

**Untersuchungen zur Fibrillenbildung
des nukleären Polyadenylat-
Bindepoteins 1 (PABPN1)**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I
- Biowissenschaften -
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Reno Winter
geboren am 21. November 1983 in Zittau

Gutachter:

1. Prof. Dr. Elisabeth Schwarz
2. PD Dr. Ralph Golbik
3. Prof. Dr. Robert Seckler

Promotionsgesuch eingereicht am: 20. September 2012

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05. Februar 2013

Nachtrag vom 01.03.2013: Korrekturen

Folgende Korrekturen sind bitte Nachträglich zu berücksichtigen. Sie gehen unter anderem aus den Promotionsgutachten hervor:

- (1) S. 33: der 10x Kathodenlaufpuffer enthält lediglich Tris und nicht Tris/HCl
- (2) Abbildung 12 B: die Beschriftung der Ordinatenachse ist durch 1/Gebundene Oligo-(A)-RNA (1/fmol) zu ersetzen
- (3) Abbildung 28: die Spektren der entfalteten Proteine sind in grün, die der fibrillären Proteine in rot dargestellt
- (4) „Absorption“ ist durch „Extinktion“ zu ersetzen
- (5) „Proteinrückgrat“ ist durch „Proteinrückgrad“ zu ersetzen

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	
1.1	Proteinfaltung und -missfaltung	1
1.1.1	Grundlagen der Proteinfaltung	1
1.1.2	Alternative Faltungswege und Proteinmissfaltung	3
1.2	Proteinmissfaltungskrankheiten	5
1.3	Eigenschaften amyloider Aggregate	7
1.4	Trinukleotidexpansionen als Ursache für amyloide Aggregate	9
1.4.1	Polyglutaminexpansionen	9
1.4.2	Polyalaninexpansionen	10
1.5	Die Okulopharyngeale Muskeldystrophie	11
1.6	Das nukleäre Polyadenylat-Bindeprotein 1	12
1.7	Stand der Forschung – die Rolle von PABPN1 bei der Krankheit OPMD	14
1.8	Zielsetzung	17
2	Materialien und Methoden	
2.1	Materialien	19
2.1.1	Chemikalien	19
2.1.2	Standards	19
2.1.3	Säulen und Säulenmatrices	20
2.1.4	<i>E. coli</i> -Stämme	20
2.1.5	Geräte	21
2.1.6	Weitere Materialien	21
2.2	Methoden	22
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	22
2.2.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	22
2.2.1.2	Phenol-Chloroform-Extraktion	23
2.2.1.3	Fällung von Nukleinsäuren durch Ethanol	23
2.2.1.4	Polymerase Chain Reaction (PCR)	23
2.2.1.5	Zwischenklonierung in den Vektor <i>pCR-Blunt II-TOPO</i>	24
2.2.1.6	Hydrolyse durch spezifische Restriktionsendonukleasen	26
2.2.1.7	Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren	26
2.2.1.8	<i>Ligation</i>	26
2.2.1.9	Agarosegel-Elektrophorese	26
2.2.1.10	Sequenzierung von Plasmid-DNA	27
2.2.1.11	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	27
2.2.1.12	5'-Markierung von RNA mit [γ - ³² P]-ATP	27

