch Analyse der Aminosäuresequenzen der angegebenen Signalpeptide: *PrP*• (MANLGYWLLALFVTMW TDVGLC), *Sho*• (MNWAPATCWALLLAAAFCLDSGAAGKGRGG), *Som*• (MLSCRLQCAL AALSIVLALGCVTG), *APP*• (MLPGLALLLLAAWTARALEVPTDG), *UCR*• (MAASAVCR AACSGTQVLLRTRRSPALLRLPALRG).

2.2.8 Inverse Korrelation zwischen ER-Import und mitochondrialer Zielsteuerung

Abbildung 36 fasst die zelluläre Lokalisierung der bisher analysierten chimären Modellproteine zusammen. Betrachtet man die Konstrukte mit den bivalenten Signalpeptiden von Sho, Som und APP fällt auf, dass die Art der vermittelten Zielsteuerung von der Sekundärstruktur der Polypeptidkette abzuhängen scheint. Im Kontext von PrP, einem Protein mit einem hohen Anteil alpha-helikaler Domänen, vermitteln die genannten Signalpeptide eine Zielsteuerung ins ER. Vorwiegend unstrukturierte Proteine wie 115, Tau oder 115 α 2 α 3 werden hingegen zu den Mitochondrien geleitet. Außerdem ergab die Analyse der entsprechenden Konstrukte mit dem ER-Signalpeptid von PrP, dass *PrP*•115, *PrP*•Tau und *PrP*•115 α 2 α 3 einen geringen ER-Import aufweisen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Effizienz der ER-Translokation und der mitochondrialen Zielsteuerung bestehen könnte.

		ER	Mito
<i>PrP</i> •115		-	-
<i>Sho</i> •115		-	+
<i>Som</i> •115		-	+
<i>APP</i> •115		-	+
<i>PrP</i> •Tau		-	-
<i>Sho</i> •Tau		-	+
<i>Som</i> •Tau		-	+
<i>APP</i> •Tau		-	+
<i>PrP</i> •115α2α3		++	-
<i>Sho</i> •115α2α3		++	+
<i>Som</i> •115α2α3		+	+
<i>APP</i> •115α2α3		-	+
<i>PrP</i> •PrP		+++	-
<i>Sho</i> •PrP		+++	-
<i>Som</i> •PrP		+++	-
<i>APP</i> •PrP		+++	-

Abb. 36: Die mitochondriale Zielsteuerung durch ER-Signalpeptide hängt von der Sekundärstruktur der Polypeptidkette ab. Unstrukturierte Proteine werden durch die Signalpeptide von Sho, Som und APP zu den Mitochondrien geleitet. Alpha-helikale Domänen verringern/verhindern die mitochondriale Zielsteuerung. ER: ER-Import, +++: quantitativer ER-Import, ++: moderater ER-Import, +: geringer ER-Import, -: kein/kaum ER-Import. Mito: Mitochondriale Zielsteuerung, +: mitochondriale Lokalisation vorhanden, -: keine mitochondriale Lokalisation. ER-SP: ER-Signalpeptid, Pfeil: β -Faltblatt Domäne, Spirale: α -helikale Domäne, ausgefülltes Sechseck: endogene Glykosylierungsstelle, unausgefülltes Sechseck: artifizielle Glykosylierungsstelle, schraffiertes Rechteck: GPI-Signalsequenz.

Ein weiterer Hinweis für einen funktionalen Zusammenhang zwischen der Effizienz der ER-Translokation und der mitochondrialen Zielsteuerung ergab sich aus der Analyse der dual lokalisierten 115 α 2 α 3-Konstrukte. Wie im Abschnitt 2.2.4 erläutert worden ist, werden die Konstrukte *Sho*•115 α 2 α 3, *Som*•115 α 2 α 3 und *APP*•115 α 2 α 3 mit unterschiedlicher Effizienz ins ER importiert. Darüber hinaus wurde in Abschnitt 0 gezeigt, dass die drei Konstrukte auch zu den Mitochondrien geleitet werden. Dort führen sie zu einer Fragmentierung der Mitochondrien und zur Schädigung des Membranpotentials.

Ein quantitativer Vergleich von Glykosylierung und Mitotoxizität ergab, dass die beiden Merkmale invers miteinander korrelieren (Abb. 37). *Sho*•115 α 2 α 3 liegt zu fast 90 % in der glykosylierten Form vor und wird demnach sehr effizient ins ER importiert. Gleichzeitig tritt nur in rund 12 % der transfizierten Zellen eine mitochondriale Schädigung auf. Andererseits werden im Fall von *APP*•115 α 2 α 3 nur rund 6 % der translatierten Proteine glykosyliert und fast 80 % der transfizierten Zellen zeigen eine Schädigung der Mitochondrien. *Som*•115 α 2 α 3 liegt bei beiden Merkmalen dazwischen und zeigt sowohl einen moderaten ER-Import wie auch eine moderate Mito-Toxizität.

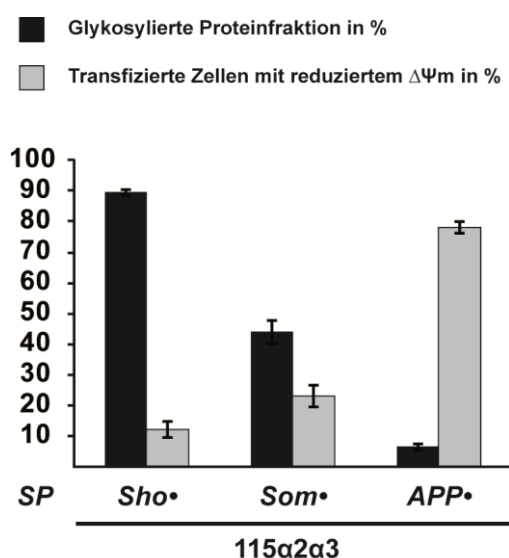


Abb. 37: Inverse Korrelation von ER-Import und mitochondrialer Toxizität.

(■) Quantifizierung der glykosylierten Proteinfraction. In drei unabhängigen Versuchen wurden N2a Zellen mit den angegebenen Konstrukten transfiziert und die Gesamzell-Lysate mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. *Immundetektion:* Anti-PrP 3F4 Antikörper, HRP-Anti-Maus Antikörper. Zur Quantifizierung der Proteinsignale wurden die Western Blot Membranen mit Amersham ECL inkubiert und in einem Chemilumineszenzmesser vermessen.

Die anschließende Auswertung erfolgte unter Verwendung der Multi Gauge Software von Fujifilm. Bestimmt wurde jeweils der Anteil der glykosylierten Proteinfraction zum Gesamteinsignal. (□) **Quantifizierung der Mitotoxizität.** Durchführung siehe Abb. 31. $\Delta\Psi_m$: mitochondriales Membranpotential. (A,B) Gezeigt sind die Mittelwerte mit der jeweils zugehörigen Standardabweichung.

Die inverse Korrelation von ER-Import und Mitotoxizität dieser Konstrukte deutet darauf hin, dass deren Zielsteuerung zu den Mitochondrien als Folge einer gescheiterten ER-Translokation auftritt. Da alle drei Signalsequenzen ER-Signalpeptide sind, wäre es möglich, dass die Konstrukte zunächst zum ER geleitet werden, dort jedoch nur ein Teil der Proteine transloziert und nicht-translozierte Proteine anschließend zu den Mitochondrien geleitet werden. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde im Folgenden untersucht, ob eine Modulation der ER-Translokationseffizienz zu einer veränderten mitochondrialen Zielsteuerung führt.

2.2.9 Durch die Verbesserung des ER-Imports wird die Mitotoxizität von *APP•115 α 2 α 3* signifikant verringert

Um den Mechanismus der dualen Zielsteuerung durch bivalente ER-Signalpeptide zu charakterisieren, sollte zunächst überprüft werden, ob durch eine Verbesserung der ER-Translokationseffizienz eines Konstrukts dessen mitochondriale Zielsteuerung verringert werden kann.

Zu Beginn dieser Arbeit wurden Daten vorgestellt, die zeigen, dass eine C-terminale GPI-Signalsequenz den ER-Import schlecht-importierter Proteine erhöht. Basierend auf dieser Beobachtung wurde untersucht, ob durch Fusion der GPI-Signalsequenz von PrP and das mitotoxische Konstrukt *APP•115 α 2 α 3* dessen ER-Import verbessert wird. Abbildung 38 B zeigt die Western Blot Analyse von *APP•115 α 2 α 3* und *APP•115 α 2 α 3GPI*. Die enzymatische Deglykosylierung mit PNGase F ergab, dass *APP•115 α 2 α 3GPI* fast ausschließlich glykosyliert vorliegt (Abb. 38 B, grüne Markierung). Offenbar wird *APP•115 α 2 α 3GPI* also im Gegensatz zu *APP•115 α 2 α 3* größtenteils ins ER importiert. Um zu überprüfen, ob der bessere ER-Import von *APP•115 α 2 α 3GPI* eine geringere mitochondriale Zielsteuerung bedingt, wurde eine Immunfluoreszenz-Analyse durchgeführt. Diese ergab, dass *APP•115 α 2 α 3GPI* nicht mit den Mitochondrien kolokalisiert, sondern primär im Golgi-Apparat und an der Plasmamembran detektiert wird (Abb. 38 C). Ein Vergleich der mitochondrialen Toxizität von *APP•115 α 2 α 3* und *APP•115 α 2 α 3GPI* zeigte zudem, dass das

Konstrukt mit der GPI-Signalsequenz keine mitochondriale Dysfunktion induziert (Abb. 38 D).

Diese Analyse deutet darauf hin, dass die mitochondriale Zielsteuerung von APP•115α2α3 als Folge eines gescheiterten ER-Imports auftritt.

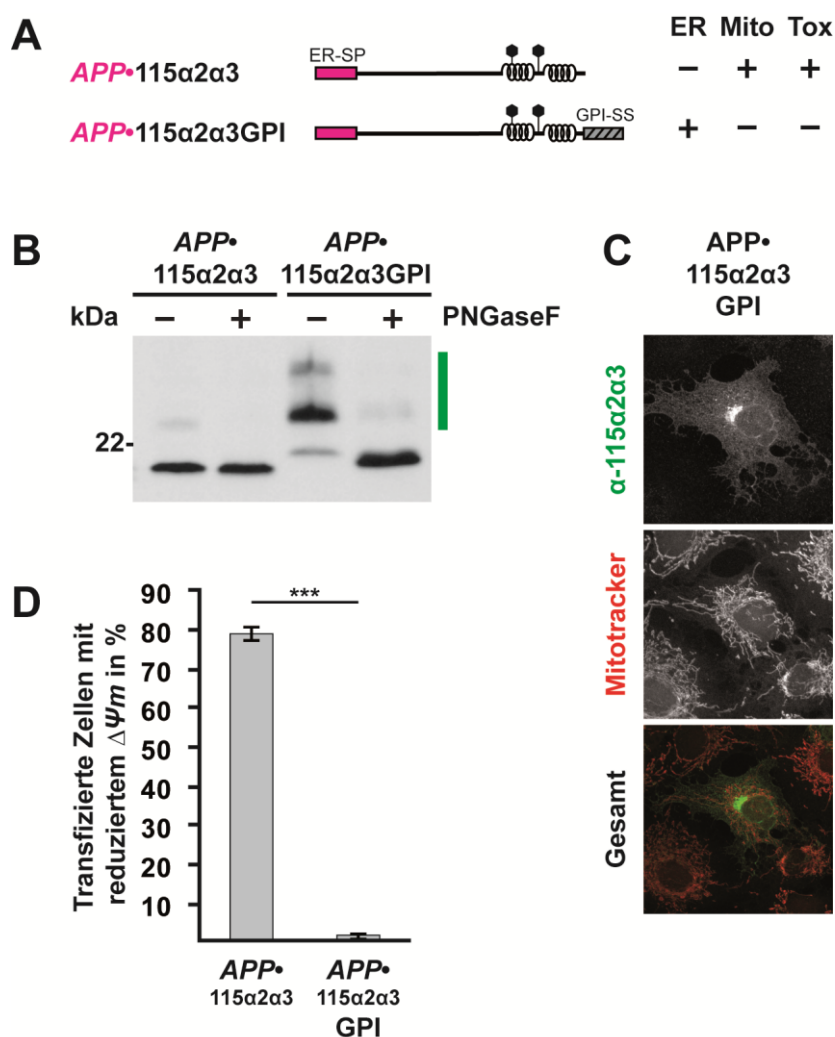


Abb. 38: Durch Verbesserung des ER-Imports von APP•115α2α3 wird dessen mitochondriale Zielsteuerung verhindert. (A) Schematische Darstellung der analysierten Konstrukte. ER-SP: ER-Signalpeptid, ER: effizienter ER-Import, Mito: mitochondriale Lokalisierung. **(B) APP•115α2α3GPI wird effizient ins ER importiert.** N2a Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transient transfiziert. Die Identifizierung glykosylierter Proteinfractionen erfolgte durch enzymatische Deglykosylierung des Gesamtzell-Lysats mit PNGase F. Die Lysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Glykosylierte Proteinfractionen sind mit einem grünen Balken markiert. *Immundetektion:* Anti-PrP 3F4 Antikörper, HRP-Anti-Maus Antikörper. **(C) APP•115α2α3GPI ist nicht mitochondrial lokalisiert und führt zu keiner Schädigung des mitochondrialen Membranpotentials.** SHSY-5Y Zellen wurden mit APP•115α2α3GPI transfiziert. 24

h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und das Konstrukt in permeabilisierten Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz detektiert. Der Nachweis intakter Mitochondrien erfolgte durch Färbung der Mitochondrien mit dem Fluoreszenzfarbstoff Mitotracker Red CMXRos. *Immundetektion*: APP•115α2α3GPI (Anti-PrP 3F4 Antikörper, Alexa Fluor 488 Anti-Maus Antikörper), Mitochondrien (Mitotracker Red CMXRos). **(D) Die Verbesserung des ER-Imports führt zur signifikanten Abnahme der mitochondrialen Toxizität von APP•115α2α3.** SHSY-5Y Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und die transfizierten Konstrukte in permeabilisierten Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz detektiert. Eine Schädigung des mitochondrialen Membranpotentials wurde durch Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Mitotracker Red CMXRos nachgewiesen. Zur Quantifizierung der mitochondrialen Toxizität wurde der prozentuale Anteil transfizierter Zellen mit reduziertem Membranpotential bestimmt. Die Auswertung basiert auf drei unabhängigen Versuchen. Je Konstrukt wurden mindestens 600 transfizierte Zellen ausgewertet. Gezeigt sind die Mittelwerte mit der jeweils zugehörigen Standardabweichung. Signifikanz (Studentscher *t*-Test): *** $p < 0,0005$. *Immundetektion*: Anti-PrP 3F4 Antikörper, Alexa Fluor 488 Anti-Maus Antikörper, Mitotracker Red CMXRos. $\Delta\Psi_m$: mitochondriales Membranpotential.

2.2.10 Durch Reduktion des ER-Imports von Sho•115α2α3 und Som•115α2α3 wird deren Mito-Toxizität signifikant erhöht

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass durch Verbesserung des ER-Imports die mitochondriale Fehllokalisierung von APP•115α2α3 signifikant verringert wird. In der folgenden Analyse wurde überprüft, ob das auch umgekehrt der Fall ist und eine Reduktion des ER-Imports die mitochondriale Zielsteuerung erhöht.

Eine Studie unserer Arbeitsgruppe hat ergeben, dass der ER-Import des Konstrukts PrP•115α2α3 durch Koexpression des Hsp-40 Co-Chaperon p58^{IPK} signifikant reduziert wird (Miesbauer et al, 2009). Abbildung 39 A zeigt die Western-Blot-Analyse von PrP•115α2α3, Sho•115α2α3 und Som•115α2α3 unter Koexpression von p58^{IPK}. Unter Kontrollbedingungen (-) liegen alle drei Konstrukte vorwiegend glykosyliert vor, was zeigt, dass sie effizient ins ER importiert werden. Unter Koexpression von p58^{IPK} ist bei allen Konstrukten zu beobachten, dass die glykosylierte Proteinfraction abnimmt und die unglykosylierte Proteinfraction mit ungeschnittenem ER-Signalpeptid zunimmt. Letztere repräsentiert nicht-translozierte Proteine. Offenbar reduziert p58^{IPK} also bei allen drei Konstrukten die ER-Importeffizienz. Als nächstes wurde untersucht, ob Sho•115α2α3 und Som•115α2α3 unter p58^{IPK}-Koexpression verstärkt zu den Mitochondrien geleitet

werden. Hierfür wurde eine Immunfluoreszenz-Analyse unter Verwendung des Membranpotential-abhängigen Farbstoffs *Mitotracker Red CMXRos* durchgeführt und der Prozentsatz transfizierter Zellen mit einem geschädigten Membranpotential bestimmt. Sowohl für *Sho*•115α2α3 wie auch *Som*•115α2α3 wurde unter p58^{IPK}-Koexpression eine signifikant erhöhte Toxizität beobachtet (Abb. 39 B). *PrP*•115α2α3, welches nicht mitochondrial lokalisiert ist, diente als Kontrollprotein.

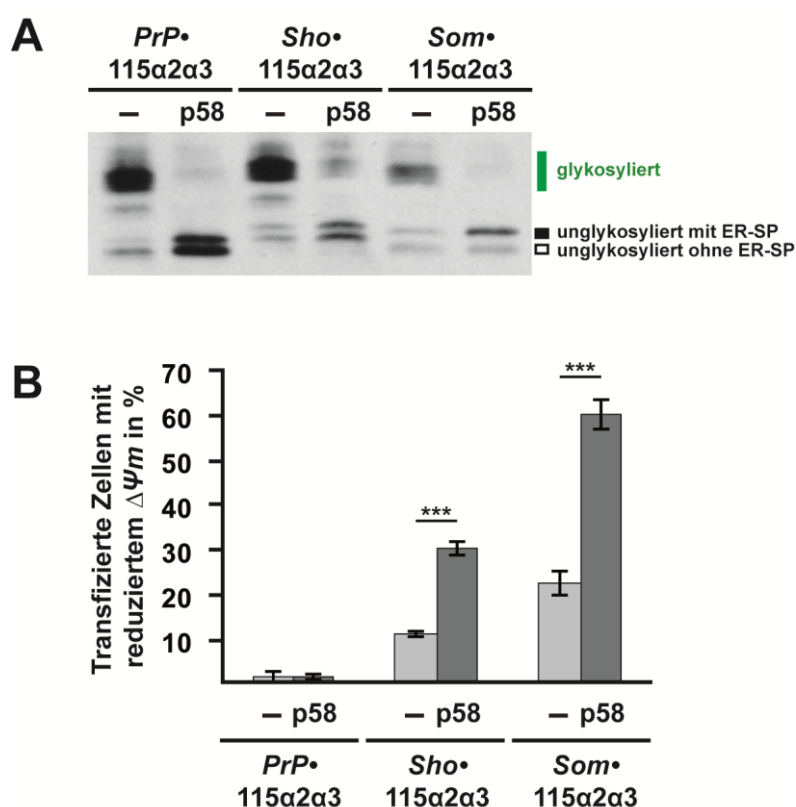


Abb. 39: Die Reduktion des ER-Imports durch p58^{IPK} erhöht die mitochondriale Zielsteuerung von *Sho*•115α2α3 und *Som*•115α2α3. (A) *Sho*•115α2α3 und *Som*•115α2α3 werden unter p58^{IPK}-Koexpression vermindert ins ER importiert. N2a Zellen wurden transient mit den angegebenen Konstrukten und p58^{IPK} (p58) oder dem Leervektor pcDNA3.1 Zeo(+) kotransfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und Gesamtzell-Lysate mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Glykosylierte Proteinfractionen sind mit einem grünen Balken markiert. ■ unglykosylierte Proteinfraction mit ER-Signalpeptid (nicht-importierte Proteinfraction). □ unglykosylierte Proteinfraction ohne ER-Signalpeptid (ins ER translozierte Proteinfraction, Rücktransport ins Zytosol via ERAD). *Immundetektion*: Anti-PrP 3F4 Antikörper, HRP-Anti-Maus Antikörper. **(B) Die Reduktion des ER-Imports durch p58^{IPK} führt zu einem signifikanten Anstieg der mitochondrialen Toxizität von *Sho*•115α2α3 und *Som*•115α2α3.** SHSY-5Y Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transient transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und die Konstrukte in permeabilisierten Zellen mittels indirekter

Immunfluoreszenz detektiert. Eine Schädigung des mitochondrialen Membranpotentials wurde durch Färbung der Mitochondrien mit dem Fluoreszenzfarbstoff Mitotracker Red CMXRos nachgewiesen. Zur Quantifizierung der mitochondrialen Toxizität wurde der prozentuale Anteil transfizierter Zellen mit reduziertem Membranpotential bestimmt. Die Auswertung basiert auf drei unabhängigen Versuchen. Je Konstrukt wurden mindestens 600 transfizierte Zellen ausgewertet. Gezeigt sind die Mittelwerte mit der jeweils zugehörigen Standardabweichung. Signifikanz (Studentscher *t*-Test): *** $p < 0,0005$.
Immundetektion: Anti-PrP 3F4 Antikörper, Alexa Fluor 488 Anti-Maus Antikörper, Mitotracker Red CMXRos. $\Delta\Psi_m$: mitochondriales Membranpotential.

Fasst man dieses Ergebnis mit der Analyse des vorherigen Abschnitts zusammen, deutet sich an, dass die mitochondriale Zielsteuerung von *Sho*•115 α 2 α 3, *Som*•115 α 2 α 3 und *APP*•115 α 2 α 3 in direktem Zusammenhang mit der ER-Translokationseffizienz der Konstrukte steht.

2.2.11 Mitochondriale Zielsteuerung als Folge eines gescheiterten ER-Imports

Es stellt sich die Frage, wie die bivalente Zielsteuerung der ER-Signalpeptide von Sho, Som und APP reguliert ist. Die bisher beschriebenen Ergebnisse deuten an, dass die Art der vermittelten Zielsteuerung von der ER-Translokationseffizienz der Proteine abhängt. Folgender Mechanismus könnte die erzielten Ergebnisse erklären: Initial leiten die genannten Signalpeptide jedes Protein zum ER. Transloziert ein Protein jedoch nicht ins ER, beispielsweise weil es unstrukturiert ist, vermitteln die Signalpeptide von Sho, Som und APP eine sekundäre Zielsteuerung zu den Mitochondrien. Trifft dieser hypothetische Mechanismus zu, sollten unter Bedingungen eines verringerten ER-Imports auch die normalerweise effizient ins ER importierten Wildtyp-Proteine Sho, Som und APP zu den Mitochondrien geleitet werden. Ob dies der Fall ist, wurde in den letzten Abschnitten dieser Arbeit untersucht.

2.2.11.1 Hemmung der ER-Translokation durch Eeyarestatin 1

Eine Methode den ER-Import sekretorischer Proteine transient zu verringern ist die Behandlung von Zellen mit Eeyarestatin 1 (Eey1). Eey1 wurde vor einigen Jahren als Hemmstoff der ER-assoziierten Degradierung (ERAD) entdeckt (Fiebiger et al, 2004; Wang et al, 2008). Kürzlich wurde der Stoff darüber hinaus als potenter Inhibitor der kotranslationalen Proteintranslokation ins ER identifiziert (Cross et al,

2009). Abbildung 40 zeigt eine Immunfluoreszenz-Analyse (IF) von Sho. Unter normalen zellulären Bedingungen transloziert Sho quantitativ ins ER und wird in der IF vorrangig im Golgi-Apparat und an der Plasmamembran der Zellen detektiert. Nach Behandlung mit Eey1 kolokalisiert Sho hingegen in vielen Zellen mit dem mitochondrialen Markerprotein Tom 20. Offenbar begünstigt der durch Eey1 gehemmte ER-Import also eine mitochondriale Zielsteuerung von Sho.

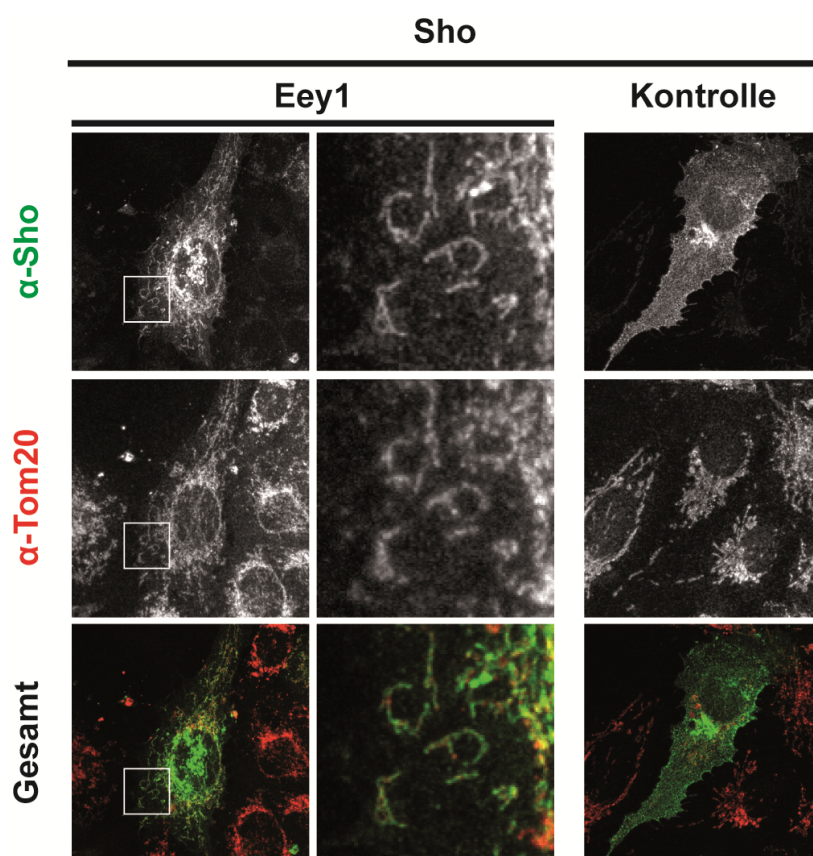


Abb. 40: Sho wird unter Reduktion des ER-Imports durch Eeyarestatin1 vermehrt zu den Mitochondrien geleitet. SHSY-5Y Zellen wurden transient mit Sho transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde eine Immunfluoreszenz-Analyse permeabilisierter Zellen durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen vor dem Fixieren für 4 h in Vollmedium mit 8 μ M Eeyarestatin1 (Eey1) oder Vollmedium mit dem gleichen Volumen DMSO (Kontrolle) kultiviert. Der Nachweis der mitochondrialen Lokalisation von Sho erfolgte durch Kofärbung des endogenen Proteins Tom 20. *Immundetektion:* Sho (monoklonaler Anti-V5 Antikörper, Alexa Fluor 488 Anti-Maus Antikörper), Mitochondrien (Anti-Tom 20 Antikörper, Alexa Fluor 647 Anti-Kaninchen Antikörper, hier als roter Kanal dargestellt).

2.2.11.2 Inhibition des ER-Imports durch *knockdown* von Sec61a1

Um das Ergebnis des vorangegangenen Abschnitts zu bekräftigen, wurde untersucht, ob Sho ebenfalls mitochondrial lokalisiert ist, wenn der ER-Import über einen anderen Mechanismus gehemmt wird. Hierfür wurde die Expression des Proteins Sec61 Alpha Isoform 1 (Sec61a1) mittels siRNA-vermittelter Gen-Stilllegung (*Gen-Knockdown*) reduziert. Sec61a1 ist die α -Untereinheit des trimeren eukaryotischen Sec61-Translokons (1.1.4.2). Eine verminderte Expression von Sec61a1 sollte also zur Reduktion funktionaler Translokonkomplexe und somit zu einem verringerten ER-Import führen.

Abbildung 41 A zeigt die zelluläre Lokalisierung von Sho unter *Knockdown*- und Kontroll-Bedingungen. Im Gegensatz zu normalen zellulären Bedingungen ist Sho im Sec61a1-*Knockdown* überwiegend mitochondrial lokalisiert. Wie schon unter Eey1-Behandlung beobachtet, induziert also auch eine *Knockdown*-vermittelte Hemmung des ER-Imports eine mitochondriale Zielsteuerung von Sho.