2.2.1.13 „DEAE-Methode“ zur Quantifizierung radioaktiver Markierungen	28
2.2.2 Mikrobiologische Methoden	29
2.2.2.1 Transformation von Plasmid-DNA in <i>Escherichia coli</i>	29
2.2.2.2 Rekombinante Genexpression	30
2.2.3 Biochemische und biophysikalische Methoden	32
2.2.3.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	32
2.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	33
2.2.3.3 Ultrazentrifugation	35
2.2.3.4 Limitierte Proteolyse	35
2.2.3.5 Filterbindungsassay, adaptiert nach SACHS und KORNBERG (1985) [129]	35
2.2.3.6 Konkurrenz der RNA-Bindung	36
2.2.3.7 Circular dichroismus (CD)-Messung	37
2.2.3.8 Intrinsische Fluoreszenz	38
2.2.3.9 Fouriertransformierte Infrarotspektroskopie (FTIR)	38
2.2.3.10 Fibrillierungsansätze	38
2.2.3.11 Detektion amyloider Fibrillen durch Thioflavin T- Bindung	39
2.2.3.12 Solubilisierung von fibrillärem Protein	39
2.2.3.13 Seed-Präparation aus fibrillärem Protein	40
2.2.3.14 Anfertigung von Grids für die Elektronenmikroskopie	41
2.2.3.15 Reversed Phase - High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)	41
2.2.3.16 Test auf oligomere Spezies während der Fibrillenbildung durch Gelfiltration	41
2.2.3.17 Massenspektrometrie (MS)	42
2.2.3.18 Konzentrierung von Proteinlösungen	42
2.2.4 Proteinreinigung	43
2.2.4.1 Zellaufschluss	43
2.2.4.2 Reinigung der Gesamtlängen-PABPN1-Varianten	44
2.2.4.3 Reinigung von PABPN1-Fragmenten mit N-terminaler 6 x His-SUMO-Fusion	46
2.2.4.4 Reinigung der SUMO1-Protease	48
2.2.4.5 Reinigung der N-terminalen Domäne von PABPN1	48
3 Ergebnisse	
3.1 Analyse von Gesamtlängen-PABPN1	50
3.1.1 Rekombinante Genexpression und Proteinreinigung	50
3.1.2 Charakterisierung der löslichen Proteine	52
3.1.2.1 Massenspektrometrie	52
3.1.2.2 Biophysikalische Charakterisierung	52
3.1.2.3 Untersuchung der RNA-Bindungsaffinität	55
3.1.3 Charakterisierung des fibrillären Zustandes	56
3.1.3.1 Fibrillenbildung in Abwesenheit von Seeds	56

3.1.3.2	Fibrillenbildung in Anwesenheit von <i>Seeds</i>	58
3.1.3.3	Untersuchung früher Phasen der Fibrillenbildung	60
3.1.3.4	Strukturelle Charakterisierung der Fibrillen durch Infrarotspektroskopie und Circular dichroismus-Messungen	63
3.1.3.5	Sensitivität der Fibrillen gegenüber Solubilisierung mit Guanidiniumchlorid	66
3.1.3.6	Analyse des fibrillären Proteins hinsichtlich der RNA-Bindungsaffinität	68
3.1.3.7	Limitierte Proteolyse zur Analyse der konformationellen Umlagerung	69
3.1.3.8	Identifizierung der Proteolysefragmente mittels Massenspektrometrie	72
3.1.3.9	Analyse der konformationellen Umlagerung des C-terminalen Bereiches anhand der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz	74
3.2	Analyse von Deletionsvarianten von PABPN1	75
3.2.1	Untersuchung und Charakterisierung der Fibrillenbildung von N- und C-terminalen Deletionsvarianten	76
3.3	Zusammenfassung Kapitel I	79
3.4	Ist eine alaninabhängige Fibrillenbildung in PF-Puffer möglich?	82
3.4.1	Fibrillenbildung N-terminaler Fragmente von PABPN1	82
3.4.2	Biophysikalische Charakterisierung von fibrillärem (+7)Ala-N147 und N-(+7)Ala	84
3.4.2.1	Untersuchungen des Sekundärstrukturgehaltes mittels FTIR	84
3.4.2.2	Analyse der Sensitivität der Fibrillen gegenüber Guanidiniumchlorid	85
3.5	Alanininduzierte Fibrillenbildung der Δ C49-Varianten	86
3.5.1	Fibrillenbildung von Δ C49 bei erhöhter Temperatur und Proteinkonzentration	87
3.5.2	Biophysikalische Charakterisierung von fibrillärem Δ C49	89
3.6	Fibrillenbildung unter leicht denaturierenden Bedingungen	90
3.6.1	Einfluss der Denaturierungsmittel auf den Faltungszustand des löslichen Proteins	91
3.6.2	Analyse der Fibrillenbildung	92
3.7	Zusammenfassung Kapitel II	94
4	Diskussion	
4.1	Einfluss der Alaninsequenz auf die Struktur der monomeren Proteine	95
4.2	Der fibrilläre Zustand von PABPN1	96
4.2.1	Untersuchung der Fibrillenbildung	96
4.2.2	Charakterisierung des fibrillären Zustandes des Gesamtlängen-Proteins	98
4.2.3	Einfluss der C-terminalen Region auf die Fibrillenbildung von PABPN1	100
4.2.4	Das „EISENBERG-Postulat“ – <i>in silico</i> -Analyse von PABPN1	102
4.3	Mögliche Ursachen der Assemblierung von PABPN1	103
4.4	Wiederherstellung der alaninabhängigen Fibrillenbildung bei Δ C49	106
4.5	Die Rolle von PABPN1 bei der Pathogenese von OPMD	107
4.6	Zusammenfassung und Ausblick	108

5	Anhang	
5.1	Fibrillenbildung in Anwesenheit von Oligoadenylat-RNA	109
5.2	Spezifität der RNA-Bindung durch fibrilläres Gesamtlängen-PABPN1	110
5.3	Ergänzung zu Kapitel 3.6.1	111
5.4	Überprüfung der <i>Seed</i> -Präparationen	112
5.5	Reinigung und Charakterisierung der Δ C49-Varianten	113
5.6	Reinigung und Charakterisierung von SUMO- Δ N114	114
5.7	Reinigung und Charakterisierung der N147-Varianten	116
6	Abkürzungsverzeichnis	117
7	Literaturverzeichnis	118

1 Einleitung

1.1 Proteinfaltung und -missfaltung

1.1.1 Grundlagen der Proteinfaltung

Neben Nucleinsäuren und Lipiden stellen Proteine in der lebenden Zelle eines der wichtigsten Biomoleküle dar. Proteine decken dabei ein schier unendliches Funktionsspektrum ab: Angefangen von Enzymen, die die Replikation der Erbinformation in jedem Organismus sicherstellen, der Funktion als Bewegungsapparat in Form eines Flagellums in vielen Prokaryoten, der Schutzfunktion in höheren Lebewesen als Antikörper, bis hin zur Fanghilfe von Nahrung in Form eines Netzes bei den Arachniden.

Um die zahlreichen Aufgaben bewältigen zu können, müssen die Proteine, ausgehend von der (unstrukturierten) Primärsequenz zu einer definierten Konformation falten, die für die unterschiedlichen Aufgaben essenziell ist. Bereits seit über 60 Jahren werden die molekularen Prozesse und die Biophysik der Proteinfaltung intensiv untersucht. In den 1950er Jahren beschrieb WALTER J. KAUZMANN die thermodynamischen Kräfte, die für die Faltung eines Proteins zur nativen Konformation wichtig sind. Interaktionen, wie elektrostatische oder van-der-Waals-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und besonders hydrophobe Effekte spielen dabei eine entscheidende Rolle und zählen zu den strukturbildenden Kräften während des Faltungsprozesses [1]. Dennoch ist heute immer noch weitgehend unbekannt wie die native Konformation und der Faltungsprozess durch die Primärsequenz bestimmt werden. Im Laufe der Zeit entwickelten sich unterschiedliche Theorien, um das „Problem der Proteinfaltung“ zu klären. Erste Ansätze das Phänomen der Proteinfaltung zu beschreiben, gelangen CYRUS LEVINTHAL Ende der 60er Jahre des letzten Jahrhunderts. Dem „Levinthal-Paradoxon“ zufolge scheint es unmöglich, dass ein entfaltetes Protein spontan und allein durch statistische Prozesse getrieben, in einem biologisch relevanten Zeitfenster zur nativen Konformation falten kann [2]. Jedoch zeigten spätere Untersuchungen von CHRISTIAN B. ANFINSEN, dass kleine Proteine vom denaturierten zum nativen Zustand spontan renaturieren können. Demnach scheint die Tertiärstruktur in der Primärsequenz codiert zu sein, wobei die treibende Kraft der Faltung die Minimierung des Energiegehaltes des Moleküls ist [3–5].