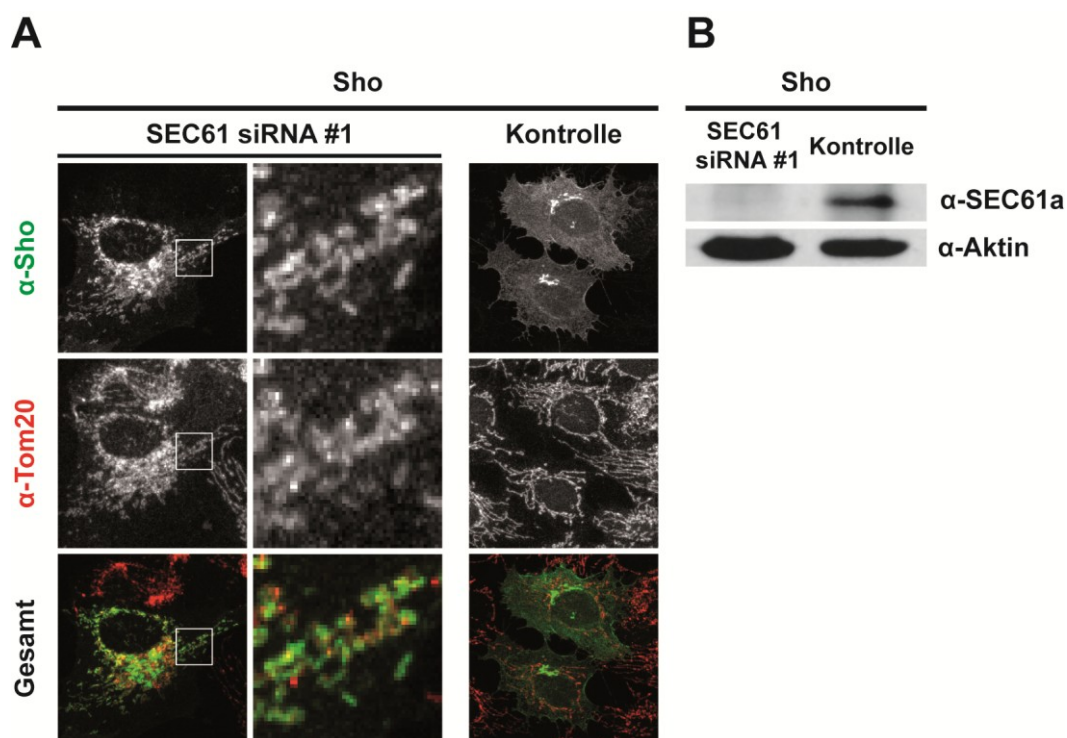


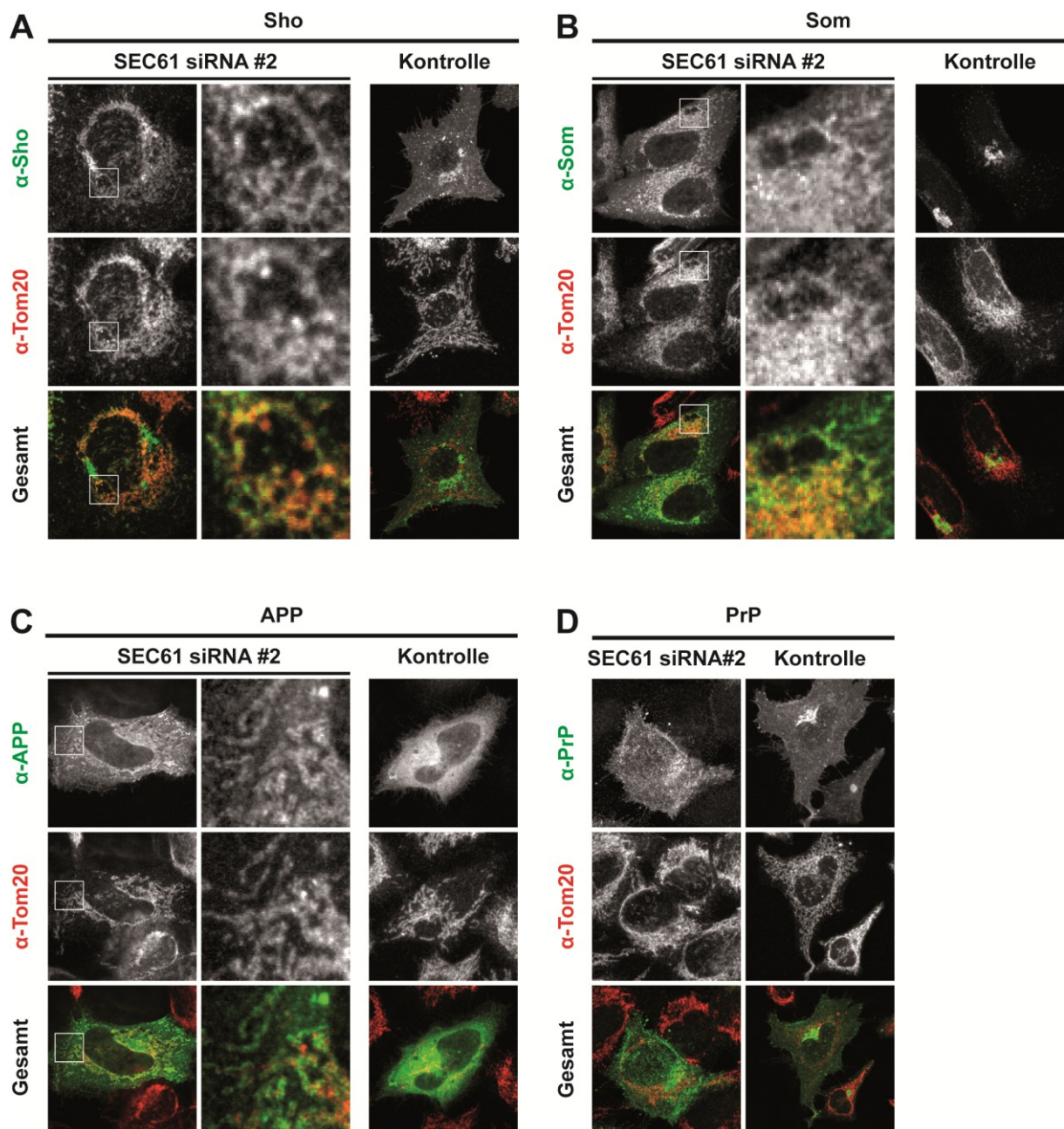
Abb. 41: Die Reduktion des ER-Imports durch Sec61a1-Knockdown führt zur Umleitung von Sho zu den Mitochondrien. (A,B) SHSY-5Y Zellen wurden revers mit Anti-Sec61a1 siRNA (Sec61 siRNA #1; Stealth RNAi siRNA; Invitrogen) oder Kontroll-siRNA (Kontrolle; Stealth RNAi siRNA negative control med GC; Invitrogen)

transfiziert. 48 h später wurden die Zellen transient mit Sho transfiziert. Die Analyse mittels indirekter Immunfluoreszenz und Western Blot erfolgte weitere 24 h später. **(A) Sho kolokalisiert im Sec61a1-Knockdown mit den Mitochondrien.** SHSY-5Y Zellen wurden wie oben beschrieben behandelt. Zur Bestimmung der zellulären Lokalisation wurden die Zellen auf Coverslips ausplattiert, fixiert und nach Permeabilisierung mittels indirekter Immunfluoreszenz ausgewertet. *Immunodetektion:* Sho (monoklonaler Anti-V5 Antikörper, Alexa Fluor 488 Anti-Maus Antikörper), Mitochondrien (Anti-Tom 20 Antikörper, Alexa Fluor 647 Anti-Kaninchen Antikörper, hier als roter Kanal dargestellt). **(B) Kontrolle der Knockdown-Effizienz.** SHSY-5Y Zellen wurden wie oben beschrieben parallel zu den korrespondierenden Immunfluoreszenz-Proben transfiziert. Zur Kontrolle der *Knockdown*-Effizienz wurden (ohne Coverslips ausplattierte) Zellen geerntet und die Menge an Sec61a1 in Gesamzell-Lysaten mittels SDS-PAGE und Western Blot überprüft. *Immunodetektion:* Anti-Sec61a Antikörper, HRP-Anti-Kaninchen Antikörper.

2.2.11.3 Mitochondriale Zielsteuerung der Wildtyp-Proteine Sho, Som und APP unter Bedingungen eines gehemmten ER-Imports

Die vorangegangenen beiden Abschnitte zeigten, dass Sho infolge einer Inhibition der ER-Translokation zu den Mitochondrien geleitet wird. Abschließend sollte untersucht werden, ob ein gehemmter ER-Import auch zu einer mitochondrialen Lokalisierung der anderen beiden Wildtyp-Proteine Som und APP führt. Hierfür wurden Zellen mit Sec61a1-siRNA transfiziert und anschließend die zelluläre Lokalisierung von Som und APP mittels einer Immunfluoreszenz-Analyse bestimmt. Zudem wurden Sho und PrP analysiert. Um die im vorherigen Abschnitt gezeigte Analyse von Sho im Sec61a1-*Knockdown* zu bekräftigen, wurde für den nachfolgend gezeigten *Knockdown* eine andere Zelllinie und eine andere siRNA gegen Sec61a1 eingesetzt. Wie in Abbildung 42 A illustriert ist, wurde Sho auch unter diesen *Knockdown*-Bedingungen zu den Mitochondrien geleitet. Für Som und APP ist unter normalen zellulären Bedingungen keine Kolokalisierung mit den Mitochondrien zu beobachten. Eine Hemmung des ER-Imports mittels Sec61a1-*Knockdown* führte jedoch zur mitochondrialen Lokalisierung beider Proteine (Abbildung 42 B und C). Das Kontrollprotein PrP zeigte keine mitochondriale Lokalisierung (Abbildung 42 D). Dies legt nahe, dass die im *Knockdown* beobachtete mitochondriale Lokalisierung von Sho, Som und APP spezifisch durch deren Signalpeptide vermittelt wurde.

Zusammengefasst ergaben die gezeigten Analysen, dass unter Bedingungen eines reduzierten ER-Imports auch die normalerweise effizient ins ER translozierenden Proteine Sho, Som und APP zu den Mitochondrien geleitet werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die ER-Signalpeptide von Sho, Som und APP generell eine mitochondriale Zielsteuerung vermitteln können, diese jedoch durch die ER-Translokationseffizienz des Proteins kontrolliert ist.



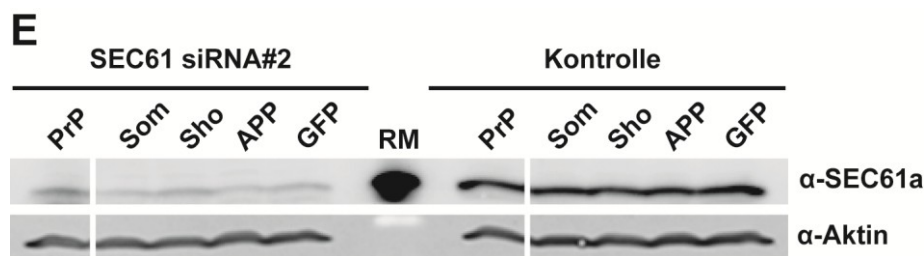


Abb. 42: Die Reduktion des ER-Imports durch Sec61a1-Knockdown führt zur mitochondrialen Lokalisation von Sho, Som und APP. (A-D) HeLa Zellen wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit Anti-Sec61a1 siRNA (Sec61 siRNA #2; Applied Biosystems) oder Kontroll-siRNA (Kontrolle; AllStars Negative Control siRNA) transfiziert. 60 h nach Ausplattieren der Zellen erfolgte die Transfektion mit den angegebenen Konstrukten oder dem Kontrollprotein-GFP. Die Analyse mittels indirekter Immunfluoreszenz und Western Blot wurde 96 h nach Beginn des *Knockdowns* durchgeführt. **(A,B,C) Sho, Som und APP kolokalisieren im Sec61a1-Knockdown mit den Mitochondrien.** HeLa Zellen wurden wie oben beschrieben behandelt. Die Bestimmung der zellulären Lokalisation erfolgte mittels indirekter Immunfluoreszenz permeabilisierter Zellen. *Immundetektion:* Sho und Som (monoklonaler Anti-V5 Antikörper, Alexa Fluor 488 Anti-Maus Antikörper), APP (Anti-APP 22C11 Antikörper, Alexa Fluor 488 Anti-Maus Antikörper), Mitochondrien (Anti-Tom 20 Antikörper, Alexa Fluor 647 Anti-Kaninchen Antikörper, hier als roter Kanal dargestellt). **(D) PrP wird im Sec61a1-Knockdown nicht zu den Mitochondrien geleitet.** Durchführung wie oben. *Immundetektion:* PrP (Anti-PrP 3F4 Antikörper, Alexa Fluor 488 Anti-Maus Antikörper), Mitochondrien (Anti-Tom 20 Antikörper, Alexa Fluor 647 Anti-Kaninchen Antikörper, hier als roter Kanal dargestellt). **(E) Kontrolle der Knockdown-Effizienz.** HeLa Zellen wurden wie oben beschrieben parallel zu den korrespondierenden Immunfluoreszenz-Proben transfiziert. Zur Kontrolle der Knockdown-Effizienz wurde die Menge an Sec61a1 im Gesamtzell-Lysat jeder Probe mittels SDS-PAGE und Western Blot überprüft. *Immundetektion:* Anti-Sec 61 α Antikörper, HRP-Anti-Kaninchen Antikörper.

3 Diskussion

3.1 TEIL 1: Die Rolle der GPI-Signalsequenz beim ER-Import intrinsisch unstrukturierter Proteine

Proteine, die den sekretorischen Weg durchlaufen, werden am Anfang ihrer Biosynthese ins Endoplasmatische Retikulum (ER) importiert. Obwohl die Kernmaschinerie und der Ablauf des ER-Imports mittlerweile umfangreich charakterisiert sind, ist über die quantitative und qualitative Regulation der Proteintranslokation bislang wenig bekannt. Diese Aspekte wurden im ersten Teil der vorliegenden Arbeit untersucht.

3.1.1 Die Regulation des ER-Imports sekretorischer Proteine

Üblicherweise geht man davon aus, dass ein Protein mit einem ER-Signalpeptid ins ER importiert wird. Verschiedene Studien der letzten Jahre deuten jedoch darauf hin, dass die Translokation ins ER ein regulierter Prozess ist und die Anwesenheit eines ER-Signalpeptids nicht garantiert, dass ein Protein quantitativ ins ER transloziert (Hegde & Kang, 2008; Levine et al, 2005; Miesbauer et al, 2009).

Was ist über die Regulation des ER-Imports bislang bekannt?

Der Bedarf eines regulierten ER-Imports besteht beispielsweise unter ER-Stress. Hier kann es von Vorteil sein, den Import sekretorischer Proteine zu reduzieren und damit einer Überlastung der Faltungs-Maschinerie des ERs entgegenzuwirken. Ein derartiger Mechanismus wurde vor einigen Jahren beschrieben (Kang et al, 2006; Oyadomari et al, 2006). Bei der sogenannten kotranslationalen Qualitätskontrolle werden neu synthetisierte sekretorische Proteine am ER-Import gehindert und einer proteasomalen Degradierung zugeführt. Eine bisher identifizierte Komponente dieses Kontrollweges ist das Co-Chaperon p58^{IPK} (Rutkowski et al, 2007).

Auch unter normalen zellulären Bedingungen scheinen verschiedene Faktoren den ER-Import zu modulieren. Beispielsweise gibt es Hinweise, dass einige, mit dem Translokation assoziierte, Proteine die Importeffizienz beeinflussen. Beschrieben sind hier unter anderem TRAM (*translocating chain-associated membrane protein*) (Voigt

et al, 1996), TRAP (*translocon-associated protein* (Fons et al, 2003) und Sec 62 (Lakkaraju et al, 2012).

Neben extrinsischen Faktoren regulieren auch Eigenschaften der Polypeptidkette selbst deren ER-Translokation. Verschiedene Untersuchungen diesbezüglich ergaben, dass die Effizienz, mit der ein Protein ins ER transloziert, von dessen ER-Signalpeptid abhängen kann (zusammengefasst in (Hegde & Bernstein, 2006). Unter *in vitro* und *in vivo* Bedingungen wurde deutlich, dass sich ER-Signalpeptide in ihrer Leistungsfähigkeit einen effizienten ER-Import zu vermitteln, unterscheiden (Kim et al, 2002; Levine et al, 2005). Üblicherweise werden ER-Signalpeptide direkt nach ihrem Austritt aus dem Ribosom durch SRP gebunden und damit der Transport des Ribosom-Polypeptid-Komplexes (RNC, *Ribosome-nascent chain complex*) zur ER-Membran eingeleitet. Vermutlich verläuft dieser Schritt bei jedem ER-Signalpeptid ähnlich effizient (Hegde & Kang, 2008). Am ER erfolgt ein zweiter Signalpeptid-abhängiger Schritt. Durch Interaktion mit Sec 61 vermittelt das ER-Signalpeptid die Öffnung des Translokationkanals und somit den Eintritt der Polypeptidkette ins ER. Dieses sogenannte *Gating* scheint von der spezifischen Aminosäuresequenz des Signalpeptids abzuhängen und ist vermutlich der Grund für Unterschiede in der Importeffektivität verschiedener ER-Signalpeptide (Hegde & Kang, 2008).

3.1.2 Unstrukturierte Proteine translozieren ineffizient ins ER

Eine Studie unserer Forschungsgruppe ergab außerdem, dass die Sekundärstruktur der Polypeptidkette die Translokationseffizienz sekretorischer Proteine moduliert (Miesbauer et al, 2009). Ausgangspunkt für diese Studie war die Beobachtung, dass zwei pathogene Stopp-Mutanten von PrP nur teilweise ins ER translozieren und infolgedessen im Zytosol fehllokalisiert sind und Apoptose induzieren (Heske et al, 2004; Rambold et al, 2006; Zanusso et al, 1999). Basierend auf diesen Ergebnissen entstand der Verdacht, dass die strukturierten C-terminalen Domänen von PrP, die bei den pathogenen Mutanten größtenteils deletiert sind, dessen ER-Import regulieren. Der experimentelle Beweis hierfür konnte durch nachfolgende Analysen pathogener und artifizieller PrP-Mutanten erbracht werden. Einige dieser Konstrukte wurden auch in der vorliegenden Arbeit analysiert. Abbildung 45 illustriert am Beispiel dieser Proteine wie die ER-Translokation von PrP infolge der Deletion oder Substitution strukturierter Domänen sinkt. Diese Analyse zeigte nicht nur, dass der strukturierte C-Terminus von PrP essentiell für dessen ER-Import ist, sie deutete

auch darauf hin, dass unstrukturierte Sequenzabschnitte generell die Translokation sekretorischer Proteine behindern. Weiterführende Untersuchungen unserer Gruppe konnten diese Hypothese bekräftigen, indem sie demonstrierten, dass heterologe unstrukturierte sekretorische Proteine ebenfalls unvollständig ins ER translozieren.

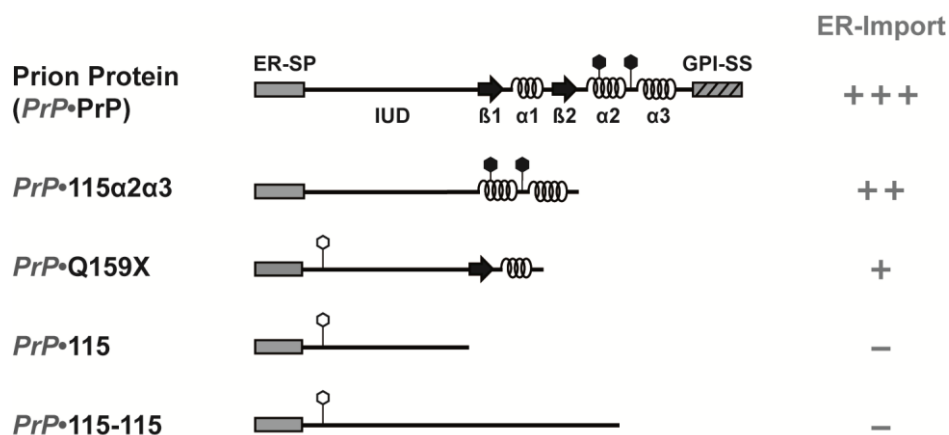


Abb. 43: Die alpha-helikalen C-terminalen Domänen von PrP sind essentiell für einen quantitativen ER-Import des Proteins. ER-SP: ER-Signalpeptid, IUD: intrinsisch unstrukturierte Domäne, β : β -Faltblatt Domäne, α : α -helikale Domäne, ausgefülltes Sechseck: endogene Glykosylierungsstelle, unausgefülltes Sechseck: artifizielle Glykosylierungsstelle, GPI-SS: GPI-Signalsequenz, +++: sehr effektiver ER-Import, ++: moderater ER-Import, +: geringer ER-Import, -: kein/ineffektiver ER-Import.

3.1.3 Eine GPI-Signalsequenz verbessert den ER-Import unstrukturierter Proteine

Basierend auf der Beobachtung, dass unstrukturierte Domänen unabhängig von ihrer Aminosäuresequenz ein Hindernis für einen effizienten ER-Import darstellen können, stellte sich die Frage, weshalb einige sekretorische Proteine trotz ausgedehnter unstrukturierter Domänen effizient ins ER importiert werden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass diese Proteine über Merkmale verfügen, welche die ER-Translokation der ungefalteten Domänen verbessern. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde im ersten Teil dieser Arbeit das intrinsisch unstrukturierte Protein Shadoo (Sho) untersucht.

Sho ist ein GPI-verankertes Plasmamembranprotein und verfügt in seiner primär translatierten Form über eine N-terminale ER- und eine C-terminale GPI-Signalsequenz. Strukturanalysen mittels CD(*circular dichroism*)-Spektroskopie ergaben, dass der gesamte mature Teil von Sho keine stabile Sekundärstruktur aufweist (Watts & Westaway, 2007). Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde gezeigt, dass die GPI-Signalsequenz von Sho essentiell für den ER-Import des Proteins ist. Nach Deletion der GPI-Signalsequenz translozierte Sho nicht mehr ins ER. Dieses Ergebnis wies darauf hin, dass die GPI-Signalsequenz von Sho ein Merkmal darstellt, welches die ER-Translokation des unstrukturierten Proteinanteils ermöglicht. Weiterführende Untersuchungen belegten, dass dieser Effekt nicht proteinspezifisch ist. Auch bei heterologen unstrukturierten Proteinen führte die Fusion einer GPI-Signalsequenz zur Erhöhung der ER-Translokationseffizienz. Durch die Analyse dreier unterschiedlicher GPI-Signalsequenzen wurde außerdem dargelegt, dass eine GPI-Signalsequenz unabhängig von ihrer Aminosäuresequenz den ER-Import unstrukturierter Proteine begünstigt.

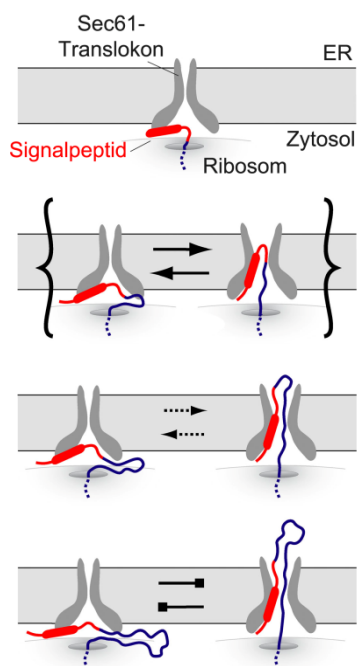
3.1.4 Wie könnte eine GPI-Signalsequenz die Translokationseffizienz verbessern?

Die oben bereits erwähnte Studie zur Charakterisierung von PrP ergab, dass dessen alpha-helikale Domänen die ER-Translokation des unstrukturierten Sequenzabschnitts begünstigen (Miesbauer et al, 2009). Im Rahmen eines anderen derzeit in unserer Forschungsgruppe durchgeführten Projektes konnte zudem gezeigt werden, dass sich dieses Phänomen nicht auf PrP beschränkt. Interessanterweise scheint der ER-Import verschiedener unstrukturierter Peptidhormone durch alpha-helikale Prodomänen verbessert zu werden. Ein Beispiel hierfür ist das Hormon Somatostatin, dessen Vorläuferprotein Prä-Pro-Somatostatin (Som) ebenfalls in dieser Arbeit analysiert worden ist. Sowohl für PrP wie auch für Som wurde gezeigt, dass auch heterologe alpha-helikale Domänen den ER-Import der ungefalteten Domänen verbessern (Miesbauer et al, 2009) *und unveröffentlichte Daten*). Zusammengefasst ergaben diese Untersuchungen, dass alpha-helikale Domänen unabhängig von ihrer Primärsequenz und unabhängig von deren Lokalisierung innerhalb der Polypeptidkette den ER-Import unstrukturierter Sequenzabschnitte verbessern können.

Da die in dieser Arbeit analysierten GPI-Signalsequenzen von Sho, PrP und GFR α als partiell alpha-helikal vorhergesagt werden (PSIPRED, <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), könnte es sein, dass eine GPI-Signalsequenz über einen ähnlichen Mechanismus wie eine interne alpha-helikale Domäne die Translokationseffizienz fördert. Der zugrunde liegende Mechanismus, über welchen interne alpha-helikale Domänen die Translokation modulieren, ist noch ungeklärt und wird derzeit im Rahmen eines anderen Projektes untersucht.

Über welche molekularen Mechanismen könnte der Faltungszustand einer Polypeptidkette die Translokation beeinflussen?

Da sich Sekundärstruktur bereits im Austrittskanal des Ribosoms bilden kann (Lu & Deutsch, 2005), wäre es denkbar, dass eine alpha-helikale Domäne zu einer sterischen Veränderung von Ribosom oder/und Polypeptidkette führt, welche die Bindung weiterer Faktoren, wie beispielsweise SRP, begünstigt oder moduliert. Auch am Translokon könnten der Import der Polypeptidkette über sterische Einflüsse gefördert werden. Alpha-helikale Domänen könnten beispielsweise die Interaktion zwischen ER-Signalpeptid und Translokon unterstützen und somit das *Gating* verbessern. Da alpha-helikale Domänen eine besonders kompakte Konformation im Ribosom-Translokon-Tunnel einnehmen (Mingarro et al, 2000), ist es vorstellbar, dass helikale Sequenzabschnitte eine schnelle Translokationskinetik fördern. Verschiedene Studien weisen außerdem darauf hin, dass die kotranslationale Translokation von Proteinen ein hoch dynamischer Prozess ist und die wachsende Polypeptidkette sowohl auf der luminalen wie auch auf der zytosolischen Seite des Translokons lokalisiert sein kann (Abb. 46) (Hegde & Kang, 2008; Ooi & Weiss, 1992). Es wäre daher möglich, dass strukturierte Domänen die Polypeptidkette innerhalb des ERs stabilisieren und/oder unstrukturierte Domänen den Zustand außerhalb des ERs und somit eine zytosolische Freisetzung des Proteins begünstigen. In diesem Szenario wäre es ebenfalls plausibel, dass unstrukturierte Domänen von zytosolischen Chaperonen gebunden werden und die nicht-translozierte Polypeptidkette dadurch im Zytosol stabilisiert wird. Diese und weitere Möglichkeiten werden derzeit in unserer Gruppe experimentell untersucht.



Modifiziert nach (Hegde & Bernstein, 2006).

Abb. 44: Dynamische Translokation einer naszierenden Polypeptidkette ins Endoplasmatische Retikulum (ER).

Das Ergebnis, dass eine C-terminale Domäne, wie beispielsweise eine GPI-Signalsequenz, die ER-Translokation modulieren kann, wirft weitere mechanistische Fragen auf. Wie bereits erläutert worden ist, weisen die analysierten nicht-translozierten sekretorischen Proteine ein unprozessiertes ER-Signalpeptid auf. Üblicherweise translozieren Proteine mit einem N-terminalen ER-Signalpeptid in eukaryotischen Zellen kotranslational ins ER (Kang et al, 2006). Basierend auf der derzeitigen Vorstellung des kotranslationalen Proteinimports wird dabei das ER-Signalpeptid eines Proteins während der noch andauernden Synthese von der Signalpeptidase entfernt. Eine GPI-Signalsequenz am C-terminalen Ende eines Proteins sollte demnach kotranslational nicht in der Lage sein den ER-Import derart zu beeinflussen, dass es zur zytosolischen Freisetzung eines komplett synthetisierten Proteins mit ungeschnittenem N-terminalen Signalpeptid kommt.