„The three-dimensional structure of a native protein in its normal physiological milieu [...] is the one in which the Gibbs free energy of the whole system is lowest; that is that the native conformation is determined by the totality of interatomic interactions and hence by the amino acid sequence, in a given environment.“

CHRISTIAN B. ANFINSEN, 1972

In den darauffolgenden Jahren entwickelten sich weitere Hypothesen zur Klärung des Mechanismus der Proteinfaltung. Zur Lösung des von LEVINTHAL postulierten Problems, schlug in den 1970er Jahren PTITSYN das so genannte *framework model* vor. Dieses Modell beschreibt eine schrittweise und hierarchische Faltung über mehrere Stufen [6,7]. Ferner wurde als initialer Faltungsschritt ein hydrophober Kollaps postuliert. Darunter versteht man die Zusammenlagerung hydrophober Regionen (Seitenketten) der Polypeptidkette. Ein solcher Prozess wurde beispielsweise bei Untersuchungen zur Faltung des Barnase Inhibitors Barstar beschrieben [8]. Basierend auf dem Modell des hydrophoben Kollaps wurde bei Untersuchungen von Cytochrom c und α -Lactalbumin der Begriff *molten globule* geprägt [9–13]. Dieser Zustand zeichnet sich durch eine kompakte Struktur (*globule*) aus, die jedoch keine definierte Tertiärstruktur (*molten*) besitzt [14].

Beim Versuch die zahlreichen Befunde einzuordnen, wird noch heute die Vorstellung einer „Energielandschaft“ bevorzugt. In den 1980er Jahren entwickelte sich eine Sichtweise, die die Proteinfaltung als einen Gesamtprozess betrachtet [15] und postuliert, dass die Faltung entlang bestimmter „Energiepfade“ stattfindet, in der Literatur als *funneling* bezeichnet [16,17]. Das Proteinmolekül ist dabei bestrebt zu einer möglichst energiearmen Konformation zu falten oder, mit anderen Worten, eine hohe konformationelle Stabilität einzunehmen [4]. Unter Stabilität versteht man dabei die Differenz der Freien Enthalpie in der reversiblen Faltung von der denaturierten zur nativen Konformation [18]. Das Protein faltet, indem Entropie gegen Energie eingetauscht wird und sich die Energielandschaft „bergab“ entlang bestimmter Wege in Richtung des nativen Zustands „bewegt“ (*funneling*) [15,18]. Ausgehend von der ungefalteten Polypeptidkette können z.T. mehrere „Faltungspfade“ und verschiedene Zwischenzustände zum nativen Zustand führen (Abbildung 1). Je nach Energieprofil kann das Protein in einer bestimmten Konformation, also einem lokalen Energieminimum, „gefangen“ werden. Je näher der Konformationszustand dem der nativen Struktur kommt, desto geringer wird die Entropie des Systems, gleichzeitig wird die Energie des Systems aber entscheidend minimiert.

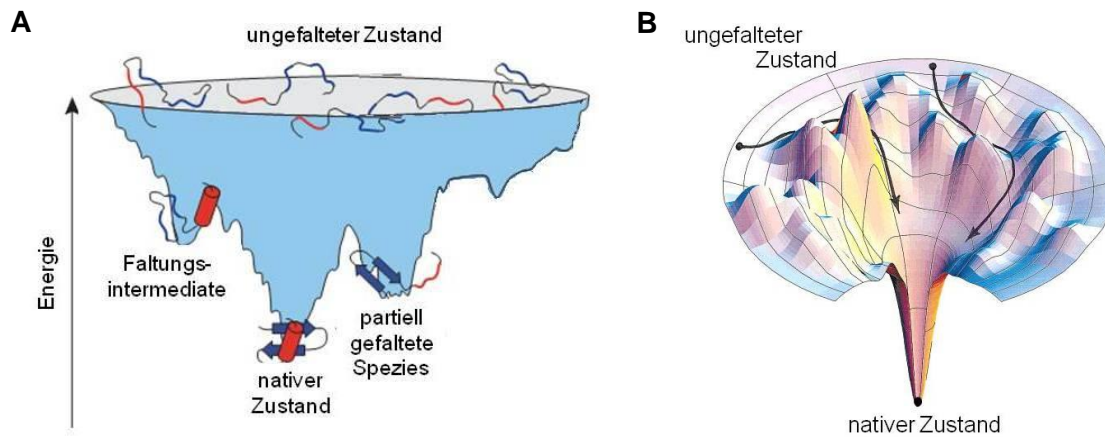


Abbildung 1. Verschiedene Darstellungsarten der Energielandschaft von Konformationszuständen eines Proteins (A und B). Ausgehend vom ungefalteten Zustand gibt es zahlreiche Wege, um den nativen Zustand zu erreichen. Das Protein kann dabei als Faltungsintermediat in lokalen Minima „gefangen“ werden. Die treibende Kraft ist die Energieminimierung des Moleküls (Ordinate), wobei die Entropie sinkt (Kreisbahnen). Modifiziert nach [19,20].