Es stellt sich daher die Frage, ob die untersuchten Konstrukte kotranslational oder posttranslational ins ER importiert werden. Auf der Basis der gezeigten Analysen kann eine posttranslationale Zielsteuerung nicht ausgeschlossen werden. Geht man von dieser Art der Zielsteuerung aus, würden die dargelegten Ergebnisse jedoch nahelegen, dass auch die Wildtyp-Proteine posttranslational importiert werden.

Deutlich wird dies am Beispiel von Sho und Sho Δ GPI. Beide Proteine sind bis auf die C-terminale GPI-Signalsequenz identisch. Für Proteine mit N-terminalem Signalpeptid ist beschrieben, dass SRP bereits nach der Synthese von circa 60 Aminosäuren bindet und eine kotranslationale Zielsteuerung zum ER einleitet (Bernstein, 1998; Siegel & Walter, 1988). Für kurze Proteine (< 75 AS) ist gezeigt worden, dass diese nicht durch SRP erkannt werden (Zimmermann et al, 2011; Zimmermann et al, 1990). Sho Δ GPI ist jedoch 141 AS lang. Angesichts dieser Tatsache erscheint es unwahrscheinlich, dass die Deletion der GPI-Signalsequenz von Sho (AS 141 – 165; *einschließlich V5-Tag*) einen Wechsel der Zielsteuerung von ko- zu posttranslational bedingt.

An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass zwei vorangegangene Studien die GPI-Signalsequenz von PrP als autonomes posttranslationales Targetingpeptid postulieren (Gu et al, 2008; Holscher et al, 2001). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestätigt werden. Wie in Abschnitt 2.1.2 dargelegt wurde, verblieben Proteine ohne ER-Signalpeptid aber mit GPI-Signalsequenz im Zytosol. Offenbar verbessert eine GPI-Signalsequenz also nur in Anwesenheit eines N-terminalen ER-Signalpeptids den ER-Import unstrukturierter Proteine.

Derzeit erscheint es wahrscheinlich, dass die untersuchten sekretorischen Proteine kotranslational zum ER geleitet werden, sich dort jedoch länger als bislang vermutet in einem translationskompetenten Zustand mit ungeschnittenem Signalpeptid befinden. Ob eine wachsende Polypeptidkette in diesem Zustand ins ER transloziert oder ins Zytosol freigesetzt wird, würde den vorgestellten Daten zufolge unter anderem von strukturellen Merkmalen der Polypeptidkette abhängen. Interessanterweise ist vor einiger Zeit publiziert worden, dass die Sekundärstruktur von sich noch im Ribosom befindenden Domänen, die Translokationskinetik der Polypeptidkette im Translokation beeinflussen kann (Daniel et al, 2008). Basierend auf dieser Beobachtung könnte eine GPI-Signalsequenz im Austrittstunnel des Ribosoms die Translokation eines Proteins kotranslational modulieren.

Über welche Mechanismen eine GPI-Signalsequenz die Translokationseffizienz unstrukturierter Proteine reguliert und ob dies ko- oder posttranslational erfolgt, ist durch weiterführende Analysen aufzudecken. Zu verifizieren ist außerdem, ob eine GPI-Signalsequenz als alpha-helikale Domäne am C-Terminus eines Proteins den ER-Import über einen ähnlichen Mechanismus wie eine N-terminale oder interne alpha-Helix moduliert.

3.1.5 Translokationsfördernde Domänen müssen nicht Teil des murenen Proteins sein

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die GPI-Signalsequenz von Sho sowie die alpha-helikale Prodomäne von Som essentiell für den ER-Import der Proteine sind. Bemerkenswerterweise sind beide Domänen nicht Teil der murenen Proteine. GPI-Signalsequenzen werden im ER abgespalten und durch einen GPI-Anker ersetzt. Die Prodomäne von Som wird posttranslational im sekretorischen Weg entfernt und dabei das aktive Peptidhormon freigesetzt. Die Analyse von Sho und Som offenbarte daher, dass translokationsfördernde Domänen auch nur Teil des primären Translationsproduktes sein können. Dieser Sachverhalt könnte darauf hinweisen, dass alpha-helikale Domänen, die posttranslational entfernt werden, dazu genutzt werden unstrukturierte Proteine dem sekretorischen Weg zugänglich zu machen.

3.2 TEIL 2: Mitochondriale Zielsteuerung durch ER-Signalpeptide

3.2.1 N-terminale ER-Signalpeptide können eine bivalente Steuerungsaktivität aufweisen

Die Untersuchungen zur ER-Translokation von Sho und Som ergaben, dass die beiden nicht-translozierten Mutanten Sho Δ GPI und Som Δ pro mitochondrial lokalisiert sind. Dies war zunächst ein überraschendes Ergebnis, da sekretorische Proteine, welche ineffizient ins ER translozieren, für gewöhnlich im Zytosol verbleiben und dort proteasomal degradiert werden (Hessa et al, 2011; Miesbauer et al, 2009). Weiterführende Analysen chimärer Modellproteine offenbarten, dass die ER-Signalpeptide von Sho und Som bivalente Sortierungssignale sind und Proteine nicht nur zum ER, sondern auch zu den Mitochondrien leiten können.

3.2.2 Wieso können Proteine unterschiedlich lokalisiert sein?

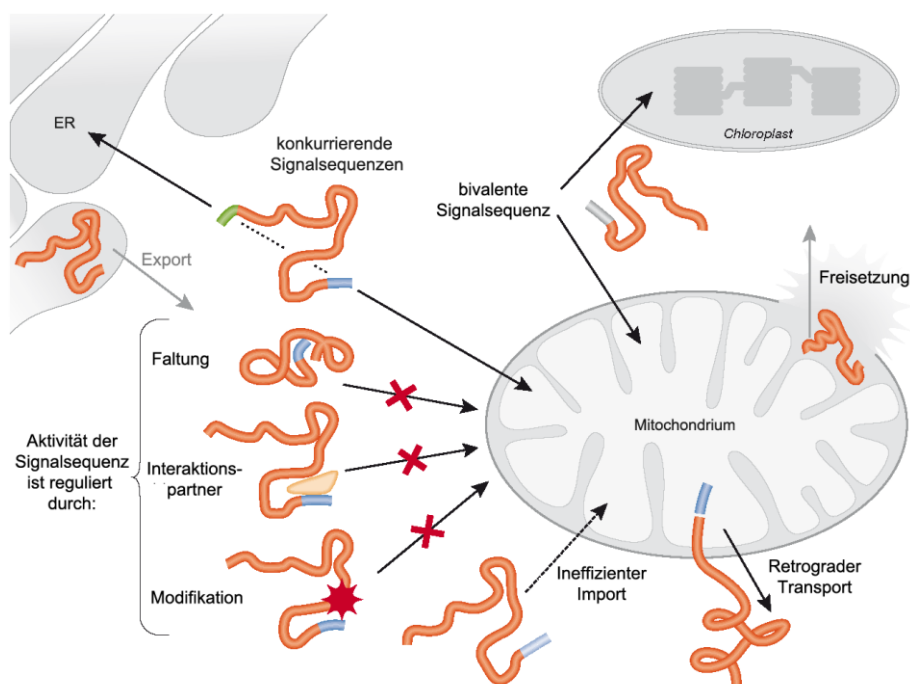
Duale Zielsteuerungen von Proteinen können durch verschiedene zelluläre Mechanismen vermittelt werden (zusammengefasst in (Karniely & Pines, 2005)). Die meisten in der Literatur beschriebenen Fälle von multiplen Proteinlokalisationen beruhen auf zwei Genen oder zwei Transkriptionsprodukten eines Gens. Darüber hinaus kann eine multiple Proteinverteilung durch Spleißen (*splicing*) oder unterschiedliche Translationsstartpunkte bedingt sein. Diese Mechanismen führen in der Regel alle zu zwei Translationsprodukten in Form einer Proteinisoform mit und einer ohne Signalpeptid (Danpure, 1995; Small et al, 1998).

Alternativ kann auch ein einzelnes Translationsprodukt zu unterschiedlichen zellulären Kompartimenten geleitet werden. Hierbei liegt meist einer oder mehrere der folgenden Mechanismen vor (Abb. 47): Ein Protein kann beispielsweise über zwei Signalpeptide verfügen. Wenn diese direkt hintereinander liegen, werden sie häufig gemeinsam als chimäres Signalpeptid umschrieben. Derartige chimäre Signalpeptide sind beispielsweise für die Proteine CYP2B1 und CYP1A1 der Cytochrom P450 Familie beschrieben. Beide Enzyme werden sowohl ins ER wie auch zu den Mitochondrien geleitet. Welche Zielsteuerung primär vermittelt wird, hängt von Modifikationen der Proteine ab. Im Fall von CYP2B1 wird über eine Phosphorylierung des Proteins die Interaktion mit SRP moduliert

(Anandatheerthavarada et al, 1999), bei CYP1A1 erfolgt eine proteolytische Freilegung der internen mitochondrialen Signalsequenz (Addya et al, 1997).

Eine duale Zielsteuerung basierend auf zwei aufeinanderfolgenden Signalpeptiden wird auch für das Amyloid-Vorläuferprotein (APP) postuliert. Vorangegangene Studien ergaben, dass das sekretorische Protein APP an den Mitochondrien lokalisiert sein kann (Anandatheerthavarada et al, 2003; Devi et al, 2006). Die nähere Charakterisierung dieser Beobachtung ergab, dass APP über ein N-terminales ER-Signalpeptid sowie ein direkt nachfolgendes mitochondriales Signalpeptid verfügt. Im Besonderen wurden drei positiv geladene Aminosäuren an den Positionen 40, 44 und 51 als mitochondriales Steuerungssignal identifiziert. Wie die Regulation der dualen Zielsteuerung von APP erfolgt, konnte in den Studien nicht festgestellt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde das isolierte ER-Signalpeptid von APP (AS 1 bis 24) untersucht. Die gezeigten Analysen ergaben, dass auch dieser Sequenzabschnitt eine mitochondriale Steuerungsaktivität besitzt und das Signalpeptid von APP somit eine bivalente Signalsequenz darstellt. Es könnte daher sein, dass zur mitochondrialen Lokalisierung von Wildtyp-APP auch dessen ER-Signalpeptid beiträgt.



Modifiziert nach (Karniely & Pines, 2005).

Abb. 45: Übersicht über duale Zielsteuerungs-Mechanismen. Gezeigt sind nur Mechanismen, die auf einem Translationsprodukt basieren.

3.2.3 Kann ein und dasselbe Signalpeptid zwei Transportrichtungen vermitteln?

Multiple Proteinlokalisationen können auch durch nur ein einzelnes Signalpeptid vermittelt werden. Verfügt ein Proteinen über ein Signalpeptid, welches nur den Transport zu einem membranumschlossenen Zellorganell vermittelt, ist gezeigt worden, dass eine Zweitlokalisierung im Zytosol durch einen ineffizienten Import, einen retrograden Transport oder aufgrund einer mangelnden Membranintegrität des Organells erfolgen kann (Abb. 47) (Karniely & Pines, 2005).

Einzelne Signalpeptide können jedoch auch, wie in dieser Arbeit beobachtet, eine Zielsteuerung zu zwei membranumschlossenen Organellen vermitteln. Man spricht dann in der Regel von dualen, bivalenten oder ambigen (*ambiguous*) Signalpeptiden. Bivalente Signalpeptide sind vorwiegend für pflanzliche Proteine, die sowohl in den Mitochondrien wie auch in den Chloroplasten lokalisiert sind, beschrieben (Carrie et al, 2009; Yogev & Pines, 2011). In welches der zwei Zellkompartimente ein Protein primär transloziert, wird durch unterschiedliche Affinitäten des Signalpeptids zu den Rezeptoren der beiden Organellen bestimmt. Darüber hinaus kann die duale Zielsteuerung zu Mitochondrien und Chloroplasten zusätzlich über die Bindung anderer Proteine oder über Modifikationen, wie eine Phosphorylierung des Proteins, moduliert sein (Carrie et al, 2009; Yogev & Pines, 2011).

Auch in Säugerzellen wurden einige Proteine mit bivalenten Signalpeptiden entdeckt (Yogev & Pines, 2011). Zu erwähnen ist beispielsweise das Enzym NADH Cytochrom b5 Reduktase (b5R), da es, wie die in dieser Arbeit charakterisierten Proteine, sowohl zum ER wie auch zu den Mitochondrien geleitet werden kann. Im Gegensatz zu den hier analysierten Proteinen verfügt b5R nicht über ein ER-Signalpeptid, welches durch die Signalpeptidase prozessiert wird, sondern über eine N-terminale Signal-Anker-Sequenz. Vor einiger Zeit wurde publiziert, dass die Zielsteuerung von b5R über eine kotranslationale Modifikation der Signalsequenz erfolgt (Colombo et al, 2005). Im nicht modifizierten Zustand wird die Signal-Anker-Sequenz von b5R durch SRP gebunden und die naszierende Polypeptidkette kotranslational in die ER-Membran inseriert. Wird die Signal-Anker-Sequenz von b5R jedoch nach Austritt aus dem Ribosom myristoyliert, sinkt deren Affinität zu SRP, was zur Folge hat, dass b5R posttranslational in der äußeren Mitochondrienmembran verankert wird.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die bivalente Steuerungsaktivität der Signalpeptide von Sho, Som und APP über einen anderen Mechanismus reguliert wird.

3.2.4 Welche Zielsteuerung durch die Signalpeptide von Sho, Som und APP vermittelt wird, hängt von der Sekundärstruktur der Polypeptidkette ab

Die erbrachten Untersuchungen lassen vermuten, dass bei den Signalpeptiden von Sho, Som und APP die Richtung der Zielsteuerung nicht über Modifikationen der Proteine moduliert wird. Ersichtlich ist dies beispielsweise anhand der Konstrukte Sho und Sho Δ GPI. Sho ist extrazellulär in der Plasmamembran verankert, Sho Δ GPI mitochondrial lokalisiert. Da die ersten 140 Aminosäuren der beiden Konstrukte identisch sind, ist es unwahrscheinlich, dass nur eines der Proteine modifiziert und daher anders geleitet wird. Zumindest scheint eine kotranslationale Modifikation des Signalpeptids, wie bei b5R, wenig plausibel zu sein. Modifikationen der Polypeptidkette oder eine Interaktion mit modulierenden Proteinen können auf Basis der vorgestellten Analysen nicht ausgeschlossen werden. Eindeutig gezeigt werden konnte jedoch, dass die Art der vermittelten Zielsteuerung von der Sekundärstruktur der Polypeptidkette abhängt. Im Kontext strukturierter Proteine vermittelten die bivalenten Signalpeptide von Sho, Som und APP einen effektiven ER-Import, unstrukturierte Proteine wurden hingegen zu den Mitochondrien geleitet.

3.2.5 Eine mitochondriale Zielsteuerung sekretorischer Proteine kann zur Schädigung der Mitochondrien führen

Verschiedene Untersuchungen legen nahe, dass die humane Alzheimer-Erkrankung mit einer Fehlfunktion der Mitochondrien assoziiert ist (u.a. (Maruszak & Zekanowski, 2011; Moreira et al, 2007). Einige dieser Studien deuten darauf hin, dass die Ursache dafür eine mitochondriale Lokalisierung von Vollängen-APP oder den Amyloid- β -Peptiden sein könnte (Anandatheerthavarada et al, 2003; Casley et al, 2002; Devi et al, 2006; Hansson Petersen et al, 2008; Lustbader et al, 2004; Manczak et al, 2006). APP gilt im Kontext der Pathophysiologie von Alzheimer vorwiegend als das Vorläuferprotein der neurotoxischen Amyloid- β -Peptide. Eine Untersuchung ergab jedoch, dass Vollängen-APP in Gehirnen von Alzheimer-Patienten mitochondrial lokalisiert sein kann, in einer nicht-glykosylierten Form mit Tom40 und Tim23 assoziiert ist und offenbar die mitochondriale Importmaschinerie

blockiert (Devi et al, 2006). Vermutlich wird APP N-terminal ins Mitochondrium geleitet, jedoch aufgrund eines C-terminalen sauren Sequenzbereichs (AS 220 – 290) nicht komplett importiert. *In vitro* Untersuchungen zeigten außerdem, dass die mitochondriale Fehllokalisierung von APP mit einer verringerten Aktivität der Cytochrom C Oxidase, einer reduzierten ATP Synthese, einer Schädigung des mitochondrialen Membranpotentials und einem gehemmten Import mitochondrialer Proteine einhergeht (Anandatheerthavarada et al, 2003).

Weitere Untersuchungen zur mitochondrialen Fehllokalisierung von APP und Amyloid- β könnten daher helfen, Einblicke in die Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung zu erhalten.

Interessanterweise wurde auch für eines der in dieser Arbeit analysierten Proteine eine Schädigung der Mitochondrien beobachtet. Das Modellkonstrukt 115 α 2 α 3 induzierte infolge einer mitochondrialen Zielsteuerung durch die ER-Signalpeptide von Sho, Som oder APP eine Fragmentierung der Mitochondrien und einen Zusammenbruch des Membranpotentials. Bemerkenswerterweise war diese Toxizität bei UCR•115 α 2 α 3, einem Konstrukt mit einem authentischen mitochondrialen Signalpeptid, nicht zu beobachten. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die mitochondriale Lokalisierung von 115 α 2 α 3 nicht *per se* toxisch ist, sondern die Schädigung der Mitochondrien im Zusammenhang mit einer anormalen Zielsteuerung steht. Hierbei sollte allerdings betont werden, dass im Rahmen dieser Arbeit auch gezeigt worden ist, dass unstrukturierte Proteine, welche durch die ER-Signalpeptide von Sho, Som oder APP zu den Mitochondrien geleitet werden, keine mitochondriale Dysfunktion induzieren. Dies zeigt, dass die mitochondriale Zielsteuerung durch ein bivalentes ER-Signalpeptid nicht grundsätzlich mit einer Schädigung der Mitochondrien einhergeht, sondern Strukturelemente eine weitere Rolle spielen.

Die weiterführenden Untersuchungen zum Mechanismus der mitochondrialen Schädigung durch 115 α 2 α 3 konzentrierten sich auf APP•115 α 2 α 3, dem Konstrukt mit der höchsten Toxizität. Es konnte nachgewiesen werden, dass APP•115 α 2 α 3 innerhalb der Mitochondrien lokalisiert ist. Dieses Ergebnis zeigt, dass das ER-Signalpeptid von APP nicht nur einen Transport zu den Mitochondrien vermitteln kann, sondern auch einen Import in die Mitochondrien. Mitochondrien verfügen allerdings über verschiedene Importwege (1.1.3.1). Über welchen Mechanismus APP•115 α 2 α 3 in die Mitochondrien transloziert, kann auf Basis der vorgestellten

Analysen nicht gesagt werden. Erste Hinweise auf die intramitochondriale Lokalisierung und damit möglicherweise auf die Art des Imports können jedoch bereits gezogen werden. APP•115 α 2 α 3AA, ein Konstrukt, bei dem die Cysteinreste der α 2 α 3-Domäne substituiert worden sind, zeigte interessanterweise eine signifikant verringerte mitochondriale Toxizität. Da für das PrP-Fragment α 2 α 3 bekannt ist, dass es unter oxidierenden Bedingungen eine Disulfidbrücke ausbildet, weist dieses Ergebnis darauf hin, dass die Cysteine von APP•115 α 2 α 3 beim Import in die Mitochondrien oxidiert werden. Da Disulfidbrücken innerhalb der Mitochondrien vermutlich nur im Intermembranraum ausgebildet werden (Herrmann & Kohl, 2007), scheint APP•115 α 2 α 3 zumindest teilweise dort lokalisiert zu sein und wahrscheinlich durch das Mia40/Erv1-Disulfidbrücken-Transfersystem oxidiert zu werden.

Desweiteren konnte dargelegt werden, dass die durch APP•115 α 2 α 3 induzierte Dysfunktion der Mitochondrien zur Beeinträchtigung der mitochondrialen Importmaschinerie führt. TRAP-1, ein Chaperon der Mitochondrienmatrix, akkumulierte unter Koexpression mit APP•115 α 2 α 3 im Zytosol. Da der Import von Proteinen in die mitochondriale Matrix vom Membranpotential abhängt, wird TRAP-1 vermutlich aufgrund des durch APP•115 α 2 α 3 geschädigten Membranpotentials nicht korrekt importiert. Zusätzlich könnte es jedoch auch sein, dass fehlerhaft importierte APP•115 α 2 α 3-Moleküle, ähnlich wie für Wildtyp-APP beschrieben, den Tom- und/oder Tim23-Komplex blockieren.

Zusammengefasst deutet sich an, dass die Toxizität von 115 α 2 α 3 mit strukturellen Merkmalen der Polypeptidkette sowie einem „anormalen“, durch ein bivalentes ER-Signalpeptid vermittelten Import in die Mitochondrien im Zusammenhang steht.

3.2.6 Die mitochondriale Zielsteuerung durch ER-Signalpeptide erfolgt als Folge eines ineffizienten ER-Imports

Zu Beginn dieser Arbeit wurden die beiden sekretorischen Proteine Sho und Som analysiert. Dabei wurde beobachtet, dass die Mutanten Sho Δ GPI und Som Δ pro, welche nicht ins ER translozieren, da sie unstrukturiert sind, mitochondrial lokalisiert sind. Nicht-translozierte sekretorische Proteine weisen ein unprozessiertes Signalpeptid auf (Miesbauer et al, 2009). Hieraus entstand der Verdacht, dass die unprozessierten N-terminalen ER-Signalpeptide von Sho Δ GPI und Som Δ pro eine sekundäre Zielsteuerung zu den Mitochondrien vermitteln können. Eine

anschließende Charakterisierung der isolierten Signalpeptide bekräftigte diese Hypothese. Es zeigte sich, dass die ER-Signalpeptide von Sho, Som und APP heterologe Proteine zu den Mitochondrien leiten. Zudem wurde deutlich, dass die drei Signalpeptide nur im Kontext unstrukturierter und damit ineffizient ins ER translozierender Konstrukte eine mitochondriale Zielsteuerung vermitteln. Nachfolgende Analysen der mitotoxischen 115 α 2 α 3-Konstrukte verwiesen zudem auf einen direkten Zusammenhang zwischen ER-Import und mitochondrialer Zielsteuerung. Sho⁻, Som⁻ und APP[•]115 α 2 α 3 werden in Abhängigkeit von ihrem Signalpeptid sowohl ins ER importiert wie auch zu den Mitochondrien geleitet. Anhand einer quantitativen Gegenüberstellung von ER-Import und mitochondrialer Toxizität wurde deutlich, dass die beiden Steuerungswege invers miteinander korrelieren. Je geringer der ER-Import eines Konstrukts war, umso höher war dessen mitochondriale Toxizität und umgekehrt.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde zum Abschluss dieser Arbeit untersucht, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen einem gescheiterten ER-Import und einer mitochondrialen Zielsteuerung besteht. Der Nachweis hierfür erfolgte durch verschiedene Analysen, die aufzeigten, dass durch eine Modulation des ER-Imports die mitochondriale Zielsteuerung beeinflusst werden kann. Zunächst wurde durch die Fusion einer GPI-Signalsequenz an APP[•]115 α 2 α 3 die ER-Translokationseffizienz erhöht, wodurch die mitochondriale Toxizität des Proteins sank. Anschließend wurde die ER-Translokation von Sho⁻ und Som[•]115 α 2 α 3 durch Koexpression von p58^{IPK} reduziert, wodurch die Schädigung der Mitochondrien signifikant zunahm. Abschließend konnte gezeigt werden, dass unter Bedingungen eines gehemmten ER-Imports auch die Wildtyp-Proteine Sho, Som und APP zu den Mitochondrien geleitet werden.

3.2.7 Wie könnte die Sekundärstruktur der Polypeptidkette die Zielsteuerung eines Proteins beeinflussen?

Im Rahmen dieser Arbeit wurde dargelegt, dass strukturierte Proteine effizient ins ER importiert werden, unstrukturierte Proteine jedoch trotz der Anwesenheit eines funktionalen ER-Signalpeptids nicht ins ER translozieren und zu einem anderen Zellorganell geleitet werden können. Es stellt sich daher die Frage wie die Sekundärstruktur eines Proteins dessen Zielsteuerung beeinflusst. Basierend auf den gezeigten Ergebnissen ist folgender Mechanismus vorstellbar (Abb. 48):

Jedes ER-Signalpeptid, unabhängig davon, ob es bivalent ist oder nicht, vermittelt zunächst eine Zielsteuerung zum ER. Der Transport zur ER-Membran verläuft vermutlich unabhängig von der Sekundärstruktur des Proteins und findet üblicherweise kotranslational statt. Basierend auf den gezeigten Analysen kann ein posttranslationaler Transport der Polypeptidkette jedoch nicht ausgeschlossen werden. An der ER-Membran neigen Proteine mit einem Mangel an Sekundärstruktur dazu nicht quantitativ ins ER zu translozieren, wodurch signifikante Mengen im Zytosol verbleiben. Strukturierte Proteine hingegen translozieren in der Regel effizient ins ER, können jedoch unter Bedingungen eines gehemmten ER-Imports ebenfalls vermehrt im Zytosol verbleiben. Unabhängig von der Ursache eines verringerten ER-Imports können nicht-translozierte sekretorische Proteine anschließend vom Proteasom degradiert werden (Hessa et al, 2011) oder, sofern sie ein bivalentes ER-Signalpeptid aufweisen, zu den Mitochondrien geleitet werden. Die im Rahmen dieser Doktorarbeit identifizierten dualen ER-Signalpeptide vermitteln eine sekundäre Zielsteuerung zu den Mitochondrien. Grundsätzlich wäre es aber vorstellbar, dass über diesen Mechanismus sekretorische Proteine auch in andere Zellkompartimente geleitet werden können.