Obwohl sich ANFINSENS *thermodynamic hypothesis* zur Beschreibung der treibenden Kraft der Proteinfaltung etabliert hat, verstand man in den letzten Jahren, dass zudem kinetische Aspekte einen bestimmenden Einfluss auf die Energielandschaft haben [21]. Die Faltung einer Polypeptidkette zum nativen Protein muss daher sowohl unter thermodynamischen als auch kinetischen Gesichtspunkten betrachtet werden.

1.1.2 Alternative Faltungswege und Proteinmissfaltung

Während der Translation am Ribosomen wird aus einzelnen Aminosäuren die Polypeptidkette synthetisiert. Kotranslational finden dabei erste Faltungsprozesse des unvollständig gebildeten Proteins statt [22]. Ferner benötigen bestimmte Prozesse in der Zelle, wie beispielsweise der Proteintransport über Membranen, entfaltetes oder partiell entfaltetes Protein. Unweigerlich werden dabei Seitenketten lösungsmittlexponiert, die sich im nativen Zustand im Proteininneren zu einem „hydrophoben Kern“ zusammenlagern. So treten zahlreiche nicht-native Interaktionen in dem Proteinmolekül auf, die durch die raue Oberfläche der Energielandschaft repräsentiert werden [23]. Durchläuft das Protein einen komplexen Faltungsmechanismus, so steigt die Wahrscheinlichkeit der Anhäufung solcher missgefalteten Zustände. Unter einem komplexen Faltungsmechanismus versteht man die Interaktion von Proteindomänen während des Faltungsprozesses, die in der nativen Konformation separiert vorliegen [19,24]. Treten diese nicht-nativen Interaktionen auf, so können sich in vielen Fällen amorphe Aggregate bilden. Grund hierfür ist die Zusammenlagerung exponierter hydrophober Regionen der missgefalteten Spezies, die im nativen Zustand meist im Molekülinneren verborgen liegen. Das in Abbildung 1 gezeigte

Modell der Proteinfaltung muss deshalb erweitert werden. In den Prozess der Proteinfaltung müssen, neben der Betrachtung von intramolekularen Interaktionen, intermolekulare Wechselwirkungen miteinbezogen werden (Abbildung 2). Ein „Spezialfall“ der Aggregation stellt die Bildung hochstrukturierter Aggregate dar. Dieser unlösliche Faltungszustand ist durch eine Zusammenlagerung zu einer amyloiden Fibrille charakterisiert. Die Bildung dieser Fibrillen stellt einen alternativen Faltungsweg dar, der womöglich wie die Faltung zur nativen Konformation, über verschiedene intermediäre Zustände verlaufen kann.

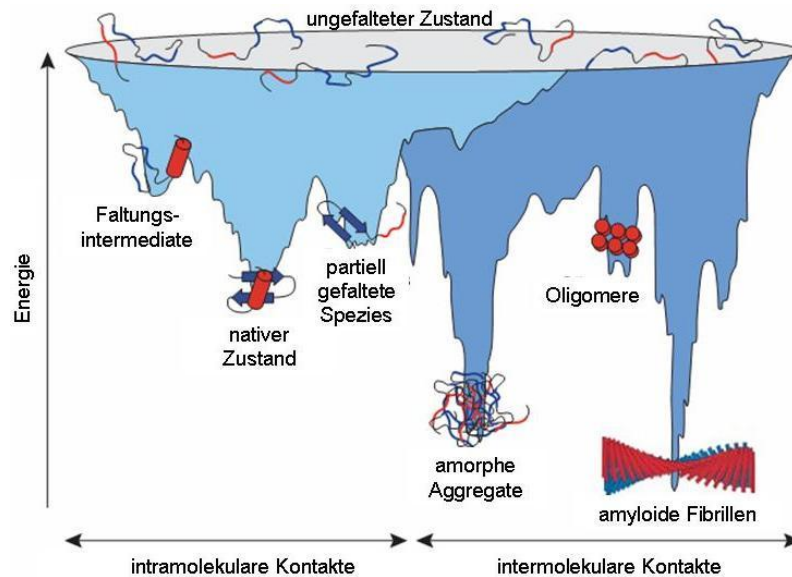


Abbildung 2. Darstellungsarten der Energielandschaft eines Proteins unter Berücksichtigung von intra- (hellblau) und intermolekularen (dunkelblau) Wechselwirkungen. Beide Teilbereiche können im Prozess der Proteinfaltung nicht separat voneinander betrachtet werden. Die Bildung von hochgeordneten Aggregaten (amyloide Fibrillen) stellt einen alternativen Faltungsweg dar. Abbildung modifiziert nach [19].

Verglichen mit dem nativen Zustand nehmen die amyloiden Fibrillen wahrscheinlich einen energieärmeren Zustand ein [25]. Ein direkter Vergleich der thermodynamischen Stabilität zwischen einem löslichen und einem aggregierten Protein ist jedoch nur bedingt möglich. Zwangsläufig stellt sich die Frage, welche thermodynamischen Kräfte für die Bildung des weitaus geringeren Energiezustandes des amyloiden Zustandes verantwortlich sind. Wie bereits erwähnt, stellen hydrophobe Interaktionen eine Schlüsselrolle bei der Proteinfaltung dar. Während bei der Faltung zur nativen Konformation hydrophobe Seitenketten im Proteininneren verborgen werden, spielt bei der Fibrillenbildung die Abschirmung des Peptidrückgrades vom Lösungsmittel eine entscheidende Rolle [26]. Die Möglichkeit der Säureamidbindung bei der Bildung von Wasserstoffbrücken sowohl als Donor als auch Akzeptor zu fungieren stellt eine wichtige Fähigkeit bei dem alternativen Faltungsprozess dar. Die Umfaltung zu einer geordneten β -Faltblattstruktur innerhalb der Fibrille führt zur Ausbildung einer maximalen Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen und somit zur

Energieminimierung der Proteinmoleküle. Heute ist bekannt, dass eine amyloide Fibrille nahezu kein Kristallwasser besitzt, durch eine eng gepackte β -Faltblattstruktur gekennzeichnet und durch zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen charakterisiert ist [27,28].

Hat das Protein die native Konformation angenommen, so ist es unwahrscheinlich, dass es in die amyloide Konformation umlagert. Baskakov *et al.* zeigten anhand der Umlagerung des Prionenproteins (PrP), dass der Grund hierfür zum einen in einer großen Energiebarriere und zum anderen in einer um mehrere Größenordnungen geringeren Faltungsgeschwindigkeit hin zur fibrillären Konformation liegt [29]. Der alternative Faltungsweg setzt demnach eine partielle Entfaltung der nativen Struktur voraus [30].

Um die Wahrscheinlichkeit der Missfaltung von Proteinen zu minimieren, hat die Evolution ein großes System hervorgebracht, das die Faltung von Proteinen „überwacht“ bzw. einer „Qualitätskontrolle“ unterzieht. Das Kapitel der Faltungshelfer bzw. des Ubiquitin-Proteasom-Systems wird in den Publikationen [31–35] ausführlich beschrieben.

1.2 Proteinmissfaltungskrankheiten

In den letzten Jahren rückten Studien alternativer Faltungswege zunehmend in den Fokus der Wissenschaft. Nicht zuletzt wegen den gesundheitlichen und gesellschaftlichen Folgen der Proteinmissfaltung bzw. der daraus resultierenden Proteinmissfaltungskrankheiten: Etwa 1–2% der über 65-jährigen weltweit leiden an Morbus Parkinson [36]. Von Demenzerkrankungen wie Morbus Alzheimer sind global über 40 Millionen Menschen betroffen [37].