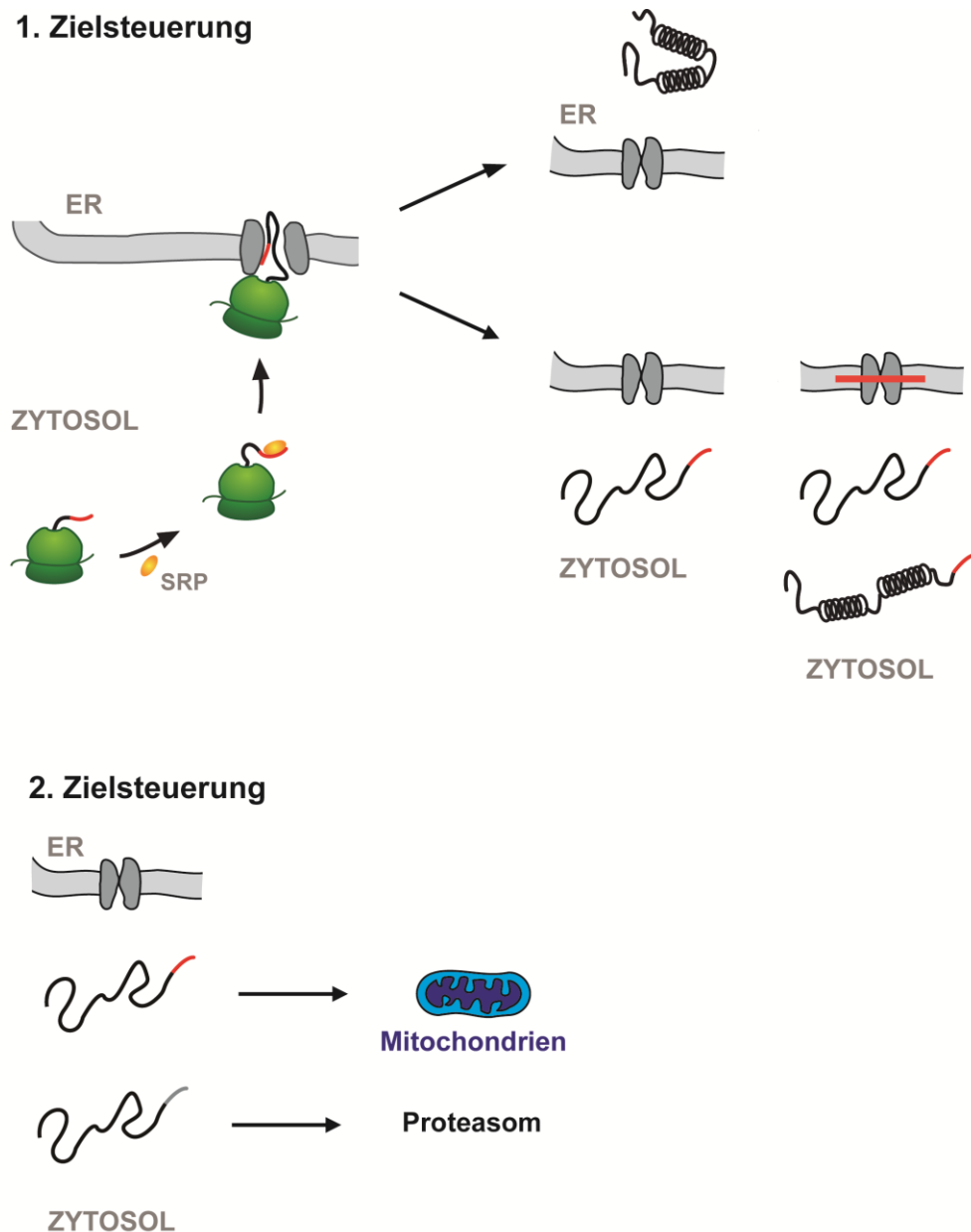


Abb. 46: Modell einer Translokations-regulierten mitochondrialen Zielsteuerung durch bivalente ER-Signalpeptide. Die Translation sekretorischer Proteine beginnt an freien Ribosomen im Zytosol. Verfügt ein Protein über ein N-terminales ER-Signalpeptid, wird es vom Signal-Erkennungs-Partikel (SRP) erkannt. SRP leitet den Ribosom-Polypeptid-Komplex zum Translokator der ER-Membran (erste Zielsteuerung). In der Regel translozieren Proteine effizient ins ER. Proteine mit einem Mangel an Sekundärstruktur translozieren jedoch häufig nicht quantitativ ins ER, wodurch signifikante Mengen im Zytosol verbleiben. Zudem kann der Proteinimport ins ER durch zelluläre Bedingungen reduziert sein. Nicht-translozierte sekretorische Proteine werden in der Regel vom Proteasom degradiert. Sekretorische Proteine, die nicht ins ER transloziert sind, tragen ein unprozessiertes Signalpeptid. Verfügt ein Protein über ein bivalentes Signalpeptid, kann eine zweite Zielsteuerung zu den Mitochondrien erfolgen.

3.2.8 Duale Zielsteuerung sekretorischer Proteine – Physiologischer Nutzen und pathophysiologische Relevanz

Abschließend stellt sich die Frage, welche physiologische Relevanz eine über die ER-Translokationseffizienz regulierte Zielsteuerung sekretorischer Proteine haben könnte.

Lange Zeit galt das Dogma *ein Gen --> eine mRNA ---> ein Protein (mit einer Lokalisierung) --> eine Funktion* (Carrie et al, 2009). Heutzutage weiß man, dass das Proteom weitaus komplexer als das Genom ist und ein Gen für verschiedene Proteine kodieren sowie ein Protein mehr als eine Lokalisierung und Funktion aufweisen kann. Eine kürzlich veröffentlichte Studie ergab, dass in Hefezellen circa ein Drittel der mitochondrialen Proteine dual lokalisiert sind (Ben-Menachem et al, 2011). Diese Quantifizierung unterstützt die seit längerem aufkommende Ansicht, dass duale Proteinlokalisierungen häufiger als bislang angenommen auftreten und nicht nur die Folge einer fehlerhaften Zielsteuerung sind, sondern einen evolutionär aufrechterhaltenen Nutzen aufweisen (Yogev & Pines, 2011). Basierend auf den derzeitigen Erkenntnissen dienen duale Zielsteuerungen vermutlich vorrangig der Erweiterung von Proteinfunktionen. Dabei kann ein Protein in unterschiedlichen Zellkompartimenten sowohl ähnliche wie auch komplett verschiedene Funktionen erfüllen. Eine auf diese Art und Weise expandierte Funktionalität ist für diverse Proteine beschrieben (beispielsweise zusammengefasst in (Arnoys & Wang, 2007; Carrie et al, 2009; Karniely & Pines, 2005; Yogev & Pines, 2011)). Einige dieser Proteine können, wie die in dieser Arbeit charakterisierten Proteine, in den Mitochondrien und in Zellkompartimenten des sekretorischen Weges lokalisiert sein. Beispiele hierfür sind die oben bereits erwähnten Enzyme NADH Cytochrom b5 Reduktase, CYP2B1 und CYP1A1 (Avadhani et al, 2011; Colombo et al, 2005). Die Zielsteuerung dieser Enzyme wird jedoch über Modifikationen des Signalpeptids oder der Polypeptidkette reguliert. Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass eine mitochondriale Zielsteuerung sekretorischer Proteine auch über die Translokationseffizienz ins ER reguliert sein kann. Da für die charakterisierten Proteine Sho, Som und APP jedoch bislang keine Funktion an den Mitochondrien bekannt ist, kann über den physiologischen Nutzen einer derartigen dualen Zielsteuerung bislang nur spekuliert werden. Vorangegangene Studien zeigten, dass duale Proteinlokalisationen über Spleißen erreicht werden können. Bislang ging man davon aus, dass dies zu Proteinvarianten mit und ohne

Signalpeptid führt. Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit könnte Spleißen auch zu einer strukturierten, effizient ins ER importierten Proteinisoform und einer unstrukturierten, nicht importierten Isoform führen. Letztere kann, sofern das Protein über ein duales Steuerungssignal verfügt, beispielsweise zu den Mitochondrien geleitet werden. Vorstellbar wäre außerdem, dass Proteine mit dualen Signalpeptiden, wie denen von Sho, Som und APP, unter Bedingungen eines reduzierten ER-Imports, wie zum Beispiel unter ER-Stress (Rane et al, 2008), gezielt zu den Mitochondrien geleitet werden und dort vorübergehend eine weitere Funktion erfüllen.

Auf Grundlage der bislang erbrachten Daten ist nicht auszuschließen, dass die beobachtete mitochondriale Zielsteuerung, vermittelt durch ER-Signalpeptide, ein evolutionäres Artefakt ist und daher vielleicht vorwiegend von pathophysiologischer Bedeutung ist. Pathogene intrazelluläre Fehllokalisationen sekretorischer Proteine sind im Kontext verschiedener humaner Erkrankungen beschrieben (Davis et al, 2007). Diese und vorangegangene Studien zeigten, dass sekretorische Proteine aufgrund eines schwachen ER-Signalpeptids, einem Mangel an Sekundärstruktur oder einem reduzierten ER-Import nicht effizient ins ER translozieren und infolgedessen Schädigungen der Zelle induzieren können (Heske et al, 2004; Levine et al, 2005; Miesbauer et al, 2009; Rambold et al, 2006). Intrazelluläre Fehllokalisationen könnten vor allem unter Bedingungen einer unzureichenden proteasomalen Degradierung pathologische Konsequenzen haben. Diese können aufgrund von ER-Stress oder Alterungsprozessen vorliegen (Menendez-Benito et al, 2005; Vernace et al, 2007). In der Tat ist für PrP beschrieben, dass ER-Stress dessen ER-Translokation verringert und damit eine toxische Lokalisation von PrP im Zytosol begünstigt (Rane et al, 2008). Wie in Abschnitt 3.2.5 erläutert worden ist, könnte eine mitochondriale Fehllokalisation von APP Teil der Pathogenese von Alzheimer sein. Da die Alzheimer-Demenz vorrangig im hohen Alter auftritt, wäre es plausibel, dass alterungsbedingte Veränderungen zur mitochondrialen Zielsteuerung von APP beitragen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die duale Zielsteuerung von Proteinen als Mechanismus zur Erweiterung von Proteinfunktionen einerseits eine wichtige physiologische Bedeutung hat, andererseits jedoch auch zu pathogenen Fehllokalisationen führen kann. Welche Rolle in diesem Zusammenhang die hier charakterisierte Translokations-gesteuerte Zielsteuerung einnimmt, muss zukünftig noch geklärt werden.

4 Zusammenfassung

Die korrekte Zielsteuerung von Proteinen ist essentiell für die Homöostase einer Zelle. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden Mechanismen untersucht, die zur Regulation der Zielsteuerung sekretorischer Proteine beitragen.

Vorangegangene Studien an pathogenen Mutanten des Prion-Proteins und Modells substraten hatten gezeigt, dass Proteine mit einem hohen Anteil intrinsisch unstrukturierter Domänen trotz eines N-terminalen ER-Signalpeptids nicht quantitativ ins ER translozieren (Miesbauer et al, 2009). Vor diesem Hintergrund wurde im ersten Teil dieser Arbeit nach Mechanismen gesucht, die den ER-Import intrinsisch unstrukturierter Proteine begünstigen. Untersuchungen des sekretorischen und unstrukturierten Proteins Shadoo ergaben, dass dessen ER-Import von der C-terminalen GPI-Signalsequenz gefördert wird. Durch weiterführende Analysen konnte gezeigt werden, dass eine GPI-Signalsequenz nicht nur der posttranslationalen Membranverankerung von Proteinen dient, sondern auch den ER-Import intrinsisch unstrukturierter Proteine verbessern kann.

Im Zuge der obigen Analysen wurde beobachtet, dass einige sekretorische Proteine nach der Deletion alpha-helikaler Domänen mitochondrial lokalisiert sind. Die genauere Untersuchung dieses Phänomens offenbarte, dass die ER-Signalpeptide der neuronalen Proteine Shadoo (Sho), Somatostatin (Som) und APP (Amyloid-Vorläuferprotein) bivalente Steuerungssignale darstellen und Proteine sowohl ins ER wie auch zu den Mitochondrien leiten können. Durch die Analyse von Deletionsmutanten und chimären Modellproteinen wurde aufgedeckt, dass die Art der vermittelten Zielsteuerung von der ER-Translokationseffizienz der Polypeptidkette abhängt. Unter physiologischen Bedingungen wurden durch die genannten Signalpeptide ausschließlich Proteine mit einem hohen Anteil an intrinsisch unstrukturierten Domänen zu den Mitochondrien geleitet. Unter Bedingungen eines gehemmten ER-Imports zeigten auch die Wildtyp-Proteine Sho, Som und APP eine mitochondriale Lokalisierung. Manche „fehlgeleitete“ Proteine induzierten zudem eine Schädigung der Mitochondrien. Zusammengefasst deuten die Ergebnisse dieser Arbeit auf einen neuartigen dualen Steuerungsmechanismus sekretorischer Proteine hin, welcher durch bivalente Signalpeptide vermittelt und über die Translokationseffizienz ins ER reguliert wird.

5 Material

5.1 Biologisches Material

5.1.1 Bakterienstämme

DH5 α	Genotyp: supE44, Δ lac169 (Φ lacZ Δ M15), hsdR17, recA1, gyrA96, thi-1, relA1 Herkunft: (Hanahan, 1983)
--------------	--

5.1.2 Zelllinien

N2a	murine Neuroblastomzellen ATCC-Nr. CCI 131 (Neuro-2a)
SH-SY5Y	humane Neuroblastomzellen DSMZ-Nr. ACC 209
HeLa	humane, epitheliale Zervixkarzinomzellen ATCC-Nr. CCL-2

5.1.3 Plasmidvektoren

pcDNA3.1/Zeo(+)	Life Technologies, Carlsbad, USA
pCDNA3-IRES-GFP	(Lang et al, 2011)
pEYFP-C1	Clontech

5.1.4 Rekombinante DNA

PrP-Konstrukte

Die in dieser Arbeit gezeigten PrP-Mutanten basieren auf einer modifizierten Nukleotidsequenz des murinen Prion-Protein Gens (*GenBank-Referenz-Sequenz: M18070*). Zur leichteren Detektion der PrP-Konstrukte wurden zwei Punktmutationen in die murine Nukleotidabfolge eingeführt. Die Mutationen L108M und V111M entsprechen den Aminosäuren des humanen Prion-Proteins und ermöglichen so die Detektion der Proteine mit dem monoklonalen Antikörper 3F4.

Sho-Konstrukte

Die gezeigten Sho-Konstrukte basieren auf der Sequenz des humanen Sho Proteins. (NCBI-Referenz-Sequenz: NP_001012526.2)

Zur Detektion der Proteine wurde ein V5-Tag (5'-GGT AAA CCG ATA CCG AAC CCG CTC CTC GGT CTC GAT TCG ACG-3') zwischen den Aminosäuren 124 und 125 eingefügt.

Som-Konstrukte

Die gezeigten Som-Konstrukte basieren auf der Sequenz des humanen Pre-Pro-Somatostatins (NCBI-Referenz-Sequenz: NP_001039.1).

Zur Detektion der Proteine wurde ein C-terminaler V5-Tag (5'-GGT AAA CCG ATA CCG AAC CCT CTG CTC GGT CTG GAT AGC ACG-3') eingefügt.

APP-Konstrukte

Als Wildtyp-APP wurde in dieser Arbeit das humane Amyloid Precursor Protein in seiner 695 Aminosäure langen Isoform eingesetzt. (NCBI-Referenz-Sequenz: NP_958817.1) Die Referenzsequenz für die isolierte APP Signalsequenz ist die selbe.

UCR1-Konstrukte

Zur Klonierung des Konstrukts UCR1-115 α 2 α 3 wurde das mitochondriale Signalpeptid (AS 1-34) der murinen Ubiquinol Cytochrom C Reduktase Komplex Untereinheit 1 (NCBI-Referenz-Sequenz: NP_079683.2) mit der PrP-Mutante 115 α 2 α 3 fusioniert.

Tau-Konstrukte

Sequenz des eingesetzten Fragments des humanen Tau Proteins (Aminosäure 103-197):

AEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTVQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGA
APPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPKSGDRSGY

Auflistung der nicht neu klonierten DNA-Konstrukte

Genauere Angaben zu den für diese Arbeit neu klonierten Konstrukten finden sich unter Punkt 6.1.7.

Konstrukt	Beschreibung	Vektor	Quelle
APP 695	Isoform Variation zum humanen APP 770: E289 → V289, Δ290-364	pcDNA3.1/Zeo(+)	Margit Miesbauer
APP•115α2α3	APP(AS 1-24) + PrP(AS 1-114+ 171-221)	pcDNA3.1/Zeo(+)	Margit Miesbauer
EYFP	-	pEYFP-C1	Clontec
GFP	-	pCDNA3-IRES- pcDNA3.1/Zeo(+) GFP	(Lang et al, 2011)
PrP	Murines Prion-Protein	pcDNA3.1/Zeo(+)	pcDNA3.1-3F4 (Gilch et al, 2004)
PrP•115	PrP(AS 1-114) artifiziell NFT-Motiv: W31→N, N32→F	pcDNA3.1/Zeo(+)	Sophia Kiachopoulos
PrP•115GPI	PrP(AS 1-114 + 231-254) artifiziell NFT-Motiv: W31→N, N32→F	pcDNA3.1/Zeo(+)	Sophia Kiachopoulos
PrP•115115	PrP(AS 1-114 + 23-114) artifiziell NFT-Motiv: W31→N, N32→F	pcDNA3.1/Zeo(+)	Margit Miesbauer
PrP•115115GPI	PrP(AS 1-114 + 23-114 + 231-254) artifiziell NFT-Motiv: W31→N, N32→F	pcDNA3.1/Zeo(+)	Margit Miesbauer
PrP•115-Tau	PrP(AS 1- 114)+Tau(AS103-197) artifiziell NFT-Motiv: PrP(W31→N, N32→F)	pcDNA3.1/Zeo(+)	Margit Miesbauer
P58^{IPK}	-	pcDNA3.1/Zeo(+)	David Ron (Oyadomari et al,

2006)			
ΔSS•115α2α3	PrP (AS 23-114 + 171-221)	pcDNA3.1/Zeo(+)	Margit Miesbauer
PrP•115α2α3	PrP (AS 1-114 + 171-221)	pcDNA3.1/Zeo(+)	Margit Miesbauer
PrP•115α2α3C 178AC213A	PrP (AS 1-114 + 171-221) C178 → A178 C213 → A213	pcDNA3.1/Zeo(+)	Margit Miesbauer
Sho	Humanes Shadoo	pcDNA3.1/Zeo(+)	Vignesh Sakthivelu
ShoΔGPI	ShoΔ(AS127-151)	pcDNA3.1/Zeo(+)	Vignesh Sakthivelu
ΔSS•ShoΔGPI	ShoΔ(AS 1-24)Δ(AS 127-151)	pcDNA3.1/Zeo(+)	Vignesh Sakthivelu
ΔSS•Sho	ShoΔ(AS 1-24)	pcDNA3.1/Zeo(+)	Vignesh Sakthivelu
Som	Humanes Pre-Pro-Somatostatin	pcDNA3.1/Zeo(+)	Daniela Dirndorfer
SomΔpro	SomΔ(AS 25-88)	pcDNA3.1/Zeo(+)	Daniela Dirndorfer
SomΔhor	SomΔ(AS 89-116)	pcDNA3.1/Zeo(+)	Daniela Dirndorfer
UCR1•PrP	UCR1(AS 1-34) + PrP(AS 28-231)	pcDNA3.1/Zeo(+)	Angelika Rambold
TRAP-1	humanes TRAP-1	pcDNA3.1+	Aaron Voigt (Butler et al, 2012)

5.1.5 Small interfering RNA (siRNA)

Sec61A1-Knockdown in SHSY-5Y Zellen

Anti-Sec61 alpha Isoform 1
Stealth RNAi siRNA
(UACCAGUACUUUGAGAUCUUCGUUA)

Invitrogen/Life Technologies,
Carlsbad, CA, USA

Stealth RNAi siRNA
negative control med GC

Invitrogen/Life Technologies,
Carlsbad, CA, USA

Sec61A1-Knockdown in HeLa-Zellen

Anti-Sec61 alpha Isoform 1 siRNA
(CACUGAAAUGUCUACGUUUt)

Applied Biosystems/ Life
Technologies, Carlsbad, USA

Kontroll siRNA
AllStars Negative Control siRNA

Qiagen, Hilden

5.1.6 Synthetische Oligonukleotide

Die Synthese der Oligonukleotide (PCR-Primer) erfolgte durch die Firma Thermo Fisher Scientific GmbH (Ulm). Zur Durchführung einer PCR wurden die erhaltenen Lysate in autoklaviertem Reinstwasser gelöst und auf eine Konzentration von 2 pmol/μl verdünnt.

Auflistung der verwendeten PCR-Primer:

Die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen sind **fett** hervorgehoben.

Primername	Sequenz 5' → 3'
HindIII_PrP_fw	ccca agctt atggcgaacctg
HindIII_huSho_fw	ccca agctt gccaccatgaactgggcacccgcaacg
HindIII_cytoSho_fw	ccca agctt gccaccatgaagggcggccgagggtg
HindIII_Som_fw	ccca agctt atgctgtcctgccgctccag
HindIII_APP_fw	ccca agctt atgctgcccggttggcactg
HindIII_UCR_fw	ccca agctt gggatggcggcgtccgcagtc
Sho-SS_PrP_fw	aagggcggccgagggtaaaaagcggccaaagcc
Sho-SS_PrP_rev	gcttggccgcttttacctccgcgccgacctg
Som-SS_PrP_fw	gggctgtgtcaccggcaaaaagcggccaaagcctgg
Som-SS_PrP_rev	ggcttggccgcttttgcgggtgacacagcccagg
APP-SS_PrP_fw	gaggtaccactgatggtaaaaagcggccaaagcct
APP-SS_PrP_rev	aggcttggccgcttttacctcagtggttacctc
UCR-SS_fw	ttacctgccttgccgggtaaaaagcggccaaagcct
UCR-SS_rev	aggcttggccgcttttaccgccaaagcaggtaa
PrP -Tau_fw	ggaggaatttcaccggtgctgaagaagcaggcatt
PrP-Tau_rev	aatgcctgcttctcagcaccggtgaaattccctcc
α2α3_GPI_fw	cagtaccagaaggagtccagcagcaccgtgctttc
α2α3_GPI_rev	gaaaagcacggtgctgctggactcctctggtactg
Q159GPI_fw	atgtaccgctaccctaactccagcagcaccgtgc
Q159GPI_rev	gaaaagcacggtgctgctggagttaggtagcggtagc
Tau220Xho1_rev	ccg ctcgag cgggtcagtagccgctgcatcccctga

115_Xho1_rev	ccgctc gag tcaagcccctgccatatgcttcat
115α2α3_Xho1_rev	gcgctc gag cggttaggactccttctggtactg
moPrP_NotI_rev	atagtttagc ggccg ctcatcccacg
PrPGPI_Xho1_rev	ccgctc gag cggtcatcatcccacgatcaggaag
PrPΔGPI_Xho1_rev	ccgctc gag cggtcaggatcttctcccgtcg

5.1.7 Antikörper

Erstantikörper	[m = monoklonal, p = polyklonal]	
Anti- β -Aktin	m	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-ACTIVE Caspase 3	p	Promega, Madison, WI, USA
Anti-APP 22C11 MAB348	m	Millipore, Schwalbach
Anti-Giantin	m	Alexis/Enzo Life Sciences, Lörrach
Anti-PrP 3F4	m	Signet Lab., Dedham, MA, USA (Kacsak et al, 1987)
Anti-PrP A7	p	(Winklhofer et al, 2003)
Anti-Sec 61 α	p	Zimmermann
Anti-Tau HT-7	m	Pierce/Thermo, Rockford, IL, USA
Anti-Tim 23	m	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-Tom 20 (FL-145)	p	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA
Anti-TRAP 1 Hsp75 (42)	m	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA
Anti-V5	m	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Anti-V5	p	Millipore, Schwalbach
Zweitantikörper		
Alexa Fluor 488 anti-Maus Antikörper		Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Alexa Fluor 488		Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
anti-Kaninchen Antikörper		
Alexa Fluor 555 anti-Maus Antikörper		Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Alexa Fluor 555 anti-Kaninchen Antikörper		Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

Alexa Fluor 647 anti-Maus Antikörper	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Alexa Fluor 647 anti-Kaninchen Antikörper	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
HRP-gekoppelter anti-Maus Antikörper	Promega, Madison, WI, USA
HRP-gekoppelter anti-Kaninchen Antikörper	Promega, Madison, WI, USA

Antikörperverdünnungen

Antikörper	Western Blot	Immunfluoreszenz
Anti-β-Aktin	1:2000 in PBS-T	
Anti-ACTIVE Caspase 3		1:500 in 1% BSA
Anti-APP 22C11		1:1000 in 1% BSA
Anti-Giantin		1:1000 in 1% BSA
Anti-PrP 3F4	1:3000 in PBS-T	1:100 in 1% BSA
Anti-PrP A7		1:600 in Blockierungspuffer
Anti-Sec61α	1:250 in PBS-T	
Anti-Tau HT-7	1:500 in Milch	1:200 in 1% BSA
Anti-Tim 23	1:5000 in PBS-T	
Anti-Tom 20	1:10.000 in PBS-T	1:2000 in 1 % BSA
Anti-TRAP1	1:2000 in Milch	1:500 in 1 % BSA
Anti-V5, monoklonal	1:5000 Milch	1:200 in 1% BSA
Anti-V5, polyklonal		1:500 in 1% BSA
Alexa Fluor Zweitantikörper		1:400 in 1% BSA
HRP-gekoppelte Zweitantikörper	1:10.000 in PBS-T	

5.1.8 Standardgrößenmarker für Proteine und Nucleinsäuren

See Blue Plus2 Pre-stained Protein Standard	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
1 kb DNA-Leiter	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
100 bp DNA-Leiter	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

5.1.9 Biologische Reagenzien

BSA	USB, Cleveland, OH, USA
Pfu-Polymerase	Promega, Madison, WI, USA
PNGase F	Roche Diagnostics, Mannheim
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach
Shrimp-Alkaline-Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Schwalbach
Trypsin-EDTA (500mg/l) # 25300-062	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

5.2 Chemische Reagenzien

Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid/Bisacrylamid Solution 37.5:1 (40 % w/v)	Serva, Heidelberg
Agarose	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Boehringer Mannheim, Mannheim
Amplify	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	USB, Cleveland, OH, USA
Bacto Trypton	BD, Sparks, MD, USA
Bacto Agar	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Desoxycholat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Desoxynucleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Dinatriumhydrophosphat	Merck, Darmstadt
DMSO	Merck, Darmstadt
EDTA	USB, Cleveland, OH, USA
Eeyarestatin I	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formamid	Merck, Darmstadt
Fötiales Kälberserum	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
FuGene	Promega, Madison, WI, USA
Glutamin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycerol	USB, Cleveland, OH, USA
Glycin	USB, Cleveland, OH, USA
Harnstoff	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Hepes	Biomol, Hamburg
HiPerFect Reagent	Qiagen, Hilden
Instant-Magermilchpulver	Frema Reform, Heimertingen
Kaliumactetat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumchlorid	USB, Cleveland, OH, USA
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kupfersulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lipofectamin Reagent	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Lipofectamin RNAiMAX	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Magnesiumchlorid	USB, Cleveland, OH, USA
Manganchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol	Merck, Darmstadt
L-[35S] Methionin >37 TBq/mmol	Hartmann Analytics, Braunschweig
MG-132	Merck, Darmstadt
MitoTracker Red CMXRos	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Mowiol	Merck, Darmstadt

Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd (37 %)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin (100x) P11-010	PAA Laboratories, Pasching
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Plus Reagens	Life Technologies, Carlsbad, USA
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protease-Inhibitor Mix	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protein G-Sepharose	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Rubidiumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Sarkosyl	USB, Cleveland, OH, USA
SDS	Roth, Karlsruhe
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	USB, Cleveland, OH, USA
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris	USB, Cleveland, OH, USA
Triton X-100	USB, Cleveland, OH, USA
Trypan Blau	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Tunicamycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween-20	USB, Cleveland, OH, USA

5.3 Lösungen und Puffer

Anodenpuffer (5x) <i>SDS-PAGE im Bio-Rad-System</i>	1 M Tris-HCl pH 8,9 H ₂ O ad 1000 ml
APS-Lösung	10 % Ammoniumperoxodisulfat in PBS
Blockierungsmilch <i>Western Blot</i>	5 % Magermilchpulver in 1x PBS-T
Blockierungspuffer <i>Immunofluoreszenz</i>	5 % Pferdeserum in 0,1 % Tween-20 in PBS

BSA (100x)	New England Biolabs, Schwalbach
Coomassie-Entfärbelösung	40 % Methanol 7 % Essigsäure
DNA-Probenpuffer (6x)	0,25 % Bromphenolblau 30 % Glycerol
Eeyarestatin I	10 mM in DMSO
Entwickler G153 A+B	AGFA HealthCare, Septestraat, Belgien
Fixierlösung G354	AGFA HealthCare, Septestraat, Belgien
Gelpuffer <i>SDS-PAGE-Gele (Bio-Rad)</i>	3 M Tris-HCl pH 8,45 0,3 % SDS
Kathodenpuffer (1x) <i>SDS-PAGE im Bio-Rad-System</i>	0,1 M Tris-HCl 0,1 M Tricin 0,1 % SDS H ₂ O ad 1000 ml
Laemmli-Probenpuffer (4x)	240 mM Tris pH 6,8 4 % SDS 40 % Glycerol 1 % Bromphenolblau 4 % Mercaptoethanol
Laemmli-Probenpuffer (2x)	1 Teil Laemmli-Probenpuffer (4x) 1 Teil Wasser
Laufpuffer <i>SDS-PAGE im Hoefer-System</i>	250 mM Tris, pH 6,8 1,9 M Glycin 1 % SDS
Lysepuffer	0,5 % Triton X-100 0,5 % DOC in PBS Zusatz: Protease-Inhibitor Cocktail 1:500
MG-132	10 mM in DMSO
Mitopuffer	20 mM HEPES-KOH pH 7,5 220 mM Mannitol 70 mM Sucrose 1 mM EDTA
MitoTracker Red CMXRos, gelöst	1 mM in DMSO
Mowiol	6 g Glycerol 2,4 g Mowiol 6 ml Wasser 12 ml Tris-HCl pH 8,5