Es ist naheliegend, dass die Fehlfaltung eines Proteins auf die Zelle bzw. den gesamten Organismus verheerende Folgen hat. In den meisten Fällen wird daher falsch gefaltetes Protein schnell abgebaut und metabolisiert. In Einzelfällen steht die Fehlfaltung mit der Bildung schwer abbaubarer Aggregate in Verbindung. Das fehlgefaltete Protein lagert sich dann intra- oder extrazellulär ab. Einer zunehmenden Anzahl an Erkrankungen, den sogenannten Amyloidosen, werden Proteinablagerungen als Krankheitsursache oder Begleiterscheinung zugeordnet. Das wohl bekannteste Beispiel ist die Demenzerkrankung Morbus Alzheimer. Diese neurodegenerative Krankheit ist durch Ablagerungen des Amyloid- β -Peptides und des Proteins Tau charakterisiert [38]. Vornehmlich Menschen im hohen Alter entwickeln ein zunehmendes Risiko an Morbus Alzheimer zu erkranken. Einhergehend mit einer steigenden Lebenserwartung, stieg in den letzten Jahren die Anzahl an Alzheimer-Patienten. Eine ähnliche Situation ist bei der Krankheit Morbus Parkinson festzustellen. Patienten, die an Morbus Parkinson leiden, zeigen Ablagerungen des Proteins α -Synuclein in sogenannten *Lewy bodies* in Nervenzellen, die zur Zerstörung dopaminproduzierender

Zellen führen [39,40]. Diese Nervenschädigung ist der Grund für das bei Parkinson-Patienten typische unkontrollierte Muskelzittern. Ab einem bestimmten Alter sind bei jedem Menschen amyloide Ablagerungen zu finden. So sind nahezu bei jeder Person, die älter als 50 Jahre ist, amyloide Aggregate in den Aortengefäßen nachweisbar und bei fast allen Menschen über 80 Jahren Transthyretin Ablagerungen festzustellen [41–43]. Die Liste der Proteinmissfaltungskrankheiten ließe sich beliebig fortsetzen, eine Übersicht ist den Referenzen [44,45] zu entnehmen.

Heftig umstritten ist noch immer die Frage, welche Prozesse das eigentliche Krankheitsbild auslösen. Sind es die Ablagerungen selbst oder stellen diese womöglich einen Schutzmechanismus des Körpers vor möglichen toxischen oligomeren Vorstufen dar [46]? Im Falle von Morbus Alzheimer und -Parkinson konnte z.B. ein toxischer Effekt der Oligomere auf die Zelle festgestellt werden [47,48].

Ein Sequenzvergleich der verschiedenen Polypeptide, die an der Bildung der Fibrillen beteiligt sind, lässt kaum Homologien erkennen. Insgesamt wurden 25 nicht-homologe Polypeptidsequenzen gefunden, die im Zusammenhang mit einer Amyloidose stehen [41]. In den letzten Jahren hat sich deshalb die Erkenntnis entwickelt, dass theoretisch jede Polypeptidkette in der Lage ist unter entsprechenden Bedingungen, zu einer amyloiden Struktur umzulagern [49]. In der Literatur sind viele Beispiele für nicht krankheitsassoziierte Proteine zu finden, die amyloide Strukturen bilden können.

1.3 Eigenschaften amyloider Aggregate

Von Ablagerungen in Patientenmaterial, die im Jahr 1854 von RUDOLPH VIRCHOW als stärkeähnlich beschrieben wurden, weiß man spätestens seit FRIEDREICH und KEKULÉ, dass es sich dabei um Proteine handelte [50]. Untersuchungen von COHEN und CALKINS führten zur ersten strukturellen Vorstellung der Ablagerungen: 1959 beschrieben sie filamentöse, bündelartige Fibrillen [51].

Eine geringe Sensitivität der Ablagerungen gegenüber der Entfaltung durch Detergenzien, Temperatur oder Denaturierungsmittel [28] deutet indirekt auf eine höhere thermodynamische Stabilität verglichen mit dem nativen Zustand hin (Abbildung 2). Diese erhöhte Stabilität kann auf die Struktur der amyloiden Fibrillen zurückgeführt werden. Charakteristisch für den amyloiden Zustand ist ein ausgeprägter β -Faltblattanteil [27]. Dabei ordnen sich die einzelnen β -Stränge parallel zur Fibrillenachse an und bilden die sogenannte β -cross-Struktur aus (Abbildung 3) [52,53]. Diese Struktur bewirkt eine hohe Resistenz gegenüber proteolytischem Abbau [54]. Die Bindung von Farbstoffen wie Kongorot und Thioflavin T dient der Detektion von amyloiden Strukturen [55,56]. Amyloide Fibrillen lassen sich mithilfe der Elektronenmikroskopie abbilden. Die Ablagerungen zeichnen sich durch unverzweigte, langgestreckte filamentöse Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 6 bis maximal 25 nm aus.