Paraformaldehyd-Lösung (3,7 % zum Fixieren von Zellen)	1 Teil Paraformaldehyd 37 % 9 Teile PBS +/-
PBS, Dulbecco's <i>ohne Calcium und Magnesium</i> (Zellkultur, steril)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
PBS +/-, Dulbecco's <i>mit Calcium und Magnesium</i> (Immunfluoreszenz)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
PBS unsteril (10x)	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 2,4 g KH ₂ PO ₄ H ₂ O ad 1000 ml
PBS-T (10x)	1 % Tween-20 in 1x PBS
Pfu-PCR-Mix	1200 µl autoklaviertes Reinstwasser 200 µl 10x Pfu-Polymerase-Puffer je 2 µl dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
Pfu-Polymerase-Puffer	Promega, Madison, WI, USA
PMSF 200 mM	200 mM Phenylmethylsulfonylfluorid in DMSO
Ponceau S-Färbelösung	0,2 g Ponceau S 5 ml Essigsäure H ₂ O ad 100 ml
Restriktionsendonuklease- Puffer (10x) (Nr. 2)	New England Biolabs, Schwalbach
Sammelgelpuffer <i>SDS-PAGE-Gele (Hofer-System)</i>	0,5 M Tris pH 6,8 0,4 % SDS
Shrimp-Alkaline-Phosphatase- Puffer (10x)	Roche Diagnostics, Mannheim
T4-DNA-Ligase-Puffer (10x)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 7,5 1 mM EDTA, pH 8,0
TFB1-Puffer <i>Herstellung kompetenter E.colis</i>	30 mM Kaliumacetat 100 mM RbCl 10 mM CaCl ₂ 50 mM MnCl ₂ 15 % Glycerol pH 5,8

TFB2-Puffer <i>Herstellung kompetenter E.colis</i>	10 mM MOPS 75 mM CaCl ₂ 10 mM RbCl 15 % Glycerol pH 6,5
Transferpuffer <i>Bio-Rad-System</i>	2,9 g/l Tris 14,5 g/l Glycin 20 % Methanol
Transferpuffer <i>Hofer-System</i>	20 mM Tris-Base 150 mM Glycin 0,01 % SDS 20 % Methanol
Trenngelbuffer <i>SDS-PAGE-Gele (Hofer-System)</i>	1,5 M Tris, pH 8.8 0,4 % SDS
Tunicamycin	10 mg/ml in H ₂ O

5.4 Medien

Minimal Essential Medium (MEM)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Minimal Essential Medium (MEM) ohne L-Methionin	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Opti-MEM	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
LB-Medium	1 % Natriumchlorid 1 % Bacto Trypton 0,5 % Hefeextrakt 100 µg/ml Ampicillin
LB-Agar	1,5 % Bacto Agar 100 µg/ml Ampicillin in LB-Medium

5.5 Kits

Amersham ECL Western Blotting detection reagents RPN 2106	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Bio-Rad Protein Assay <i>Proteinkonzentrationsbestimmung</i>	Bio-Rad, Hercules, CA, USA

Nucleospin Extract II	Macherey-Nagel, Düren
Nucleospin Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
Nucleobond Xtra Midi	Macherey-Nagel, Düren
Immobilon Western Chemolumineszenz HRP Substrat	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Pure Link HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

5.6 Geräte

Agarosegel- Dokumentationssystem Gel iX Imager	Intas Science Imaging Instruments, Göttingen
Agarosegel- Elektrophorese-Kammern	Zentralwerkstatt, MPI, Martinsried
Analysenwaage Sartorius bp 3100s	Sartorius, Apeldoorn, Niederlande
Bio-Rad-Kammer Mini-Protean 3 Cell	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Chemilumineszenzmesser Fujifilm LAS-4000	Fujifilm Life Science, Stamford, CT, USA
Filmentwickler Cawomat 2000 IR	Cawo Photochemisches Werk, Schrobenhausen
Elektrophorese Netzgerät EPS 301 Electrophoresis Power Supply	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Gefrierschrank Premium NoFrost	Liebherr, Bulle, Schweiz
Geltrockner Model 583	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Inkubationsschränke	Binder, Tuttlingen
Inkubationsschüttler Certomat BS-1	Braun Biotech International, Melsungen
Kühlschrank Premium	Liebherr, Bulle, Schweiz
Mikroskop Axiovert 200M	Carl Zeiss, Göttingen
Mikroskop Axioscope 2 plus	Carl Zeiss, Göttingen

Mikroskop Wilovert S	Hund, Wetzlar
Mikrowelle	Sharp, Osaka, Japan
Mikrozentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetten Gilson P2, P10, P20, P100, P200	Abimed, Langenfeld
Pipette Research 1000	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhelfer Accu-jet pro	Brand, Wertheim
Polyacrylamid-Elektrophorese- Kammer Hoefer SE6000	Hoefer, Holliston, MA, USA
Polyacrylamid-Elektrophorese- Zubehör für Hoefer	Hoefer, Holliston, MA, USA
Präzisionswaage Sartorius BP 221 S	Sartorius, Apeldoorn, Niederlande
Reinstwasseranlage Milli-Q Academic	Millipore, Eschborn
Schwenktisch GFL 3017	GFL, Burgwedel
Schwenktisch Reax 3	Heidolph, Schwabach
Sicherheitswerkbank HeraSafe	Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA
Spektralphotometer Nanophotometer	Implen, München
Spektralphotometer PowerWave XS Microplate Reader	Biotec, Winooski, VT, USA
Thermocycler T1	Biometra GmbH, Göttingen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Transferkammer Hoefer TE-62	Hoefer, Holliston, MA, USA
Transfernetzgerät Power Supply EPS 2A200	Hoefer, Holliston, MA, USA
Ultrazentrifuge Optima Max-E	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Vacuumpumpe BVC21	Vacuumbrand, Wertheim
Vortexer	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Wasserbad	GFL, Burgwedel

Zellkulturschränke Hera cell	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Multifuge 3SR	Heraeus, Hanau

5.7 Sonstige Materialien

Blottingpapier	Macherey-Nagel, Düren
Deckgläschen Menzel-Glas	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Einmalkanülen Sterican	Braun, Melsungen
Einmalpipetten, steril	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalspritzen	Terumo, Leuven, Belgien
Filme (für Chemilumineszenz) Fuji Medical X-Ray	Fujifilm Life Science, Stamford, CA, USA
Filme (für 35-S-markierte Proben) BioMax MR	Kodak, Stuttgart
Filmkassetten	Fischer Scientific, Pittsburgh, PA, USA
Objektträger Menzel-Glas	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Polypropylen-Zentrifugenröhren	Sarstedt, Nümbrecht
Safe-Lock Micro Test Tubes	Eppendorf, Hamburg
Mikro-Schraubröhre 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Nitrocellulose Membran Protran 0,45 µm	Whatman/GE Healthcare, Little Chalfont, UK
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml	Abgene, Hamburg
Skalpellklinge	Bayha, Tuttlingen
Sterilfilter 0,22 µm	VWR, Darmstadt
Zählkammer, Neubauer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Zellheber	Corning, Tewksbury, MA, USA
Zellkulturgefäße (Flaschen, Platten, Schalen)	Nunc, Roskilde, Dänemark

6 Methoden

6.1 Molekularbiologische Methoden

Die in dieser Arbeit eingesetzte rekombinante DNA wurde durch Standardtechniken der Plasmid-Klonierung hergestellt. Hierzu wurden die untersuchten Genvariationen mittels Polymerase-Kettenreaktion generiert und durch Restriktion und Ligation in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1/Zeo(+) integriert. Die so gewonnene rekombinante DNA wurde in kompetenten *Escherichia coli* Bakterien amplifiziert und nach Plasmid-Präparation zur Transfektion der eukaryotischen Zielzellen eingesetzt. Die einzelnen Schritte einer Klonierung sind im Folgenden erläutert. Eine detaillierte Auflistung der Klonierungsstrategien neuer Konstrukte befindet sich am Ende dieses Abschnittes.

6.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) ist eine molekularbiologische Methode zur *in vitro* Amplifizierung von DNA (Saiki et al, 1988). Hierbei werden einzelne Fragmente einer DNA mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase sowie mehrerer Oligonukleotide (*Primer*) selektiv amplifiziert. Darüber hinaus kann die PCR, durch eine gezielte Gestaltung der Primer, zur Erzeugung von Mutationen der DNA eingesetzt werden. Diese Methode der PCR-basierten Mutagenese wurde in der vorliegenden Arbeit zur Herstellung neuartiger DNA-Konstrukte verwendet. Einfache Mutationen, wie beispielsweise die Deletion eines Signalpeptids, wurden durch Mutations-kodierende Primer in einer einstufigen PCR generiert (Abb. 49). Die Synthese von DNA-Konstrukten, bei denen mehrere DNA-Abschnitte miteinander fusioniert wurden, erfolgte durch eine mehrstufige Überlappungs-Extensions-PCR (Abb. 50).

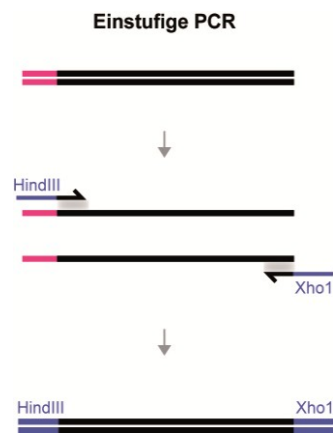


Abb. 49: Schematische Darstellung einer einstufigen Mutations-PCR
am Beispiel der Deletion eines ER Signalpeptids

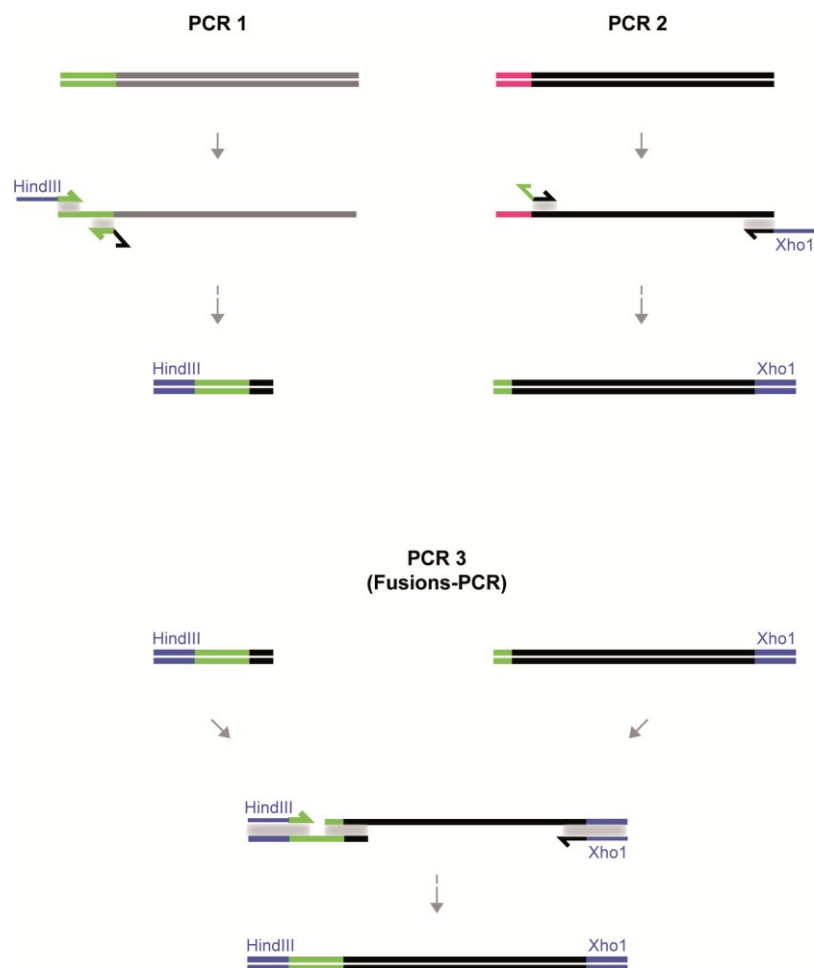


Abb. 50: Schematische Darstellung einer Überlappungs-Extensions-PCR
am Beispiel der Substitution eines ER Signalpeptids

Zur Durchführung einer PCR wurden 100 ng Plasmid-DNA (Matrizen-DNA), 4 pmol jedes Primers, je 0,25 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, DMSO und Pfu-Reaktionspuffer nach dem unten angegebenen Schema auf Eis gemischt und kurz vor dem Start der PCR 1,5 Einheiten Pfu-Polymerase zugegeben.

Standard-PCR-Pipettierschema (0,2 ml PCR-Gefäß)

18,5 µl	Pfu-PCR-Mix
1 µl	Matrizen-DNA (100 ng/µl)
2 µl	Vorwärts-Primer (2 pmol/µl)
2 µl	Rückwärts-Primer (2 pmol/µl)
1,5 µl	DMSO
0,5 µl	Pfu-Polymerase (3 Einheiten/µl)

Für die Fusions-PCR einer Überlappungs-Extensions-PCR wurde das Standard-PCR-Pipettierschema wie folgt abgewandelt:

Pipettierschema einer Fusions-PCR

18,5 µl	Pfu-PCR-Mix
1 µl*	DNA-Fragment aus PCR 1
1 µl*	DNA-Fragment aus PCR 2
2 µl	Vorwärts-Primer (2 pmol/µl)
2 µl	Rückwärts-Primer (2 pmol/µl)
1,5 µl	DMSO
0,5 µl	Pfu-Polymerase (3 Einheiten/µl)

* bezogen auf eine Agarose-Gelextraktion mit einem Elutionsvolumen von 30 µl.

Der fertige PCR-Ansatz wurde unter den nachfolgenden PCR-Bedingungen amplifiziert. Die Höhe der Temperatur für die Primer-Anlagerung (*Annealing* Temperatur) wurde dabei an die jeweiligen Schmelzeigenschaften der verwendeten Primer angepasst.

PCR-Phase	Zeit	Temperatur	
Denaturierung	2 min	96 °C	
Denaturierung	30 sec	96 °C	28 x
Annealing	60 sec	54-58 °C	
Elongation	90 sec	72 °C	
Finale Elongation	5 min	72 °C	
Abschließende Kühlung	∞	4 °C	

6.1.2 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die durch PCR amplifizierten DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt. Hierzu wurde der PCR-Ansatz mit 5 µl DNA-Probenpuffer (6x) versetzt und über ein 1 %iges Ethidiumbromid-Agarosegel bei 75 Volt aufgetrennt. Eine eindeutige Identifizierung des gewünschten PCR-Fragments erfolgte über einen Höhenvergleich mit einer 100bp-DNA-Leiter. Die mittels UV-Licht sichtbar gemachten PCR-Produkte wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNA unter Verwendung des Nucleospin Extract II Gelextraktions-Kits isoliert. Die Durchführung erfolgte nach Anweisung des Herstellers, wobei die aufgereinigte DNA in 30 µl Elution-Puffer eluiert wurde.

6.1.3 Restriktion und Ligation

Die Integration der aufgereinigten PCR-Fragmente in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1/Zeo(+) erfolgte durch enzymatische Restriktion und Ligation.

Hierbei werden die endständigen Restriktionssequenzen eines PCR-Produkts (vergleiche 6.1.1 Abb. 49 und 50, blau) sowie die äquivalenten Schnittstellen des Expressionsvektors durch enzymatischen Verdau mit dem gleichen Enzym freigesetzt. Durch die so entstehenden zueinander passenden Enden kann das PCR-Fragment mittels einer Ligase in die Vektorsequenz integriert werden. Um eine korrekte Orientierung des PCR-Fragments im Zielvektor zu gewährleisten, wurden in dieser Arbeit Schnittsequenzen zweier unterschiedlicher Restriktionsenzyme an

die DNA-Fragmente fusioniert. In der Regel *HindIII* an das 5'-Ende in Kombination mit *XhoI*, *XbaI* oder *NotI* am 3'-Ende des PCR-Fragments.

Durchführung

Das PCR-Produkt sowie der Zielvektor wurden je 3 h bei 37 °C enzymatisch verdaut. Die jeweiligen Ansätze sind tabellarisch dargestellt.

Restriktionsverdau des PCR-Produkts

30 µl	aufgereinigtes PCR-Fragment (Eluat der Agarosegelextraktion)
4 µl	10x BSA
4 µl	10x Restriktionsendonuklease-Puffer
1 µl	Restriktionsendonuklease 1
1 µl	Restriktionsendonuklease 2

Restriktionsverdau des Zielvektors (Ansatz für 8 Ligationen)

5 µl	pcDNA3.1/Zeo(+) (1 µg/µl)
4 µl	10x BSA
4 µl	10x Restriktionsendonuklease-Puffer
1 µl	Restriktionsendonuklease 1
1 µl	Restriktionsendonuklease 2
25 µl	autoklaviertes Wasser

Zur Inaktivierung der Restriktionsenzyme wurden die Ansätze für 20 min auf 65 °C erhitzt. Der durch den enzymatischen Verdau linearisierte Zielvektor wurde darüber hinaus wie in Abschnitt 8.1.2 beschrieben durch eine Agarosegel-Elektrophorese mit anschließender Gelextraktion aufgereinigt.

Die anschließende Ligation von verdautem PCR-Produkt und linearisiertem Vektor erfolgte 16 h bei 16 °C.

Ligations-Ansatz	
12 µl	PCR-Produkt (nach Restriktionsverdau)
5 µl	linearisierter Vektor
2 µl	10x T4-Ligase-Puffer
1 µl	T4-Ligase

Zur Inaktivierung der T4-Ligase wurde der Ansatz für 20 min auf 65 °C erhitzt.

6.1.4 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Da die zur Amplifikation rekombinanter Plasmid-DNA eingesetzten *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien über keine ausreichende natürliche Kompetenz (Fähigkeit Fremd-DNA aufzunehmen) verfügen, wurden sie zunächst chemisch transformationskompetent gemacht. Hierzu wurden *E.coli* Bakterien des Stammes DH5α mit Rubidiumchlorid behandelt, wodurch die Durchlässigkeit der bakteriellen Zellmembran erhöht wird.

Durchführung

2 ml *Luria Broth* (LB)-Medium wurden unter sterilen Bedingungen mit dem *E.coli*-Stamm DH5α angeimpft und 16 h bei 37 °C kultiviert. Die Vorkultur wurde dann in 250 ml LB-Medium überführt und die Bakterien bis zum Erreichen einer OD600 zwischen 0,4 und 0,6 inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten OD, üblicherweise nach 2 bis 3 Stunden, wurden die Bakterien bei 3750 rpm und 4 °C 5 min abzentrifugiert. Die entstandenen Bakterienpellets wurden in 100 ml eiskaltem TFB1-Puffer resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Abzentrifugieren der Bakterien (3750 rpm, 4 °C, 5 min) wurden diese in 10 ml eiskaltem TFB2-Puffer resuspendiert, 60 min auf Eis inkubiert und für die Lagerung bei -80 °C aliquotiert.

6.1.5 Transformation

Zur Transformation kompetenter DH5α Zellen mit rekombinanter Plasmid-DNA wurden 100 µl Bakteriensuspension mit 10 µl des Ligations-Ansatzes (6.1.3) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der Fremd-DNA in die Bakterienzellen wurde durch einen kurzzeitigen Hitzeschock (90 sec, 42 °C) initiiert. Die nun transformierten Bakterien wurden nach 5-minütiger Abkühlung auf Eis in

400 µl LB-Medium (ohne Antibiotikum) resuspendiert, auf Ampicillin-LB-Agarplatten ausgestrichen und circa 16 h bei 37 °C kultiviert.

6.1.6 DNA-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

6.1.6.1 Präparation von neu klonierter Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (Mini-Präparation)

Im Anschluss an die Übernachtinkubation der transformierten *E.colis* wurden einzelne Klone mittels einer sterilen Pipettenspitze von der Agarplatte entnommen, in je 5 ml Ampicillin-LB-Medium überführt und 16 h bei 37 °C inkubiert. Nach Abzentrifugation der transformierten Bakterien (3750 rpm, 4 °C, 15 min) wurden die einzelnen Plasmid-Klone mit dem Nucleospin Plasmid Mini-Präparations Kit gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt.

Zur Identifizierung der erfolgreich transformierten Bakterien-Klone wurden Proben der durch Mini-Präparationen einem Kontrollverdau unterzogen. Hierfür wurden 3 µl Mini-Präparations-Eluat mit den bei der Klonierung verwendeten Restriktionsenzymen 3 h bei 37 °C verdaut und die Freisetzung des integrierten PCR-Fragments mittels Agarose-Gelelektrophorese (wie unter 6.1.2 beschrieben) überprüft.

Kontrollverdau-Ansatz (1x)

3 µl	Mini-Präparations-Eluat (aufgereinigte Plasmid-DNA) *
1 µl	10x BSA
4 µl	10x Restriktionsendonuklease-Puffer
1 µl	Restriktionsendonuklease 1
1 µl	Restriktionsendonuklease 2
4,8 µl	autoklaviertes Wasser

* 3 µl bei einem Mini-Präparations-Eluat von 30 µl

Die Überprüfung der neu hergestellten DNA erfolgte mittels Sequenzierung durch die Firma GATC Biotech AG (Konstanz).

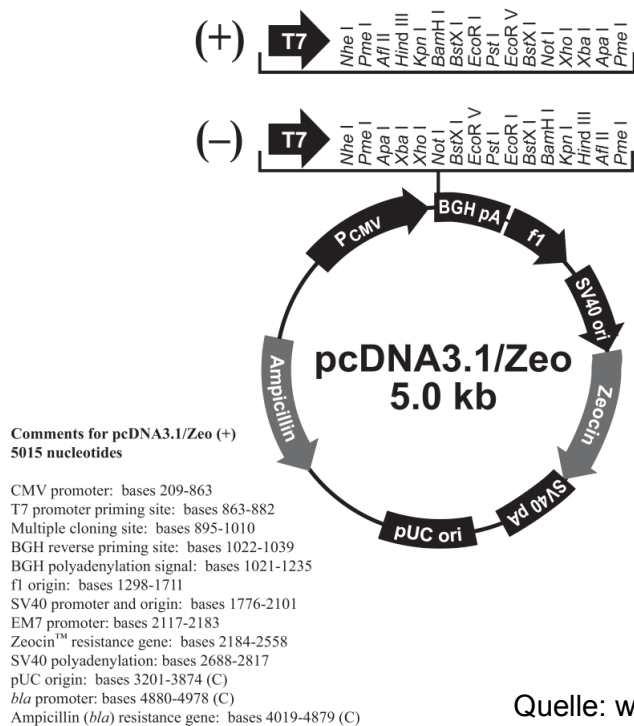
6.1.6.2 Präparation von Plasmid-DNA im größeren Maßstab (Midi-Präparation)

Zur Herstellung von Plasmid-DNA im größeren Maßstab wurde eine Transformation von 100 µl Bakteriensuspension mit 1 µg Plasmid-DNA wie oben beschrieben durchgeführt und die DNA mit dem Nucleobond Xtra Midi Kit gemäß Herstellerangaben aufgereinigt. Zur Herstellung endotoxin-freier Plasmid-DNA wurde genauso verfahren, jedoch wurde die DNA mit dem Pure Link HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit isoliert.

6.1.7 Klonierung neuer DNA-Konstrukte

Die für diese Arbeit neu entworfenen DNA-Konstrukte wurden durch die oben beschriebenen Standardtechniken der Plasmid-Klonierung hergestellt (siehe 6.1.1 - 6.1.6). Die jeweils verwendeten Primer und Restriktionsenzyme sind im Folgenden tabellarisch aufgeführt. Eine Auflistung der bereits vorhandenen und teilweise als Matrizen-DNA eingesetzten Konstrukte befindet sich im Materialteil dieser Arbeit (siehe 5.1.4).

Alle unten aufgelisteten Konstrukte wurden über die Schnittstellen der angegebenen Restriktionsenzyme in den eukaryotischen Expressionsvektor **pcDNA3.1/Zeo(+)** ligiert.



Quelle: www.invitrogen.com

Zielploid	Beschreibung	Matrizen-DNA (M) und PCR-Primer (P)	Restriktionsenzyme
PrPΔGPI	PrP Δ 231-254	M: PrP P: HindIII_PrP_fw, PrP Δ GPI_Xho1_rev	HindIII, XhoI
Sho•PrP	Sho(AS 1-30) + PrP(AS 23-254)	<u>PCR1:</u> M: Sho P: HindIII_huSho_fw, Sho30-SS_PrP_rev <u>PCR2:</u> M: PrP P: Sho30-SS_PrP_fw, PrPGPI_Xho1_rev <u>Fusions-PCR:</u> M: 1+2 P: HindIII_huSho_fw, PrPGPI_Xho1_rev	HindIII, XhoI
Som•PrP	Som(AS 1-24) + PrP(AS 23-254)	<u>PCR1:</u> M: Som P: HindIII_Som_fw, Som-SS_PrP_rev <u>PCR2:</u> M: PrP P: Som-SS_PrP_fw, PrPGPI_Xho1_rev <u>Fusions-PCR:</u> M: 1+2 P: HindIII_Som_fw, PrPGPI_Xho1_rev	HindIII, XhoI
APP•PrP	APP(AS 1-24) + PrP(AS 23-254)	<u>PCR1:</u> M: APP•115 α 2 α 3 P: HindIII_APP_fw, APP-SS_PrP_rev <u>PCR2:</u> M: PrP P: APP-SS_PrP_fw, PrPGPI_Xho1_rev <u>Fusions-PCR:</u> M: 1+2 P: HindIII_APP_fw, PrPGPI_Xho1_rev	HindIII, XhoI
Sho•115	Sho(AS 1-30) + PrP(AS 23-114) artifizielles NFT-Motiv: W31→N, N32→F	<u>PCR1:</u> M: Sho P: HindIII_huSho_fw, Sho30-SS_PrP_rev <u>PCR2:</u> M: PrP•115 P: Sho30-SS_PrP_fw, 115_Xho1_rev <u>Fusions-PCR:</u> M: 1+2 P: HindIII_huSho_fw, 115_Xho1_rev	HindIII, XhoI
Som•115	Som(AS 1-24) + PrP(AS 23-114) artifizielles NFT-Motiv: W31→N, N32→F	<u>PCR1:</u> M: Som P: HindIII_Som_fw, Som-SS_PrP_rev <u>PCR2:</u> M: PrP•115 P: Som-SS_PrP_fw, 115_Xho1_rev <u>Fusions-PCR:</u> M: 1+2 P: HindIII_Som_fw, 115_Xho1_rev	HindIII, XhoI

Zielploid	Beschreibung	Matrizen-DNA (M) und PCR-Primer (P)	Restriktionsenzyme
APP•115	APP (AS 1-24) + PrP(AS 23-114) artifizielles NFT-Motiv: W31→N, N32→F	<u>PCR 1:</u> M: APP•115α2α3 P: HindIII_APP_fw, APP-SS_PrP_rev <u>PCR 2:</u> M: PrP•115 P: APP-SS_PrP_fw, 115_Xho1_rev <u>Fusions-PCR:</u> M: 1+2 P: HindIII_APP_fw, 115_Xho1_rev	HindIII, XhoI
APP•115α2α3GPI	APP(AS 1-24) + PrP(AS 1-114 + 171-221 + 231-254)	<u>PCR 1:</u> M: APP•115α2α3 P: HindIII_APP_fw, α2α3_GPI_rev <u>PCR 2:</u> M: PrP P: α2α3_GPI_fw, moPrP_NotI_rev <u>Fusions-PCR:</u> M: 1+2 P: HindIII_APP_fw, moPrP_NotI_rev	HindIII, NotI
APP•115α2α3AA	APP(AS 1-24) + PrP(AS 1-114+ 171-221) PrP (C178 → A178 C213 → A213)	<u>PCR 1:</u> M: APP•115α2α3 P: HindIII_APP_fw, APP-SS_PrP_rev <u>PCR 2:</u> M: 115α2α3C178AC213A P: APP-SS_PrP_rev, 115α2α3_Xho1_rev <u>Fusions-PCR:</u> M: 1+2 P: HindIII_APP_fw, 115α2α3_Xho1_rev	HindIII, XhoI
Sho•115α2α3	Sho(AS 1-30) + PrP(AS 1-114+ 171-221)	<u>PCR 1:</u> M: Sho P: HindIII_huSho_fw, Sho30-SS_PrP_rev <u>PCR 2:</u> M: PrP•115α2α3 P: Sho30-SS_PrP_fw, 115α2α3_Xho1_rev <u>Fusions-PCR:</u> M: 1+2 P: HindIII_huSho_fw, 115α2α3_Xho1_rev	HindIII, XhoI
Som•115α2α3	Som(AS 1-24) + PrP (AS 1-114+ 171-221)	<u>PCR 1:</u> M: Som P: HindIII_Som_fw, Som-SS_PrP_rev <u>PCR 2:</u> M: PrP•115α2α3 P: Som-SS_PrP_fw, 115α2α3_Xho1_rev <u>Fusions-PCR:</u> M: 1+2 P: HindIII_Som_fw, 115α2α3_Xho1_rev	HindIII, XhoI

Zielploid	Beschreibung	Matrizen-DNA (M) und PCR-Primer (P)	Restriktionsenzyme
UCR1•115α2α3	UCR1(AS 1-34) + PrP(AS 1-114 + 171-221)	<u>PCR 1:</u> M: UCR1-PrP P: HindIII_UCR1_fw, UCR-SS_rev <u>PCR 2:</u> M: PrP•115α2α3 P: UCR-SS_fw, 115α2α3_Xho1_rev <u>Fusions-PCR:</u> M: 1+2 P: HindIII_UCR1_fw, 115α2α3_Xho1_rev	HindIII, XhoI
PrP•Tau	PrP(AS 1-114) + Tau(AS 103-197) artifizielles NFT-Motiv: PrP(W31→N, N32→F)	<u>PCR 1:</u> M: PrP•115-Tau P: HindIII_PrP_fw, PrP-Tau_rev <u>PCR 2:</u> M: PrP•115-Tau P: PrP-Tau_fw, Tau220Xho1_rev <u>Fusions-PCR:</u> M: 1+2 P: HindIII_PrP_fw, Tau220Xho1_rev	HindIII, XhoI
Sho•Tau	Sho(AS 1-30) + Tau(AS 103-197) artifizielles NFT-Motiv: PrP(W31→N, N32→F)	<u>PCR 1:</u> M: Sho P: HindIII_huSho_fw, PrP-Tau_rev <u>PCR 2:</u> M: PrP•Tau P: PrP-Tau_fw, Tau220Xho1_rev <u>Fusions-PCR:</u> M: 1+2 P: HindIII_huSho_fw, Tau220Xho1_rev	HindIII, XhoI
Som•Tau	Som(AS 1-24) + Tau(AS 103-197) artifizielles NFT-Motiv: PrP(W31→N, N32→F)	<u>PCR 1:</u> M: Som P: HindIII_Som_fw, PrP-Tau_rev <u>PCR 2:</u> M: PrP•Tau P: PrP-Tau_fw, Tau220Xho1_rev <u>Fusions-PCR:</u> M: 1+2 P: HindIII_Som_fw, Tau220Xho1_rev	HindIII, XhoI
APP•Tau	APP(AS 1-24) + Tau(AS 103-197) artifizielles NFT-Motiv: PrP(W31→N, N32→F)	<u>PCR 1:</u> M: APP•115α2α3 P: HindIII_APP_fw, PrP-Tau_rev <u>PCR 2:</u> M: PrP•Tau P: PrP-Tau_fw, Tau220Xho1_rev <u>Fusions-PCR:</u> M: 1+2 P: HindIII_Som_fw, Tau220Xho1_rev	HindIII, XhoI

6.2 Zellkultur

6.2.1 Zellkultivierung

Murine Neuroblastomzellen (N2a Zellen) wurden in *Minimal Essential Medium* (MEM-Medium) unter Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum, 1 % Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration: 100 Einheiten/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin) und 2 mM L-Glutamin kultiviert.

Als Basismedium für humane Neuroblastomzellen (SH-SY5Y Zellen) diente *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM-Medium), versetzt mit 8 % fötalem Kälberserum, 1 % Penicillin/Streptomycin und 2 mM L-Glutamin.

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in 25 cm²-Zellkulturflaschen (N2a Zellen) oder 75 cm²-Zellkulturflaschen (SH-SY5Y Zellen) bei 37 °C und 5 % CO₂.

6.2.2 Zellpassagierung

Die N2a Zellen wurden zweimal wöchentlich (Montag/Freitag) im Verhältnis 1:4 und 1:6 passagiert. SH-SY5Y Zellen wurden parallel im Verhältnis 1:20 und 1:30 gesplittet.

Zur Passagierung wurden die adhärenenten Zellen, nach Entnahme des Kulturmediums, zweimal mit steriler phosphatgepufferter Salzlösung (PBS; *phosphate buffered saline*) gewaschen und anschließend mit 0,5 µl Trypsin-Lösung (500 mg/L) vom Flaschenboden gelöst. Nach Aufnahme der Zellen in Vollmedium wurden diese in den oben angegebenen Verhältnissen in neue Kulturflaschen überführt. Hierfür wurden je 25 cm²-Flasche 7 ml und je 75 cm²-Flasche 15 ml frisches Medium vorgelegt.

6.2.3 Ausplattieren von Zellen

Ausplattieren von Zellen für eine Western-Blot-Analyse

Zur Proteinanalyse mittels SDS-PAGE und Western Blot wurden Zellen, wie unter Punkt 8.2.2 erläutert, gewaschen und trypsinisiert. Die Anzahl der Zellen in der erhaltenen Zellsuspension wurde mittels einer Neubauer Zählkammer bestimmt 5,5 x 10⁵ (N2a) beziehungsweise 5,0 x 10⁵ (SH-SY5Y) Zellen je 3,5 cm-Schale

ausplattiert. Die Zellsuspension wurde hierfür so verdünnt, dass die Zellzahl je Schale einem Volumen von 2 ml entsprach.

Ausplattieren von Zellen für eine Immunfluoreszenz-Analyse

Für Immunfluoreszenz-Analysen wurden 6-Well-Platten mit je einem sterilen 22 mm-Deckgläschen (*Cover slip*) je Well vorbereitet und $4,0 \times 10^5$ SH-SY5Y Zellen je Well ausplattiert. Das Zellsuspensionsvolumen je Well betrug 2 ml.

6.2.4 Transfektion von Zellen

Reverse Transfektion mit siRNA in SH-SY5Y Zellen

Zur transienten Gen-Stilllegung (*Gen-Knockdown*) mittels RNA-Interferenz in SHSY-5Y Zellen wurden die Zellen zeitgleich ausplattiert und mit siRNA (*small interfering RNA*) transfiziert (Reverse Transfektion). Dazu wurde pro 3,5 cm-Zellkulturschale ein Transfektionsansatz, bestehend aus 500 μ l Opti-MEM, 30 nM siRNA und 5 μ l RNAiMAX vorbereitet und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurden SH-SY5Y Zellen trypsinisiert, in DMEM-Vollmedium ohne Antibiotikum aufgenommen und zusammen mit den 500 μ l Transfektions-Ansatz in einer Konzentration von 4×10^5 Zellen/Schale (in 1,5 ml Medium) ausplattiert. 24 h nach der Reversen Transfektion wurde ein Mediumwechsel mit DMEM-Vollmedium (mit Antibiotikum) durchgeführt.

Reverse Transfektion mit siRNA in HeLa Zellen

Zum transienten *Gen-Knockdown* mittels RNA-Interferenz in HeLa Zellen wurden die Zellen, wie unter Punkt 8.2.2 beschrieben, trypsinisiert und auf eine Zelldichte von 780.000 Zellen pro 3,9 ml DMEM-Medium eingestellt. Desweiteren wurde je Probe ein Ansatz aus 82 μ l Opti-MEM, 20 nM siRNA und 20 μ l HiPerFect 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend gemeinsam mit 3,9 ml der eingestellten Zellsuspension in eine 6 cm-Zellkulturschale ausplattiert (Reverse Transfektion). 24 h später wurde die Transfektion wiederholt, indem das Medium abgenommen und durch 3,9 ml Medium und einem, den obigen Angaben entsprechenden Transfektionsansatz ersetzt (Standard Transfektion).

Transfektion mit Plasmid-DNA

Für eine transiente liposomale Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA wurden diese, wie in Punkt 8.2.3 erläutert, ausplattiert. Wenn nicht anders angegeben, erfolgte 20 bis 24 h später eine Transfektion mit dem lipidbasierten

Transfektionsreagenz Lipofectamin. Hierzu wurden pro 3,5 cm-Schale die folgenden beiden Transfektions-Ansätze gemischt:

Transfektions-Ansatz 1		Transfektions-Ansatz 2	
100 µl	Opti-MEM	100 µl	Opti-MEM
1 µg	Plasmid-DNA	8 µl	Lipofectamin
6 µl	Plus-Reagenz		

Beide Ansätze wurden nach 15-minütiger Inkubation gemischt, erneut 15 min inkubiert und anschließend mit 800 µl Opti-MEM verdünnt.

Zwischenzeitlich wurden die Zellen zweimal mit Medium ohne Zusätze gewaschen und im Anschluss daran 2 h mit dem Transfektions-Gemisch inkubiert. Zur Minderung toxischer Effekte durch die Transfektion wurde das Transfektions-Gemisch nach 2 h abgenommen und durch Vollmedium ersetzt.

6.2.5 Zellernte

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Zellen 24 h nach der Plasmid-Transfektion geerntet. Dazu wurden die Zellen jeder 3,5 cm-Kulturschale zweimal mit unsterilem PBS gewaschen, mit einem Zellheber vorsichtig abgeschabt und in je ein 1,5 ml *Safe-Lock*-Gefäß (*Eppi*) überführt. Nach Abzentrifugieren der Zellen bei 1000 g für 30 sec wurde das überstehende PBS abgenommen und die Zellpellets entweder unmittelbar weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert.

6.3 Proteinanalytik

6.3.1 Western Blot Analyse

6.3.1.1 Herstellung von Gesamtzell-Lysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden die geernteten Zellen (siehe 6.2.5) wie folgt behandelt:

Je nach Größe des Zellpellets wurden die Zellen in 150 - 180 µl Lysepuffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 5 µl Zelllysate zur Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe unten) entnommen, dem restlichen

Lysat Laemmli-Probenpuffer (4x) zugesetzt und die Probe 5 min bei 95 °C denaturiert. Um die genomische DNA zu scheren und somit die Viskosität der Probe für eine erleichterte Weiterverarbeitung zu verringern, wurde das noch heiße Zelllysate mehrmals mit einer 1 ml-Einmalspritze durch eine 21G-Sterican-Kanüle gezogen.

Die so erhaltenen Proben wurden bis zur weiteren Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot bei -20 °C gelagert.

6.3.1.2 Proteinbestimmung nach *Bradford*

Um zu gewährleisten, dass die mittels Western Blot analysierten Proben quantitativ vergleichbar sind, wurde die Proteinkonzentration der Lysate mit dem Bio-Rad Protein Assay gemäß den Herstellerangaben bestimmt. Unterschiede in den Proteinkonzentrationen wurden durch Anpassung der auf die SDS-PAGE-Gele (siehe 8.3.1.3) geladenen Lysatmengen ausgeglichen.

6.3.1.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine eines Zelllysats erfolgte durch eindimensionale, diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*; SDS-PAGE). Hierbei werden Proteine im denaturierten Zustand im elektrischen Feld nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt.

Die Auftrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht über 15 kDa erfolgte in einem Tris-Glycin-Puffersystem nach *Ulrich Laemmli* unter Verwendung eines Hoefler-Gerätesystems (Laemmli, 1970). Kleinere Proteine wurden nach *Schägger und von Jagow* in einem TRIS-Tricin-Puffersystem aufgetrennt (Schagger & von Jagow, 1987). Als Gerätesystem für *Schägger*-Gele wurde das SDS-PAGE-Set von Bio-Rad verwendet.

Die Zusammensetzung der Gele sowie die Elektrophorese-Bedingungen sind auf der nächsten Seite tabellarisch dargestellt:

SDS-PAGE nach Laemmli (Hoefler-System)

Mengen für ein 1,5 mm dickes Hoefler-Gel

	4 % Sammelgel	14 % Trenngel
Wasser	6,4 ml	5,8 ml
Sammelpuffer bzw. Trenngelpuffer	2,5 ml	3,75 ml
Acrylamid/Bisacrylamid	1 ml	5,35 ml
10% ige APS-Lösung	100 µl	150 µl
TEMED	10 µl	15 µl
Elektrophorese	150 V	230 V

SDS-PAGE nach Schägger und Jagow (Bio-Rad System)

Mengen für zwei 1,5 mm dicke Schägger-Gele

	4 % Sammelgel	10 % Trenngel	16,5 % Trenngel
Wasser	4,2 ml	3,5 ml	-
Gelpuffer	1,5 ml	2,5 ml	3,5 ml
Acrylamid/Bisacrylamid	500 µl	1,5 ml	3,5 ml
32 % ige Glycerol-Lösung	-	-	3,5 ml
10% ige APS-Lösung	25 µl	35 µl	32,5 µl
TEMED	5 µl	4 µl	3,25 µl
Elektrophorese	80 V	120 V	120 V

6.3.1.4 Proteintransfer (Western-Blot)

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diese durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Eine derartige Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran wird als *Western Blot* bezeichnet und ist namensgebend für die gesamte Methode.

Zum Transfer der Proteine auf die Membran wurde das SDS-PAGE-Gel in eine Blotting-Apparatur eingesetzt. Art der Apparatur und die Zusammensetzung des Transferpuffers richteten sich dabei nach dem eingesetzten Gerätesystem. Im

Hoefer-System erfolgte der Proteintransfer bei einer konstanten Stromstärke von 1000 mA für 90 min. Bei Verwendung des Bio-Rad Systems für 60 min bei 400 mA.

6.3.1.5 Ponceau-Färbung

Nach dem Blotten wurde die Nitrocellulosemembran für 3 min mit dem roten Azofarbstoff Ponceau S gefärbt und anschließend mit Wasser gewaschen. Durch diese reversible Anfärbung der Proteine ist es möglich Qualität und Effizienz des Proteintransfers zu kontrollieren.

6.3.1.6 Immundetektion

Der Nachweis einzelner Proteine auf der Nitrocellulosemembran erfolgte durch Immundetektion. Hierzu wurde die Membran zunächst 1 h bei Raumtemperatur in PBS-T mit 5 % Magermilchpulver geschwenkt und so unspezifische Proteinbindungsstellen blockiert. Anschließend wurde dreimal für je 10 min mit PBS-T gewaschen und die Membran für 16 h bei 4 °C, in einer Verdünnung eines Erstantikörpers gegen das zu analysierende Protein geschwenkt. Am folgenden Tag wurde die Membran erneut dreimal für je 10 min mit PBS-T gewaschen und anschließend 1 h bei Raumtemperatur mit einem Meerrettichperoxidase (*Horseradish Peroxidase*; HRP)-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert.

6.3.1.7 Visualisierung und Quantifizierung

Zur Detektion der Proteine mittels Chemilumineszenz wurde die abgetrocknete Nitrocellulosemembran entweder 1 min mit dem ECL Reagenz von Amersham oder, bei schwachen Signalen, 5 min mit dem Chemilumineszenz-Reagenz Immobilon inkubiert. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte durch das Auflegen von Röntgenfilmen in unterschiedlich langen Expositionszeiten.

Zur quantitativen Bestimmung der Proteinsignale wurde die Membran mit dem Chemilumineszenzmesser Fujifilm LAS-4000 vermessen und die Signale unter Verwendung der Multi Gauge Software von Fujifilm ausgewertet.

6.3.2 Spezielle Proteinanalytik

6.3.2.1 Nachweis der Sekretion von Proteinen

Zum Nachweis der Sekretion von Proteinen wurden Zellen wie in den Abschnitten 6.2.3 und 6.2.4 beschrieben in 3,5 cm-Schalen ausplattiert und transfiziert. 3 h vor dem Ernten wurden die Zellen zweimal mit Medium ohne Zusätze gewaschen und anschließend 3 h in 1 ml Medium ohne Zusätze bei 37 °C kultiviert. Das Medium jeder Schale wurde anschließend einzeln abgenommen, Zellverunreinigungen 15 sec bei 13.000 rpm abzentrifugiert und 900 µl Medium in ein frisches *Safe-Lock*-Gefäß überführt. Die Fällung der Proteine aus dem Medium erfolgte durch Zugabe von 100 µl 50 %iger Trichloressigsäure (TCA-Fällung). Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis und 20-minütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C wurde das erhaltene Pellet zweimal mit Aceton gewaschen. Die gewaschenen Pellets wurden anschließend bei Raumtemperatur getrocknet, in 50 µl Laemmli-Probenpuffer (2x) aufgenommen, 5 min bei 95 °C erhitzt und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

6.3.2.2 Nachweis des proteasomalen Abbaus von Proteinen

Um nachzuweisen, dass ein untersuchtes Protein einem proteasomalen Abbau unterliegt, wurde das Proteasom durch Behandlung der Zellen mit MG132 reversibel inhibiert. Hierfür wurden Zellen zunächst wie oben beschrieben in 3,5 cm-Schalen ausplattiert und transfiziert (siehe 6.2.3 und 6.2.4). 20 - 24 h nach der Transfektion wurden dann 2 ml Vollmedium je Schale mit 30 µM MG132 (gelöst in DMSO) oder dem gleichen Volumen DMSO (Kontrolle) versetzt und die Zellen 3 h vor dem Ernten damit inkubiert. Ein aufgrund des gehemmten Abbaus auftretendes verstärktes Proteinsignal wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot ermittelt.

6.3.2.3 Nachweis der Glykosylierung von Proteinen

Der Nachweis der Glykosylierung von Proteinen erfolgte entweder durch Inhibition der Glykosylierung während der Zellkultivierung oder durch nachträgliche Deglykosylierung der Proteine im Zelllysat.

Inhibition der Proteinglykosylierung

Zur Inhibition der Proteinglykosylierung wurden die Zellen zunächst wie oben erläutert ausplattiert und transfiziert (siehe 6.2.3 und 6.2.4) und anschließend für 16 h mit 0,5 µg/ml Tunicamycin (in Vollmedium) behandelt. Die Zellernte sowie die Analyse der Proben mittels Western Blot erfolgte wie unter 8.3.1 beschrieben.

Deglykosylierung von Proteinen

Zur enzymatischen Deglykosylierung der Proteine wurden Gesamtzell-Lysate hergestellt (siehe 8.3.1.1) und diese nach Angaben des Herstellers mit 2 Einheiten N-Glykosidase F (PNGase F) für 2 h bei 37 °C verdaut. Kontrollproben wurden gleich behandelt und ohne Zusatz von PNGase F inkubiert. Nach der Deglykosylierung wurde allen Proben 4x-Laemmli-Probenpuffer zugesetzt und diese mittels Western Blot analysiert (siehe 6.3.1.3 ff.)

6.3.3 Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Zur Proteinanalyse mittels indirekter Immunfluoreszenz wurden Zellen auf Deckgläschen (*Cover slips*) ausplattiert und 24 h später mit Plasmid-DNA transfiziert (siehe 8.2.3 und 8.2.4). 20 h – 24 h nach der Transfektion wurden die Deckgläschen zweimal in PBS mit Calcium und Magnesium (PBS +/+) gewaschen und mit 3,7 %iger Paraformaldehyd-Lösung für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach dreimaligem Waschen der Deckgläschen mit PBS ohne Calcium und Magnesium (PBS -/-), wurden die Zellen 10 min mit 0,2 % Triton X-100 (in PBS-/-) permeabilisiert und erneut dreimal mit PBS-/- gewaschen. (Zur ausschließlichen Detektion von Proteinen an der Plasmamembran wurden nicht-permeabilisierte Zellen analysiert und in diesen Fällen die Behandlung mit Triton X-100 weggelassen). Nach dem Waschen wurden die Deckgläschen in eine feuchte Kammer umgesetzt und unspezifische Bindungsstellen durch einstündige Inkubation mit Blockierungspuffer (5 % *Pferdeserum* in PBS -/- mit 0,1 % *Tween-20*) bei Raumtemperatur gesättigt. Sofern nicht anderweitig erläutert, wurden die Deckgläschen im Anschluß 1 h bei 37 °C mit Erstantikörper inkubiert, dann dreimal mit PBS -/- gewaschen und anschließend 1 h mit einem Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Zweitantikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS (-/-) wurde jedes Deckgläschen kurz durch Wasser gezogen, überschüssiges Wasser mit einem Papiertuch abgezogen und die Zellen mit 40 µl Mowiol (+ 1 µg/ml DAPI) auf einem Objektträger eingebettet. Die

Auswertung an einem Fluoreszenzmikroskop erfolgte nach 24-stündiger Aushärtung des Einbettungsmediums bei Raumtemperatur.

Auswertung

Die Aufnahme von Bildern zum Nachweis der zellulären Lokalisierung eines Proteins wurde an dem Konfokalmikroskop Axiovert 200M von Zeiss und unter der Verwendung der Software *LSM Image Browser* durchgeführt.

Zur Quantifizierung von zellulärer Lokalisierung, mitochondrialer Toxizität oder induzierter Apoptose wurden Zellen an dem Fluoreszenzmikroskop Axioscope 2 plus (Zeiss) ausgezählt (siehe 6.4.3, 6.4.4 und 6.5).

6.4 Spezielle Methoden

6.4.1 Färbung der Mitochondrien mit MitoTracker Red CMXRos

Der MitoTracker Red CMXRos ist ein rot fluoreszierender Farbstoff, welcher abhängig vom mitochondrialen Membranpotential in die Mitochondrien lebender Zellen aufgenommen wird. In dieser Arbeit wurde der MitoTracker Red CMXRos zur Visualisierung von Mitochondrien, zur Beurteilung der mitochondrialen Morphologie sowie zur Identifizierung und Quantifizierung toxischer Effekte, die zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials führen, eingesetzt.

Zum Anfärben von Mitochondrien wurde der in DMSO gelöste Farbstoff 1:15.000 in Vollmedium verdünnt und die Zellen vor dem Waschen mit PBS +/- (vergleiche 6.3.3) für 30 min bei 37 °C damit inkubiert. Die Fixierung und die weitere Behandlung der Zellen erfolgte wie unter 6.3.3 beschrieben.

6.4.2 Ermittlung der zellulären Lokalisation eines Proteins mittels Immunfluoreszenz (*Co-staining*)

Zur Identifizierung der zellulären Lokalisation eines Proteins wurde dieses mittels indirekter Immunfluoreszenz (6.3.3) visualisiert und die Lokalisierung durch Überlappung mit einer Zweitfärbung eines entsprechenden Organell-Markers ermittelt.

Der Nachweis einer mitochondrialen Lokalisierung erfolgte durch indirekte Immunfluoreszenz des zu analysierenden Proteins und Kofärbung der

Mitochondrien mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker Red CMXRos (6.4.1) und/oder einem Erstantikörper gegen das mitochondriale Protein Tom 20.

Um nachzuweisen, dass ein Protein in den sekretorischen Biosyntheseweg (*secretory pathway*) gelangt, wurde dessen Lokalisierung im Golgi-Apparat nachgewiesen. Hierzu wurde das zu analysierende Protein detektiert und dessen Fluoreszenzsignal mit einer Färbung des Golgi-Markerproteins Giantin verglichen.

6.4.3 Quantifizierung von Immunfluoreszenz-Analysen

Quantifizierung der mitochondrialen Lokalisation eines Proteins

Die in dieser Arbeit untersuchten Konstrukte weisen eine unterschiedlich starke Zielsteuerung (*Targeting*) zu den Mitochondrien auf. Um das Targeting verschiedener Konstrukte zu vergleichen, wurde das Ausmaß des mitochondrialen Targetings durch Auszählen von Immunfluoreszenz-Proben (6.3.3) bestimmt. Hierzu wurde eine Immunfluoreszenz wie oben beschrieben durchgeführt und das Konstrukt zusammen mit dem Mitochondrien-Marker MitoTracker Red CMXRos detektiert (6.3.3 und 6.4.1). Die auf Objektträgern eingebetteten Zellen wurden anschließend unter Verwendung eines Axioscope 2 plus Fluoreszenzmikroskops ausgewertet. Dazu wurden aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mindestens 600 transfizierte Zellen pro Konstrukt gezählt und der Prozentsatz an transfizierten Zellen mit einer Kolo-kalisation von Konstrukt und Mitochondrien bestimmt.

Quantifizierung der mitochondrialen Toxizität eines Proteins

Ob und in welchem Ausmaß die Expression eines Proteins zur Schädigung des mitochondrialen Membranpotentials führt, wurde wie folgt analysiert. Das zu untersuchende Konstrukt wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz zusammen mit dem mitochondrialen Markerprotein Tom 20 detektiert (6.3.3). Daneben wurden die Mitochondrien mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker Red CMXRos angefärbt (6.4.1). Da dieser Farbstoff Mitochondrien mit einem geschädigten Membranpotential nicht anfärbt, können toxische Effekte, die zum Zusammenbruch des mitochondrialen Potentials führen, detektiert werden. Durch eine zweite Färbung der Mitochondrien mit Tom 20 wurde die Präsenz der Mitochondrien in Zellen mit fehlender Mitotracker-Färbung nachgewiesen. Die quantitative Auswertung erfolgte an einem Axioscope 2 plus Fluoreszenzmikroskop. Hierzu wurde der Prozentsatz an transfizierten Zellen ohne Membranpotential auf der Basis

von mindestens drei unabhängigen Versuchen und mindestens 600 transfizierten Zellen pro Konstrukt ermittelt.

6.4.4 Apoptose-Assay

Für die Quantifizierung der Apoptoserate wurden SH-SY5Y Zellen auf Deckgläschen ausplattiert und 24 h später mit 0,5 µg des zu analysierenden Konstrukts sowie 0,5 µg des Transfektionsmarkers EYFP transfiziert (6.2.3 und 6.2.4). Da die untersuchte toxische PrP Mutante Q159X vor allem unter proteasomaler Inhibition Apoptose induziert (Rambold et al, 2006), wurden die Zellen vor dem Fixieren für 3 h in Vollmedium mit 30 µM MG132 kultiviert. Im Anschluss daran wurde eine indirekte Immunfluoreszenz-Analyse durchgeführt. Hierzu wurden die Deckgläschen wie unter Punkt 6.3.3 erläutert gewaschen, fixiert, permeabilisiert und geblockt. Zur Visualisierung apoptotischer Zellen wurden die Deckgläschen 16 h bei 4 °C mit *Anti-ACTIVE Caspase 3*-Antikörper inkubiert und anschließend intensiv gewaschen (2x PBS *-/-*, 1x 0,1 % Tween 20 in PBS *-/-*, 2x PBS *-/-*). Die Inkubation mit dem Zweitantikörper AlexaFluor 555 sowie das Einbetten der Zellen erfolgte wie unter Punkt 6.3.3 beschrieben.

Zur Bestimmung der Apoptoserate wurden die so erhaltenen Proben unter Verwendung eines Axioscope 2 plus Fluoreszenzmikroskops ausgewertet. Hierfür wurde der Anteil an transfizierten Zellen mit einer aktivierten Caspase-3 ermittelt. Zur statistischen Auswertung wurden mindestens 4000 transfizierte Zellen aus mindestens 4 unabhängigen Experimenten blind gezählt.

6.4.5 Nachweis des mitochondrialen Imports von Proteinen

Der Nachweis, dass ein (in der Immunfluoreszenz) mitochondrial lokalisiertes Protein tatsächlich in die Mitochondrien importiert wird und nicht nur extern mit diesen assoziiert ist, erfolgte wie folgt (Abb. 51): SH-SY5Y Zellen wurden in einer Dichte von 30×10^5 Zellen/Schale in 10 cm-Schalen ausplattiert. 24 h später wurden die Zellen mit dem zu analysierenden Konstrukt transfiziert. Die Durchführung der Transfektion erfolgte wie unter Punkt 6.2.4 beschrieben, jedoch mit einem 6-fachen Transfektions-Ansatz je 10 cm-Schale. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit einem Zellheber vom Boden der Schalen gelöst und in einem 50 ml Zentrifugengefäß für 10 min bei 700 g und 4 °C abzentrifugiert. Die Zellpellets wurden in eiskaltem Mitopuffer resuspendiert und die

Zellen durch 20-faches Ziehen durch eine 27G-Einmalkanüle aufgeschlossen. Die anschließende Aufreinigung der Mitochondrien erfolgte durch differenzielle Zentrifugation. Der genaue Ablauf ist in der nachfolgenden Abb. dargestellt. Im letzten Waschschritt der Isolierung wurden die Mitochondrien in drei gleiche Aliquots aufgeteilt, abzentrifugiert und die Mitochondrien in Mitopuffer ohne Zusätze (-), Mitopuffer mit 50 µg/ml Proteinase K (PK) oder Mitopuffer mit PK und 1 % Triton X-100 resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurde jeder Probe 2 mM PMSF zugesetzt und weitere 5 min auf Eis inkubiert. Der parallel während der differentiellen Zentrifugation gewonnene post-mitochondriale Überstand diente als Kontrolle. Alle Proben wurden abschließend mit 4x-Laemmli-Probenpuffer verdünnt, 5 min bei 95 °C erhitzt und mittels Western Blot analysiert (6.3.1).

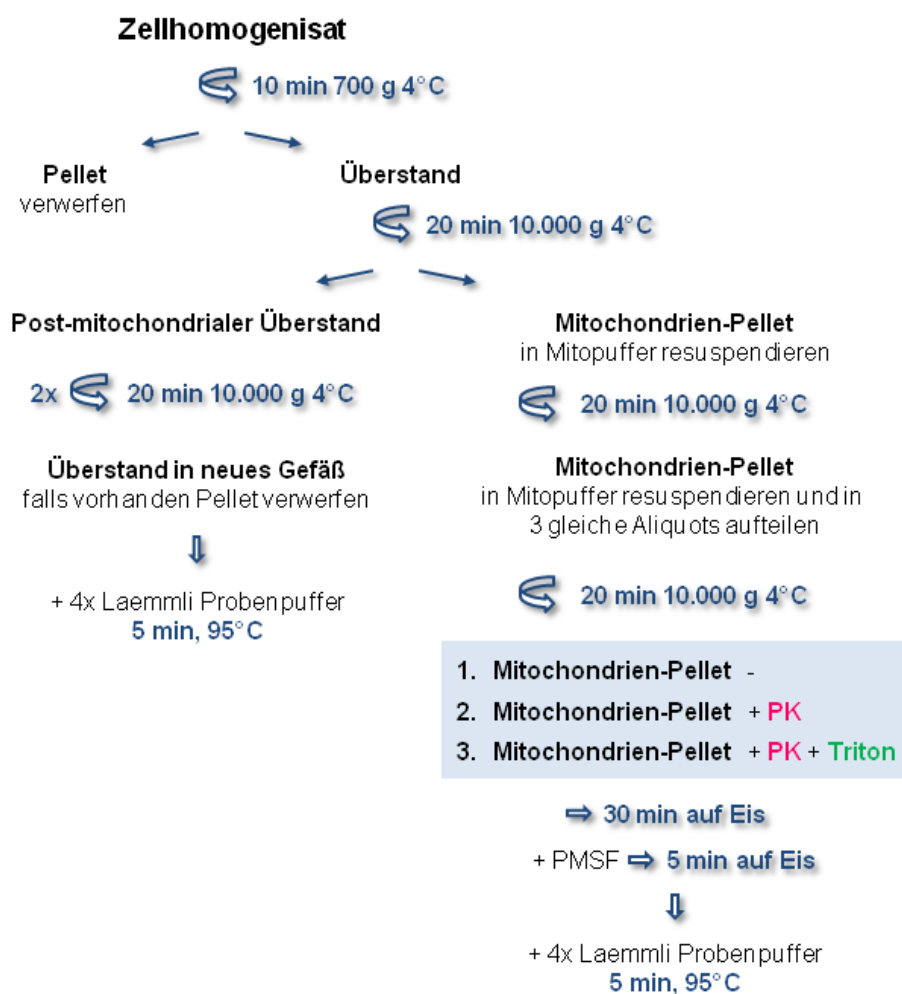


Abb. 51: Zellfraktionierung zur Isolierung von Mitochondrien aus transfizierten SH-SY5Y Zellen. Gezeigt ist eine differenzielle Fraktionierung mit anschließender Proteinase K-Behandlung der isolierten Mitochondrien.

6.4.6 SEC61A1-Knockdown mittels RNA-Interferenz

Zur transienten Hemmung der Genexpression (*Gen-Knockdown*) von SEC61A1 mittels RNA-Interferenz wurden SH-SY5Y beziehungsweise HeLa Zellen, wie unter Punkt 6.2.4 genau beschrieben, mit Sec61a1-siRNA oder Kontroll-siRNA (5.1.5) transfiziert.

Für den *Knockdown* in SHSY-5Y Zellen erfolgte die Transfektion von Plasmid-DNA 48 h nach der siRNA-Transfektion. Als Transfektions-Reagenz wurde Lipofektamin verwendet (6.2.4; Transfektion mit Plasmid-DNA). Weitere 24 h später wurden die Zellen mittels Immunfluoreszenz- oder Western Blot-Analyse ausgewertet (6.3.3 und 6.3.1).

Für den *Knockdown* in HeLa Zellen wurden die Zellen 12 h nach der zweiten siRNA-Transfektion mit Plasmid-DNA transfiziert. Die DNA-Transfektion wurde mit dem Transfektions-Reagenz FuGene, gemäß dem Protokoll des Herstellers Promega durchgeführt. Die weitere Analyse mittels indirekter Immunfluoreszenz und Western Blot erfolgte 96 h nach Ausplattieren der Zellen.

6.4.7 Radioaktive Markierung von Proteinen mit [35S]-Methionin

N2a Zellen wurden wie oben erläutert ausplattiert und transfiziert (siehe 6.2.3 und 6.2.4). 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Medium ohne Zusätze gewaschen und 15 min in Methionin-freiem MEM-Medium inkubiert. Während dieser Zeit wird das vorhandene zelluläre Methionin verbraucht. Um die Proteine anschließend radioaktiv zu markieren wurde das Medium abgenommen und durch 500 µl Methionin-freiem MEM-Medium mit 300 µCi/ml [35S]-Methionin ersetzt. Nach 15 min wurden die Zellen entweder geerntet (*pulse*-Proben) oder für 1 h mit unmarkiertem Vollmedium bei 37 °C inkubiert (*chase*-Proben). Die geernteten Zellen wurden in Lysepuffer resuspendiert und nach 5-minütiger Inkubation auf Eis für 20 min bei 15.000 g zentrifugiert. Aus der detergenzlöslichen Fraktion (Überstand) wurden die transfizierten Konstrukte mittels Immunpräzipitation (IP) unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers V5 nach Angaben des Herstellers (Invitrogen) aufgereinigt. Zur Bestimmung der Sekretion wurden die transfizierten Konstrukte nach dem gleichen IP-Protokoll aus dem *Pulse*-Medium immunpräzipitiert. Die weitere Analyse der radioaktiv markierten Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE nach Hoefer. Nach der Elektrophorese wurden die SDS-PAGE-Gele 30 min in Fixierlösung (40 % Methanol, 7 % Essigsäure) geschwenkt und

anschließend 30 min mit Amplify inkubiert. Zur Trocknung der Gele wurden diese auf ein Whatman-Papier gelegt und bei 70 °C für 80 min unter Vakuum erhitzt. Die Visualisierung der radioaktiv markierten Proteine erfolgte durch Exposition eines Röntgenfilms.

6.4.8 Benutzung von Vorhersageprogrammen/Bioinformatische Analysen (Computergestützte Vorhersagen)

Zur bioinformatischen Vorhersage der zellulären Lokalisation von Proteinen wurde der Target P 1.1 Server verwendet (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>).

Hierfür wurden die zu analysierenden Proteinsequenzen im FASTA Format in das Analysefeld des Servers eingefügt und die Analyse mit den Einstellungen *non-plant* und *no cutoffs* durchgeführt.

6.5 Statistische Auswertung

Alle in dieser Arbeit gezeigten Quantifizierungen basieren auf mindestens drei unabhängigen Experimenten. Gezeigt werden die Mittelwerte mit der jeweils zugehörigen Standardabweichung. Die Signifikanz der Analysen wurde mit dem Verfahren des Studentischen t-Tests ermittelt.

Die hierbei verwendeten P-Werte waren: ** $p < 0,005$ *** $p < 0,0005$

7 Bibliographie

- Addya S, Anandatheerthavarada HK, Biswas G, Bhagwat SV, Mullick J, Avadhani NG (1997) Targeting of NH₂-terminal-processed microsomal protein to mitochondria: a novel pathway for the biogenesis of hepatic mitochondrial P450MT2. *The Journal of cell biology* 139: 589-599
- Ahmed AU, Beech PL, Lay ST, Gilson PR, Fisher PR (2006) Import-associated translational inhibition: novel in vivo evidence for cotranslational protein import into *Dictyostelium discoideum* mitochondria. *Eukaryot Cell* 5: 1314-1327
- Ahmed AU, Fisher PR (2009) Import of nuclear-encoded mitochondrial proteins: a cotranslational perspective. *Int Rev Cell Mol Biol* 273: 49-68
- Alberts B JA, Lewis J, Raff M, Roberts K, and Walter P (2002) *Molecular Biology of the Cell* New York: Garland Science
- Alken M, Hegde R *The Translocation Apparatus of the Endoplasmic Reticulum* http://cbmp.nichd.nih.gov/upb/pdfs/Alken_Chapter.pdf.
- Amthauer R, Kodukula K, Gerber L, Udenfriend S (1993) Evidence that the putative COOH-terminal signal transamidase involved in glycosylphosphatidylinositol protein synthesis is present in the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 3973-3977
- Anandatheerthavarada HK, Biswas G, Mullick J, Sepuri NB, Otvos L, Pain D, Avadhani NG (1999) Dual targeting of cytochrome P4502B1 to endoplasmic reticulum and mitochondria involves a novel signal activation by cyclic AMP-dependent phosphorylation at ser128. *The EMBO journal* 18: 5494-5504
- Anandatheerthavarada HK, Biswas G, Robin MA, Avadhani NG (2003) Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells. *The Journal of cell biology* 161: 41-54
- Anfinsen CB (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181: 223-230
- Arnoys EJ, Wang JL (2007) Dual localization: proteins in extracellular and intracellular compartments. *Acta Histochem* 109: 89-110
- Avadhani NG, Sangar MC, Bansal S, Bajpai P (2011) Bimodal targeting of cytochrome P450s to endoplasmic reticulum and mitochondria: the concept of chimeric signals. *The FEBS journal* 278: 4218-4229
- Babu MM, van der Lee R, de Groot NS, Gsponer J (2011) Intrinsically disordered proteins: regulation and disease. *Current opinion in structural biology* 21: 432-440

- Barnett P (2003) Somatostatin and somatostatin receptor physiology. *Endocrine* 20: 255-264
- Barnham KJ, McKinstry WJ, Multhaup G, Galatis D, Morton CJ, Curtain CC, Williamson NA, White AR, Hinds MG, Norton RS, Beyreuther K, Masters CL, Parker MW, Cappai R (2003) Structure of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein copper binding domain. A regulator of neuronal copper homeostasis. *The Journal of biological chemistry* 278: 17401-17407
- Ben-Menachem R, Tal M, Shadur T, Pines O (2011) A third of the yeast mitochondrial proteome is dual localized: a question of evolution. *Proteomics* 11: 4468-4476
- Bernstein HD (1998) Membrane protein biogenesis: the exception explains the rules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 14587-14589
- Bhushan S, Gartmann M, Halic M, Armache JP, Jarasch A, Mielke T, Berninghausen O, Wilson DN, Beckmann R (2010) alpha-Helical nascent polypeptide chains visualized within distinct regions of the ribosomal exit tunnel. *Nature structural & molecular biology* 17: 313-317
- Blobel G, Dobberstein B (1975) Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *The Journal of cell biology* 67: 835-851
- Borgese N, Fasana E (2011) Targeting pathways of C-tail-anchored proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1808: 937-946
- Braak H, Braak E, Bohl J, Reintjes R (1996) Age, neurofibrillary changes, A beta-amyloid and the onset of Alzheimer's disease. *Neuroscience letters* 210: 87-90
- Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R (1973) Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179: 77-79
- Bremer J, Baumann F, Tiberi C, Wessig C, Fischer H, Schwarz P, Steele AD, Toyka KV, Nave KA, Weis J, Aguzzi A (2010) Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance. *Nature neuroscience* 13: 310-318
- Brown DA, London E (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annual review of cell and developmental biology* 14: 111-136
- Bubber P, Haroutunian V, Fisch G, Blass JP, Gibson GE (2005) Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: mechanistic implications. *Annals of neurology* 57: 695-703

- Büeler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp H-P, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M, Weissmann C (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356: 577-582
- Burgos-Ramos E, Hervas-Aguilar A, Aguado-Llera D, Puebla-Jimenez L, Hernandez-Pinto AM, Barrios V, Arilla-Ferreiro E (2008) Somatostatin and Alzheimer's disease. *Mol Cell Endocrinol* 286: 104-111
- Butler EK, Voigt A, Lutz AK, Toegel JP, Gerhardt E, Karsten P, Falkenburger B, Reinartz A, Winklhofer KF, Schulz JB (2012) The mitochondrial chaperone protein TRAP1 mitigates alpha-Synuclein toxicity. *PLoS genetics* 8: e1002488
- Calam J (1998) Helicobacter pylori and somatostatin cells. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 10: 281-283
- Cannon KS, Or E, Clemons WM, Jr., Shibata Y, Rapoport TA (2005) Disulfide bridge formation between SecY and a translocating polypeptide localizes the translocation pore to the center of SecY. *The Journal of cell biology* 169: 219-225
- Caramelo JJ, Parodi AJ (2008) Getting in and out from calnexin/calreticulin cycles. *The Journal of biological chemistry* 283: 10221-10225
- Carrie C, Giraud E, Whelan J (2009) Protein transport in organelles: Dual targeting of proteins to mitochondria and chloroplasts. *FEBS J* 276: 1187-1195
- Casley CS, Canevari L, Land JM, Clark JB, Sharpe MA (2002) Beta-amyloid inhibits integrated mitochondrial respiration and key enzyme activities. *Journal of neurochemistry* 80: 91-100
- Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N (2009) Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 138: 628-644
- Chacinska A, Pfannschmidt S, Wiedemann N, Kozjak V, Sanjuan Szklarz LK, Schulze-Specking A, Truscott KN, Guiard B, Meisinger C, Pfanner N (2004) Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *The EMBO journal* 23: 3735-3746
- Chesebro B, Trifilo M, Race R, Meade-White K, Teng C, LaCasse R, Raymond L, Favara C, Baron G, Priola S, Caughey B, Masliah E, Oldstone M (2005) Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science* 308: 1435-1439
- Chouard T (2011) Structural biology: Breaking the protein rules. *Nature* 471: 151-153
- Collinge J, Whittington MA, Sidle KC, Smith CJ, Palmer MS, Clarke AR, Jefferys JGR (1994) Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 370: 295-297

- Colombo S, Longhi R, Alcaro S, Ortuso F, Sprocati T, Flora A, Borgese N (2005) N-myristoylation determines dual targeting of mammalian NADH-cytochrome b5 reductase to ER and mitochondrial outer membranes by a mechanism of kinetic partitioning. *The Journal of cell biology* 168: 735-745
- Corley SM, Gready JE (2008) Identification of the RGG box motif in Shadoo: RNA-binding and signaling roles? *Bioinform Biol Insights* 2: 383-400
- Cross BC, McKibbin C, Callan AC, Roboti P, Piacenti M, Rabu C, Wilson CM, Whitehead R, Flitsch SL, Pool MR, High S, Swanton E (2009) Eeyarestatin I inhibits Sec61-mediated protein translocation at the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 122: 4393-4400
- Dahms SO, Hoefgen S, Roeser D, Schlott B, Guhrs KH, Than ME (2010) Structure and biochemical analysis of the heparin-induced E1 dimer of the amyloid precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 5381-5386
- Dalbey RE, Von Heijne G (1992) Signal peptidases in prokaryotes and eukaryotes--a new protease family. *Trends in biochemical sciences* 17: 474-478
- Dalley JA, Bulleid NJ (2003) How does the translocon differentiate between hydrophobic sequences that form part of either a GPI (glycosylphosphatidylinositol)-anchor signal or a stop transfer sequence? *Biochemical Society transactions* 31: 1257-1259
- Daniel CJ, Conti B, Johnson AE, Skach WR (2008) Control of translocation through the Sec61 translocon by nascent polypeptide structure within the ribosome. *J Biol Chem* 283: 20864-20873
- Danpure CJ (1995) How can the products of a single gene be localized to more than one intracellular compartment? *Trends in cell biology* 5: 230-238
- Das S, Mukhopadhyay D (2011) Intrinsically unstructured proteins and neurodegenerative diseases: conformational promiscuity at its best. *IUBMB Life* 63: 478-488
- Dasgupta P (2004) Somatostatin analogues: multiple roles in cellular proliferation, neoplasia, and angiogenesis. *Pharmacol Ther* 102: 61-85
- Daude N, Ng V, Watts JC, Genovesi S, Glaves JP, Wohlgemuth S, Schmitt-Ulms G, Young H, McLaurin J, Fraser PE, Westaway D (2010) Wild-type Shadoo proteins convert to amyloid-like forms under native conditions. *J Neurochem* 113: 92-104
- Daude N, Wohlgemuth S, Brown R, Pitstick R, Gapesina H, Yang J, Carlson GA, Westaway D (2012) Knockout of the prion protein (PrP)-like Sprn gene does not produce embryonic lethality in combination with PrP(C)-deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 9035-9040

- Davis JR, Kakar M, Lim CS (2007) Controlling protein compartmentalization to overcome disease. *Pharm Res* 24: 17-27
- de Gier JW, Scotti PA, Saaf A, Valent QA, Kuhn A, Luirink J, von Heijne G (1998) Differential use of the signal recognition particle translocase targeting pathway for inner membrane protein assembly in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 14646-14651
- De Strooper B, Annaert W (2000) Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *Journal of cell science* 113 (Pt 11): 1857-1870
- Devi L, Prabhu BM, Galati DF, Avadhani NG, Anandatheerthavarada HK (2006) Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction. *J Neurosci* 26: 9057-9068
- Dulubova I, Ho A, Huryeva I, Sudhof TC, Rizo J (2004) Three-dimensional structure of an independently folded extracellular domain of human amyloid-beta precursor protein. *Biochemistry* 43: 9583-9588
- Dunker AK, Lawson JD, Brown CJ, Williams RM, Romero P, Oh JS, Oldfield CJ, Campen AM, Ratliff CM, Hipps KW, Ausio J, Nissen MS, Reeves R, Kang C, Kissinger CR, Bailey RW, Griswold MD, Chiu W, Garner EC, Obradovic Z (2001) Intrinsically disordered protein. *J Mol Graph Model* 19: 26-59
- Dyson HJ, Wright PE (2001) Nuclear magnetic resonance methods for elucidation of structure and dynamics in disordered states. *Methods in enzymology* 339: 258-270
- Dyson HJ, Wright PE (2005) Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nature reviews Molecular cell biology* 6: 197-208
- Eisenhaber B, Wildpaner M, Schultz CJ, Borner GH, Dupree P, Eisenhaber F (2003) Glycosylphosphatidylinositol lipid anchoring of plant proteins. Sensitive prediction from sequence- and genome-wide studies for *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol* 133: 1691-1701
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Journal of molecular biology* 300: 1005-1016
- Epelbaum J, Ruberg M, Moyse E, Javoy-Agid F, Dubois B, Agid Y (1983) Somatostatin and dementia in Parkinson's disease. *Brain research* 278: 376-379
- Evans EA, Gilmore R, Blobel G (1986) Purification of microsomal signal peptidase as a complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 581-585

- Fedyukina DV, Cavagnero S (2011) Protein folding at the exit tunnel. *Annu Rev Biophys* 40: 337-359
- Ferron F, Longhi S, Canard B, Karlin D (2006) A practical overview of protein disorder prediction methods. *Proteins* 65: 1-14
- Fiebiger E, Hirsch C, Vyas JM, Gordon E, Ploegh HL, Tortorella D (2004) Dissection of the dislocation pathway for type I membrane proteins with a new small molecule inhibitor, eeyarestatin. *Molecular biology of the cell* 15: 1635-1646
- Finckh U, Muller-Thomsen T, Mann U, Eggers C, Marksteiner J, Meins W, Binetti G, Alberici A, Sonderegger P, Hock C, Nitsch RM, Gal A (2000) High frequency of mutations in four different disease genes in early-onset dementia. *Annals of the New York Academy of Sciences* 920: 100-106
- Fons RD, Bogert BA, Hegde RS (2003) Substrate-specific function of the translocon-associated protein complex during translocation across the ER membrane. *J Cell Biol* 160: 529-539
- Fournier JG, Escaig-Haye F, Billette de Villemeur T, Robain O (1995) Ultrastructural localization of cellular prion protein (PrP_c) in synaptic boutons of normal hamster hippocampus. *C R Acad Sci III* 318
- Gakh O, Cavadini P, Isaya G (2002) Mitochondrial processing peptidases. *Biochimica et biophysica acta* 1592: 63-77
- Galanopoulou AS, Kent G, Rabbani SN, Seidah NG, Patel YC (1993) Heterologous processing of prosomatostatin in constitutive and regulated secretory pathways. Putative role of the endoproteases furin, PC1, and PC2. *The Journal of biological chemistry* 268: 6041-6049
- Ganda OP, Weir GC, Soeldner JS, Legg MA, Chick WL, Patel YC, Ebeid AM, Gabbay KH, Reichlin S (1977) "Somatostatinoma": a somatostatin-containing tumor of the endocrine pancreas. *The New England journal of medicine* 296: 963-967
- Gilbert HF (1997) Protein disulfide isomerase and assisted protein folding. *The Journal of biological chemistry* 272: 29399-29402
- Gilch S, Nunziante M, Ertmer A, Wopfner F, Laszlo L, Schatzl HM (2004) Recognition of luminal prion protein aggregates by post-ER quality control mechanisms is mediated by the preoctarepeat region of PrP. *Traffic* 5: 300-313
- Glatzel M, Aguzzi A (2001) The shifting biology of prions. *Brain Res Brain Res Rev* 36: 241-248
- Glick BS, Brandt A, Cunningham K, Muller S, Hallberg RL, Schatz G (1992) Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism. *Cell* 69: 809-822

- Golde TE, Estus S, Younkin LH, Selkoe DJ, Younkin SG (1992) Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives. *Science* 255: 728-730
- Gould SJ, Keller GA, Hosken N, Wilkinson J, Subramani S (1989) A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *The Journal of cell biology* 108: 1657-1664
- Gu Y, Singh A, Bose S, Singh N (2008) Pathogenic mutations in the glycosylphosphatidylinositol signal peptide of PrP modulate its topology in neuroblastoma cells. *Mol Cell Neurosci* 37: 647-656
- Gumbart J, Schulten K (2006) Molecular dynamics studies of the archaeal translocon. *Biophysical journal* 90: 2356-2367
- Haass C, Koo EH, Mellon A, Hung AY, Selkoe DJ (1992) Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature* 357: 500-503
- Haass C, Steiner H (2002) Alzheimer disease gamma-secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases. *Trends in cell biology* 12: 556-562
- Hachiya N, Komiya T, Alam R, Iwahashi J, Sakaguchi M, Omura T, Mihara K (1994) MSF, a novel cytoplasmic chaperone which functions in precursor targeting to mitochondria. *The EMBO journal* 13: 5146-5154
- Haigh CL, Brown DR (2006) Prion protein reduces both oxidative and non-oxidative copper toxicity. *J Neurochem* 98: 677-689
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* 166: 557-580
- Hansson Petersen CA, Alikhani N, Behbahani H, Wiehager B, Pavlov PF, Alafuzoff I, Leinonen V, Ito A, Winblad B, Glaser E, Ankarcrona M (2008) The amyloid beta-peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 13145-13150
- Hartl FU, Hayer-Hartl M (2009) Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nature structural & molecular biology* 16: 574-581
- Hartl FU, Neupert W (1990) Protein sorting to mitochondria: evolutionary conservations of folding and assembly. *Science* 247: 930-938
- Hebert DN, Molinari M (2007) In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiological reviews* 87: 1377-1408
- Hegde RS, Bernstein HD (2006) The surprising complexity of signal sequences. *Trends in biochemical sciences* 31: 563-571
- Hegde RS, Kang SW (2008) The concept of translocational regulation. *J Cell Biol* 182: 225-232

- Helenius A (1994) How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Molecular biology of the cell* 5: 253-265
- Heller U, Winklhofer KF, Heske J, Reintjes A, Tatzelt J (2003) Post-translational import of the prion protein into the endoplasmic reticulum interferes with cell viability: a critical role for the putative transmembrane domain. *J Biol Chem* 278: 36139-36147
- Helms JB, Zurzolo C (2004) Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic* 5: 247-254
- Herms J, Tings T, Gall S, Madlung A, Giese A, Siebert H, Schurmann P, Windl O, Brose N, Kretschmar H (1999) Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J Neurosci* 19: 8866-8875
- Herrmann JM, Kohl R (2007) Catch me if you can! Oxidative protein trapping in the intermembrane space of mitochondria. *The Journal of cell biology* 176: 559-563
- Heske J, Heller U, Winklhofer KF, Tatzelt J (2004) The C-terminal domain of the prion protein is necessary and sufficient for import into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 279: 5435-5443
- Hessa T, Sharma A, Mariappan M, Eshleman HD, Gutierrez E, Hegde RS (2011) Protein targeting and degradation are coupled for elimination of mislocalized proteins. *Nature* 475: 394-397
- Holscher C, Bach UC, Dobberstein B (2001) Prion protein contains a second endoplasmic reticulum targeting signal sequence located at its C terminus. *J Biol Chem* 276: 13388-13394
- Iakoucheva LM, Brown CJ, Lawson JD, Obradovic Z, Dunker AK (2002) Intrinsic disorder in cell-signaling and cancer-associated proteins. *Journal of molecular biology* 323: 573-584
- Johnson N, Vilardi F, Lang S, Leznicki P, Zimmermann R, High S (2012) TRC40 can deliver short secretory proteins to the Sec61 translocon. *Journal of cell science* 125: 3612-3620
- Kalbfleisch T, Cambon A, Wattenberg BW (2007) A bioinformatics approach to identifying tail-anchored proteins in the human genome. *Traffic* 8: 1687-1694
- Kang SW, Rane NS, Kim SJ, Garrison JL, Taunton J, Hegde RS (2006) Substrate-specific translocational attenuation during ER stress defines a pre-emptive quality control pathway. *Cell* 127: 999-1013
- Karniely S, Pines O (2005) Single translation--dual destination: mechanisms of dual protein targeting in eukaryotes. *EMBO reports* 6: 420-425
- Kascsak RJ, Rubenstein R, Merz PA, Tonna-DeMasi M, Fersko R, Carp RI, Wisniewski HM, Diringer H (1987) Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins. *J Virol* 61: 3688-3693

- Kellems RE, Allison VF, Butow RA (1975) Cytoplasmic type 80S ribosomes associated with yeast mitochondria. IV. Attachment of ribosomes to the outer membrane of isolated mitochondria. *The Journal of cell biology* 65: 1-14
- Kim SJ, Mitra D, Salerno JR, Hegde RS (2002) Signal sequences control gating of the protein translocation channel in a substrate-specific manner. *Developmental cell* 2: 207-217
- Kitamoto T, Iizuka R, Tateishi J (1993) An amber mutation of prion protein in Gerstmann-Sträussler syndrome with mutant PrP plaques. *Biochem Biophys Res Commun* 192: 525-531
- Komiya T, Sakaguchi M, Mihara K (1996) Cytoplasmic chaperones determine the targeting pathway of precursor proteins to mitochondria. *The EMBO journal* 15: 399-407
- Koo EH, Squazzo SL (1994) Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *The Journal of biological chemistry* 269: 17386-17389
- Kramer ML, Kratzin HD, Schmidt B, Römer A, Windl O, Liemann S, Hornemann S, Kretzschmar H (2001) prion protein binds copper within the physiological concentration range. *J Biol Chem* 276: 16711-16719
- Kretzschmar HA, Stowring LE, Westaway D, Stubblebine WH, Prusiner SB, Dearmond SJ (1986) Molecular cloning of a human prion protein cDNA. *DNA* 5: 315-324
- Kretzschmar HA, Tings T, Madlung A, Giese A, Herms J (2000) Function of PrP(C) as a copper-binding protein at the synapse. *Arch Virol Suppl* 16: 239-249
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lakkaraju AK, Thankappan R, Mary C, Garrison JL, Taunton J, Strub K (2012) Efficient secretion of small proteins in mammalian cells relies on Sec62-dependent posttranslational translocation. *Molecular biology of the cell* 23: 2712-2722
- Lang S, Schauble N, Cavalie A, Zimmermann R (2011) Live cell calcium imaging combined with siRNA mediated gene silencing identifies Ca(2)(+) leak channels in the ER membrane and their regulatory mechanisms. *J Vis Exp*: e2730
- Lee HC, Bernstein HD (2001) The targeting pathway of Escherichia coli presecretory and integral membrane proteins is specified by the hydrophobicity of the targeting signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 3471-3476
- Levine CG, Mitra D, Sharma A, Smith CL, Hegde RS (2005) The efficiency of protein compartmentalization into the secretory pathway. *Molecular biology of the cell* 16: 279-291

- Lin MT, Beal MF (2006) Alzheimer's APP mangles mitochondria. *Nature medicine* 12: 1241-1243
- Linden R, Martins VR, Prado MA, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR (2008) Physiology of the prion protein. *Physiol Rev* 88: 673-728
- Lithgow T (2000) Targeting of proteins to mitochondria. *FEBS letters* 476: 22-26
- Lodish H BA, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, and Darnell J (2000) *Molecular Cell Biology*, New York: W. H. Freeman.
- Lu J, Deutsch C (2005) Secondary structure formation of a transmembrane segment in Kv channels. *Biochemistry* 44: 8230-8243
- Lustbader JW, Cirilli M, Lin C, Xu HW, Takuma K, Wang N, Caspersen C, Chen X, Pollak S, Chaney M, Trinchese F, Liu S, Gunn-Moore F, Lue LF, Walker DG, Kuppusamy P, Zewier ZL, Arancio O, Stern D, Yan SS, Wu H (2004) ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. *Science* 304: 448-452
- Ma J, Lindquist S (2002) Conversion of PrP to a self-perpetuating PrPSc-like conformation in the cytosol. *Science* 298: 1785-1788
- Mallucci G, Dickinson A, Linehan J, Klohn PC, Brandner S, Collinge J (2003) Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science* 302: 871-874
- Mallucci GR, Ratte S, Asante EA, Linehan J, Gowland I, Jefferys JG, Collinge J (2002) Post-natal knockout of prion protein alters hippocampal CA1 properties, but does not result in neurodegeneration. *The EMBO journal* 21: 202-210
- Manczak M, Anekonda TS, Henson E, Park BS, Quinn J, Reddy PH (2006) Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Human molecular genetics* 15: 1437-1449
- Manson JC, Clarke AR, Hooper ML, Aitchison L, McConnell I, Hope J (1994) 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol* 8: 121-127
- Mariappan M, Li X, Stefanovic S, Sharma A, Mateja A, Keenan RJ, Hegde RS (2010) A ribosome-associating factor chaperones tail-anchored membrane proteins. *Nature* 466: 1120-1124
- Martin J, Mahlke K, Pfanner N (1991) Role of an energized inner membrane in mitochondrial protein import. Delta psi drives the movement of presequences. *The Journal of biological chemistry* 266: 18051-18057
- Martoglio B, Dobberstein B (1998) Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol* 8: 410-415

- Maruszak A, Zekanowski C (2011) Mitochondrial dysfunction and Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35: 320-330
- Matassa DS, Amoroso MR, Maddalena F, Landriscina M, Esposito F (2012) New insights into TRAP1 pathway. *Am J Cancer Res* 2: 235-248
- McGowan JP (1922) Scrapie in sheep. *Scottish J Agric* 5: 365-375
- McLennan NF, Brennan PM, McNeill A, Davies I, Fotheringham A, Rennison KA, Ritchie D, Brannan F, Head MW, Ironside JW, Williams A, Bell JE (2004) Prion protein accumulation and neuroprotection in hypoxic brain damage. *Am J Pathol* 165: 227-235
- Menendez-Benito V, Verhoef LG, Masucci MG, Dantuma NP (2005) Endoplasmic reticulum stress compromises the ubiquitin-proteasome system. *Human molecular genetics* 14: 2787-2799
- Miesbauer M, Pfeiffer NV, Rambold AS, Muller V, Kiachopoulos S, Winklhofer KF, Tatzelt J (2009) Alpha-helical domains promote translocation of intrinsically disordered polypeptides into the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 284: 24384-24393
- Mingarro I, Nilsson I, Whitley P, von Heijne G (2000) Different conformations of nascent polypeptides during translocation across the ER membrane. *BMC Cell Biol* 1: 3
- Mitteregger G, Vosko M, Krebs B, Xiang W, Kohlmansperger V, Nolting S, Hamann GF, Kretschmar HA (2007) The role of the octarepeat region in neuroprotective function of the cellular prion protein. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 17: 174-183
- Moleres FJ, Velayos JL (2005) Expression of PrP(C) in the rat brain and characterization of a subset of cortical neurons. *Brain research* 1056: 10-21
- Moreira PI, Cardoso SM, Santos MS, Oliveira CR (2006) The key role of mitochondria in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 9: 101-110
- Moreira PI, Santos MS, Oliveira CR (2007) Alzheimer's disease: a lesson from mitochondrial dysfunction. *Antioxid Redox Signal* 9: 1621-1630
- Mothes W, Prehn S, Rapoport TA (1994) Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER membrane. *The EMBO journal* 13: 3973-3982
- Muller M, Ibrahimi I, Chang CN, Walter P, Blobel G (1982) A bacterial secretory protein requires signal recognition particle for translocation across mammalian endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry* 257: 11860-11863
- Multhaup G, Ruppert T, Schlicksupp A, Hesse L, Bill E, Pipkorn R, Masters CL, Beyreuther K (1998) Copper-binding amyloid precursor protein undergoes a

- site-specific fragmentation in the reduction of hydrogen peroxide. *Biochemistry* 37: 7224-7230
- Naylor SL, Sakaguchi AY, Shen LP, Bell GI, Rutter WJ, Shows TB (1983) Polymorphic human somatostatin gene is located on chromosome 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 2686-2689
- Neupert W, Herrmann JM (2007) Translocation of proteins into mitochondria. *Annual review of biochemistry* 76: 723-749
- Ng DT, Brown JD, Walter P (1996) Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *The Journal of cell biology* 134: 269-278
- Nico PB, de-Paris F, Vinade ER, Amaral OB, Rockenbach I, Soares BL, Guarneri R, Wichert-Ana L, Calvo F, Walz R, Izquierdo I, Sakamoto AC, Brentani R, Martins VR, Bianchin MM (2005) Altered behavioural response to acute stress in mice lacking cellular prion protein. *Behav Brain Res* 162: 173-181
- O'Brien RJ, Wong PC (2011) Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annual review of neuroscience* 34: 185-204
- Odum L, Petersen HD, Andersen IB, Hansen BF, Rehfeld JF (1994) Gastrin and somatostatin in Helicobacter pylori infected antral mucosa. *Gut* 35: 615-618
- Oesch B, Westaway D, Wälchli M, McKinley MP, Kent SBH, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE, Prusiner SB, Weissmann C (1985) A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40: 735-746
- Oldfield CJ, Meng J, Yang JY, Yang MQ, Uversky VN, Dunker AK (2008) Flexible nets: disorder and induced fit in the associations of p53 and 14-3-3 with their partners. *BMC Genomics* 9 Suppl 1: S1
- Ooi CE, Weiss J (1992) Bidirectional movement of a nascent polypeptide across microsomal membranes reveals requirements for vectorial translocation of proteins. *Cell* 71: 87-96
- Orlean P, Menon AK (2007) Thematic review series: lipid posttranslational modifications. GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or: how we learned to stop worrying and love glycospholipids. *J Lipid Res* 48: 993-1011
- Ott M, Herrmann JM (2010) Co-translational membrane insertion of mitochondrially encoded proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1803: 767-775
- Oyadomari S, Yun C, Fisher EA, Kreglinger N, Kreibich G, Oyadomari M, Harding HP, Goodman AG, Harant H, Garrison JL, Taunton J, Katze MG, Ron D (2006) Cotranslocational degradation protects the stressed endoplasmic reticulum from protein overload. *Cell* 126: 727-739

-
- Parker WD, Jr., Parks J, Filley CM, Kleinschmidt-DeMasters BK (1994) Electron transport chain defects in Alzheimer's disease brain. *Neurology* 44: 1090-1096
- Patel YC, Galanopoulou A (1995) Processing and intracellular targeting of prosomatostatin-derived peptides: the role of mammalian endoproteases. *Ciba Found Symp* 190: 26-40; discussion 40-50
- Petrova K, Oyadomari S, Hendershot LM, Ron D (2008) Regulated association of misfolded endoplasmic reticulum luminal proteins with P58/DNAJc3. *The EMBO journal* 27: 2862-2872
- Pfanner N (2000) Protein sorting: recognizing mitochondrial presequences. *Current biology : CB* 10: R412-415
- Pilon M, Schekman R, Romisch K (1997) Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. *The EMBO journal* 16: 4540-4548
- Pinheiro TJ (2006) The role of rafts in the fibrillization and aggregation of prions. *Chemistry and physics of lipids* 141: 66-71
- Plempner RK, Bohmler S, Bordallo J, Sommer T, Wolf DH (1997) Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature* 388: 891-895
- Potter MD, Nicchitta CV (2000) Regulation of ribosome detachment from the mammalian endoplasmic reticulum membrane. *The Journal of biological chemistry* 275: 33828-33835
- Premzl M, Sangiorgio L, Strumbo B, Marshall Graves JA, Simonic T, Gready JE (2003) Shadoo, a new protein highly conserved from fish to mammals and with similarity to prion protein. *Gene* 314: 89-102
- Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretschmar HA, Herms J (2006) Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26: 7212-7221
- Prusiner SB (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216: 136-144
- Prusiner SB, McKinley MP, Bowman KA, Bolton DC, Bendheim PE, Groth DF, Glenner GG (1983) Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* 35: 349-358
- Querfurth HW, LaFerla FM (2010) Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine* 362: 329-344
- Rambold AS, Miesbauer M, Rapaport D, Bartke T, Baier M, Winklhofer KF, Tatzelt J (2006) Association of Bcl-2 with misfolded prion protein is linked to the toxic potential of cytosolic PrP. *Mol Biol Cell* 17: 3356-3368

- Rambold AS, Müller V, Ron U, Ben-Tal N, Winklhofer KF, Tatzelt J (2008) Stress-protective activity of prion protein is corrupted by scrapie-prions. *EMBO J* 27: 1974-1984
- Rane NS, Kang SW, Chakrabarti O, Feigenbaum L, Hegde RS (2008) Reduced translocation of nascent prion protein during ER stress contributes to neurodegeneration. *Developmental cell* 15: 359-370
- Rangel A, Burgaya F, Gavin R, Soriano E, Aguzzi A, Del Rio JA (2007) Enhanced susceptibility of Prnp-deficient mice to kainate-induced seizures, neuronal apoptosis, and death: Role of AMPA/kainate receptors. *J Neurosci Res* 85: 2741-2755
- Rapoport TA (2007) Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* 450: 663-669
- Reinhard C, Hebert SS, De Strooper B (2005) The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function. *The EMBO journal* 24: 3996-4006
- Riek R, Hornemann S, Wider G, Glockshuber R, Wuthrich K (1997) NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett* 413: 282-288
- Ron D, Walter P (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews Molecular cell biology* 8: 519-529
- Rossjohn J, Cappai R, Feil SC, Henry A, McKinstry WJ, Galatis D, Hesse L, Multhaup G, Beyreuther K, Masters CL, Parker MW (1999) Crystal structure of the N-terminal, growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein. *Nature structural biology* 6: 327-331
- Ruddock LW, Molinari M (2006) N-glycan processing in ER quality control. *Journal of cell science* 119: 4373-4380
- Rutkowski DT, Kang SW, Goodman AG, Garrison JL, Taunton J, Katze MG, Kaufman RJ, Hegde RS (2007) The role of p58IPK in protecting the stressed endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 18: 3681-3691
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491
- Saitoh T, Igura M, Obita T, Ose T, Kojima R, Maenaka K, Endo T, Kohda D (2007) Tom20 recognizes mitochondrial presequences through dynamic equilibrium among multiple bound states. *The EMBO journal* 26: 4777-4787
- Sakthivelu V, Seidel RP, Winklhofer KF, Tatzelt J (2011) Conserved stress-protective activity between prion protein and shadoo. *J Biol Chem* 286: 8901-8908

- Samson WK, Zhang JV, Avsian-Kretchmer O, Cui K, Yosten GL, Klein C, Lyu RM, Wang YX, Chen XQ, Yang J, Price CJ, Hoyda TD, Ferguson AV, Yuan XB, Chang JK, Hsueh AJ (2008) Neuronostatin encoded by the somatostatin gene regulates neuronal, cardiovascular, and metabolic functions. *The Journal of biological chemistry* 283: 31949-31959
- Saparov SM, Erlandson K, Cannon K, Schaletzky J, Schulman S, Rapoport TA, Pohl P (2007) Determining the conductance of the SecY protein translocation channel for small molecules. *Molecular cell* 26: 501-509
- Schagger H, von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166: 368-379
- Schlenstedt G, Gudmundsson GH, Boman HG, Zimmermann R (1990) A large presecretory protein translocates both cotranslationally, using signal recognition particle and ribosome, and post-translationally, without these ribonucleoproteins, when synthesized in the presence of mammalian microsomes. *The Journal of biological chemistry* 265: 13960-13968
- Schlenstedt G, Gudmundsson GH, Boman HG, Zimmermann R (1992) Structural requirements for transport of preprocecropinA and related presecretory proteins into mammalian microsomes. *The Journal of biological chemistry* 267: 24328-24332
- Schlenstedt G, Zimmermann R (1987) Import of frog prepropeptide GLa into microsomes requires ATP but does not involve docking protein or ribosomes. *The EMBO journal* 6: 699-703
- Schleyer M, Neupert W (1985) Transport of proteins into mitochondria: translocational intermediates spanning contact sites between outer and inner membranes. *Cell* 43: 339-350
- Schmidt O, Pfanner N, Meisinger C (2010) Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nature reviews Molecular cell biology* 11: 655-667
- Shao S, Hegde RS (2011) A calmodulin-dependent translocation pathway for small secretory proteins. *Cell* 147: 1576-1588
- Shiraishi M, Kobayashi T, Watanabe H, Kamo T, Hasegawa Y (2010) Serum somatostatin in early-stage Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* 121: 225-229
- Shyu WC, Harn HJ, Saeki K, Kubosaki A, Matsumoto Y, Onodera T, Chen CJ, Hsu YD, Chiang YH (2002) Molecular modulation of expression of prion protein by heat shock. *Mol Neurobiol* 26: 1-12
- Siegel V, Walter P (1985) Elongation arrest is not a prerequisite for secretory protein translocation across the microsomal membrane. *The Journal of cell biology* 100: 1913-1921

- Siegel V, Walter P (1988) The affinity of signal recognition particle for presecretory proteins is dependent on nascent chain length. *The EMBO journal* 7: 1769-1775
- Silberstein S, Gilmore R (1996) Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 10: 849-858
- Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nature reviews Molecular cell biology* 1: 31-39
- Skrabana R, Skrabanova M, Csokova N, Sevcik J, Novak M (2006) Intrinsically disordered tau protein in Alzheimer's tangles: a coincidence or a rule? *Bratisl Lek Listy* 107: 354-358
- Small I, Wintz H, Akashi K, Mireau H (1998) Two birds with one stone: genes that encode products targeted to two or more compartments. *Plant Mol Biol* 38: 265-277
- Sonhammer EL, Wolfsberg TG (2001) Identification of motifs in protein sequences. *Curr Protoc Cell Biol* Appendix 1: Appendix 1C
- Sparkes RS, Simon M, Cohn VH, Fournier RE, Lem J, Klisak I, Heinzmann C, Blatt C, Lucero M, Mohandas T, et al. (1986) Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 7358-7362
- Stefanovic S, Hegde RS (2007) Identification of a targeting factor for posttranslational membrane protein insertion into the ER. *Cell* 128: 1147-1159
- Stojanovski D, Bragoszewski P, Chacinska A (2012) The MIA pathway: A tight bond between protein transport and oxidative folding in mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1823: 1142-1150
- Strub K, Walter P (1990) Assembly of the Alu domain of the signal recognition particle (SRP): dimerization of the two protein components is required for efficient binding to SRP RNA. *Molecular and cellular biology* 10: 777-784
- Stys PK, You H, Zamponi GW (2012) Copper-dependent regulation of NMDA receptors by cellular prion protein: implications for neurodegenerative disorders. *The Journal of physiology* 590: 1357-1368
- Talmadge K, Stahl S, Gilbert W (1980) Eukaryotic signal sequence transports insulin antigen in Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77: 3369-3373
- Terzi L, Pool MR, Dobberstein B, Strub K (2004) Signal recognition particle Alu domain occupies a defined site at the ribosomal subunit interface upon signal sequence recognition. *Biochemistry* 43: 107-117

- Thorsett ED, Latimer LH (2000) Therapeutic approaches to Alzheimer's disease. *Current opinion in chemical biology* 4: 377-382
- Tian P, Andricioaei I (2006) Size, motion, and function of the SecY translocon revealed by molecular dynamics simulations with virtual probes. *Biophysical journal* 90: 2718-2730
- Tobler I, Gaus SE, Deboer T, Achermann P, Fischer M, Rülicke T, Moser M, Oesch B, McBride PA, Manson JC (1996) Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* 380: 639-642
- Tompa P (2002) Intrinsically unstructured proteins. *Trends in biochemical sciences* 27: 527-533
- Tompa P, Fuxreiter M, Oldfield CJ, Simon I, Dunker AK, Uversky VN (2009) Close encounters of the third kind: disordered domains and the interactions of proteins. *Bioessays* 31: 328-335
- Tran MD (2011) P2 receptor stimulation induces amyloid precursor protein production and secretion in rat cortical astrocytes. *Neuroscience letters* 492: 155-159
- Tundo G, Ciaccio C, Sbardella D, Boraso M, Viviani B, Coletta M, Marini S (2012) Somatostatin modulates insulin-degrading-enzyme metabolism: implications for the regulation of microglia activity in AD. *PLoS ONE* 7: e34376
- Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC (2003) Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol* 70: 1-32
- Uversky VN (2010) Targeting intrinsically disordered proteins in neurodegenerative and protein dysfunction diseases: another illustration of the D(2) concept. *Expert Rev Proteomics* 7: 543-564
- Uversky VN (2011) Intrinsically disordered proteins from A to Z. *Int J Biochem Cell Biol* 43: 1090-1103
- Uversky VN, Dunker AK (2010) Understanding protein non-folding. *Biochimica et biophysica acta* 1804: 1231-1264
- Uversky VN, Oldfield CJ, Dunker AK (2008) Intrinsically disordered proteins in human diseases: introducing the D2 concept. *Annu Rev Biophys* 37: 215-246
- Van den Berg B, Clemons WM, Jr., Collinson I, Modis Y, Hartmann E, Harrison SC, Rapoport TA (2004) X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* 427: 36-44
- Vassallo N, Herms J (2003) Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse. *J Neurochem* 86: 538-544
- Vembar SS, Brodsky JL (2008) One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nature reviews Molecular cell biology* 9: 944-957

- Vernace VA, Schmidt-Glenewinkel T, Figueiredo-Pereira ME (2007) Aging and regulated protein degradation: who has the UPPer hand? *Aging Cell* 6: 599-606
- Verner K (1993) Co-translational protein import into mitochondria: an alternative view. *Trends in biochemical sciences* 18: 366-371
- Vetrivel KS, Thinakaran G (2006) Amyloidogenic processing of beta-amyloid precursor protein in intracellular compartments. *Neurology* 66: S69-73
- Voigt S, Jungnickel B, Hartmann E, Rapoport TA (1996) Signal sequence-dependent function of the TRAM protein during early phases of protein transport across the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* 134: 25-35
- von Heijne G (1983) Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *European journal of biochemistry / FEBS* 133: 17-21
- von Heijne G (1985) Signal sequences. The limits of variation. *Journal of molecular biology* 184: 99-105
- von Heijne G (1990) The signal peptide. *J Membr Biol* 115: 195-201
- Walter P, Blobel G (1982) Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Nature* 299: 691-698
- Wang Q, Li L, Ye Y (2008) Inhibition of p97-dependent protein degradation by Eeyarestatin I. *The Journal of biological chemistry* 283: 7445-7454
- Wang X, Bowers SL, Wang F, Pu XA, Nelson RJ, Ma J (2009) Cytoplasmic prion protein induces forebrain neurotoxicity. *Biochim Biophys Acta*
- Wang Y, Ha Y (2004) The X-ray structure of an antiparallel dimer of the human amyloid precursor protein E2 domain. *Molecular cell* 15: 343-353
- Watt NT, Taylor DR, Gillott A, Thomas DA, Perera WS, Hooper NM (2005) Reactive oxygen species-mediated beta-cleavage of the prion protein in the cellular response to oxidative stress. *J Biol Chem* 280: 35914-35921
- Watts JC, Drisaldi B, Ng V, Yang J, Strome B, Horne P, Sy MS, Yoong L, Young R, Mastrangelo P, Bergeron C, Fraser PE, Carlson GA, Mount HT, Schmitt-Ulms G, Westaway D (2007) The CNS glycoprotein Shadoo has PrP(C)-like protective properties and displays reduced levels in prion infections. *EMBO J* 26: 4038-4050
- Watts JC, Westaway D (2007) The prion protein family: diversity, rivalry, and dysfunction. *Biochim Biophys Acta* 1772: 654-672
- Weidemann A, König G, Bunke D, Fischer P, Salbaum JM, Masters CL, Beyreuther K (1989) Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* 57: 115-126

- Wertkin AM, Turner RS, Pleasure SJ, Golde TE, Younkin SG, Trojanowski JQ, Lee VM (1993) Human neurons derived from a teratocarcinoma cell line express solely the 695-amino acid amyloid precursor protein and produce intracellular beta-amyloid or A4 peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 9513-9517
- Westaway D, Daude N, Wohlgemuth S, Harrison P (2011) The PrP-like proteins Shadoo and Doppel. *Topics in Current Chemistry* 305: 225-256
- Wiech H, Sagstetter M, Muller G, Zimmermann R (1987) The ATP requiring step in assembly of M13 procoat protein into microsomes is related to preservation of transport competence of the precursor protein. *The EMBO journal* 6: 1011-1016
- Wiedemann N, Kozjak V, Chacinska A, Schonfisch B, Rospert S, Ryan MT, Pfanner N, Meisinger C (2003) Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature* 424: 565-571
- Wild K, Halic M, Sinning I, Beckmann R (2004) SRP meets the ribosome. *Nature structural & molecular biology* 11: 1049-1053
- Winklhofer KF, Heske J, Heller U, Reintjes A, Muranji W, Moarefi I, Tatzelt J (2003) Determinants of the in vivo-folding of the prion protein: a bipartite function of helix 1 in folding and aggregation. *J Biol Chem* 278: 14961-14970
- Wuthrich K, Riek R (2001) Three-dimensional structures of prion proteins. *Adv Protein Chem* 57: 55-82
- Yamano K, Yatsukawa Y, Esaki M, Hobbs AE, Jensen RE, Endo T (2008) Tom20 and Tom22 share the common signal recognition pathway in mitochondrial protein import. *The Journal of biological chemistry* 283: 3799-3807
- Yogev O, Pines O (2011) Dual targeting of mitochondrial proteins: mechanism, regulation and function. *Biochimica et biophysica acta* 1808: 1012-1020
- You H, Tsutsui S, Hameed S, Kannanayakal TJ, Chen L, Xia P, Engbers JD, Lipton SA, Stys PK, Zamponi GW (2012) Abeta neurotoxicity depends on interactions between copper ions, prion protein, and N-methyl-D-aspartate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 1737-1742
- Young JC, Hoogenraad NJ, Hartl FU (2003) Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell* 112: 41-50
- Young R, Passet B, Vilotte M, Cribeu EP, Beringue V, Le Provost F, Laude H, Vilotte JL (2009) The prion or the related Shadoo protein is required for early mouse embryogenesis. *FEBS letters* 583: 3296-3300
- Zanusso G, Petersen RB, Jin T, Jing Y, Kanoush R, Ferrari S, Gambetti P, Singh N (1999) Proteasomal degradation and N-terminal protease resistance of the codon 145 mutant prion protein. *J Biol Chem* 274: 23396-23404

- Zheng H, Koo EH (2006) The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener* 1: 5
- Zhou M, Schekman R (1999) The engagement of Sec61p in the ER dislocation process. *Molecular cell* 4: 925-934
- Zimmermann R, Eyrich S, Ahmad M, Helms V (2011) Protein translocation across the ER membrane. *Biochimica et biophysica acta* 1808: 912-924
- Zimmermann R, Sagstetter M, Lewis MJ, Pelham HR (1988) Seventy-kilodalton heat shock proteins and an additional component from reticulocyte lysate stimulate import of M13 procoat protein into microsomes. *The EMBO journal* 7: 2875-2880
- Zimmermann R, Zimmermann M, Wiech H, Schlenstedt G, Muller G, Morel F, Klappa P, Jung C, Cobet WW (1990) Ribonucleoparticle-independent transport of proteins into mammalian microsomes. *J Bioenerg Biomembr* 22: 711-723
- Zopf D, Bernstein HD, Johnson AE, Walter P (1990) The methionine-rich domain of the 54 kd protein subunit of the signal recognition particle contains an RNA binding site and can be crosslinked to a signal sequence. *The EMBO journal* 9: 4511-4517

8 Abkürzungsverzeichnis

A β	Amyloid β
APP	Amyloid-Vorläuferprotein
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
BSE	Bovine spongiforme Encephalopathie
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
dCTP	Deoxycytosintriphosphat
dGTP	Deoxyguanosintriphosphat
dTTP	Deoxythymidintriphosphat
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhances Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fötale Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HD	Hydrophobe Domäne
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
Hsp	Hitzeschock-Protein
MEM	Minimal Essential Medium
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
NMR	Kernspinresonanz-Spektroskopie (<i>nuclear magnetic resonance</i>)

kb	Kilobasenpaare
kDa	Molekulargewicht von Proteinen (Kilodalton)
OR	Oktarepeat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Ionenkonzentration
PK	Proteinase K
PrP	Prion-Protein
Ponceau S	3-Hydroxy-4-[2-sulfo-4-(4-sulfophenylazo)-phenylazo]-2,7-naphthalendisulfonsäure
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
Sarkosyl	N-Lauroylsarkosin
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecylsulfat</i>)
Sho	Shadoo
SOD	Superoxiddismutase
Som	Prä-Pro-Somatostatin
SP	Signalpeptid
SS	Signalsequenz
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	t-Octyl-Phenoxy-Polyethoxyethanol
TSE	Transmissible spongiforme Enzephalopathien
Tween-20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
UPR	<i>Unfolded stress response</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

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

9 Veröffentlichungen

Miesbauer M, **Pfeiffer NV**, Rambold AS, Müller V, Kiachopoulos S, Winklhofer KF, and Tatzelt J. Alpha-helical domains promote translocation of intrinsically disordered polypeptides into the endoplasmic reticulum.

J Biol Chem. 2009 Sep 4;284(36):24384-93

Pfeiffer NV, Dirndorfer D, Lang S, Miesbauer M, Zimmermann R, Winklhofer KF, and Tatzelt J. Structural features within the nascent chain regulate alternative targeting of secretory proteins to mitochondria.

Zur Publikation eingereicht.