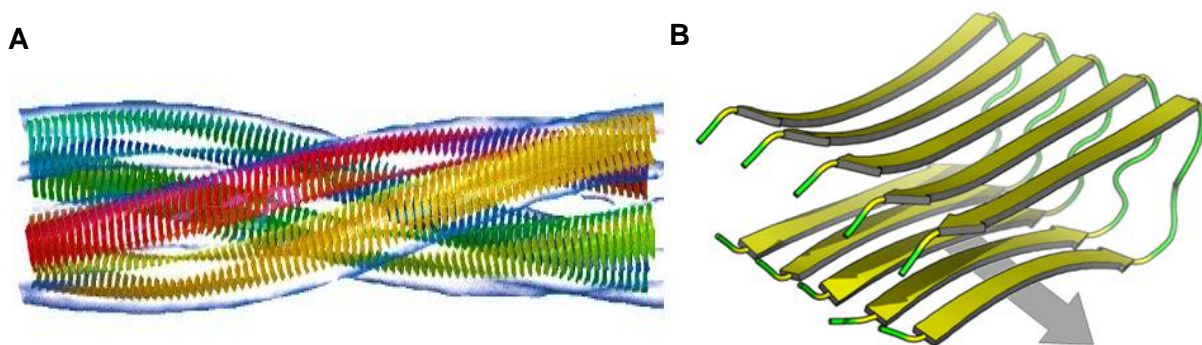


Abbildung 3. (A) Modell einer Insulinfibrille auf Grundlage von elektronenmikroskopischen Daten (blaue Oberfläche). Die Fibrille setzt sich aus vier Protofilamenten zusammen [57]. (B) NMR-Struktur für fibrilläres A β ₁₋₄₂. Einsicht in die Sekundärstruktur innerhalb des dicht gepackten Fibrillenkerns [58]. Der graue Pfeil deutet die Fibrillenachse an (pdb: 2BEG).

Balbirnie *et al.* beschrieben im Jahr 2001 die amyloide β -cross-Struktur als eine eng gepackte Konformation, die nahezu kein Kristallwasser besitzt [27,28]. Der hochgeordnete, repetitive Zustand bewirkt eine charakteristische Ablenkung von Röntgenstrahlen und führt zu einem typischen Röntgenbeugungsmuster, das von zwei Reflexionen bei ca. 5 und 10 Å dominiert wird [53]. Die Reflexionen spiegeln den Hauptketten- (10 Å) und den

Seitenkettenabstand (5 Å) wider. Die Abstände sind dabei abhängig von den van-der-Waals-Radien der einzelnen Seitenketten. In den letzten Jahren wurden große Anstrengungen unternommen, die Struktur von Fibrillen auf molekularer Ebene aufzuklären. Untersuchungen mit Festkörper-NMR und Cryo-Elektronenmikroskopie lieferten Einblicke in die Fibrillenstruktur [58–61]. Im Jahr 2008 veröffentlichten Wasmer *et al.* die 3-D-Struktur von Fibrillen des Prionenproteins HET-s basierend auf Festkörper-NMR-Daten [62]. Die Ergebnisse erlauben einen Einblick in die Anordnung der Peptide innerhalb der Fibrille. Das 2002 veröffentlichte Modell einer Insulinfibrille zeigte, dass sich eine Fibrille aus mehreren Protofilamenten zusammensetzt (Abbildung 3) [57]. Die Anzahl der Protofilamente ist dabei je nach Protein unterschiedlich [63]. Ferner wurde anhand $A\beta_{1-40}$ -Fibrillen ein Polymorphismus beschrieben. Das Polypeptid lagerte unter denselben Bedingungen zu 12 morphologisch unterscheidbaren Fibrillensubtypen um [64]. Zudem zeigten verschiedene Studien unterschiedliche Interaktionsmöglichkeiten der Protofilamente von fibrillärem $A\beta_{40/42}$ [65]. Generell wird heutzutage davon ausgegangen, dass die Morphologie der Fibrillenkernstruktur von Peptid zu Peptid unterschiedlich ist. Fibrilläres HET-s zeigt beispielsweise eine ungewöhnliche dreieckige Anordnung von β -Faltblättern im Fibrillenkern [62].

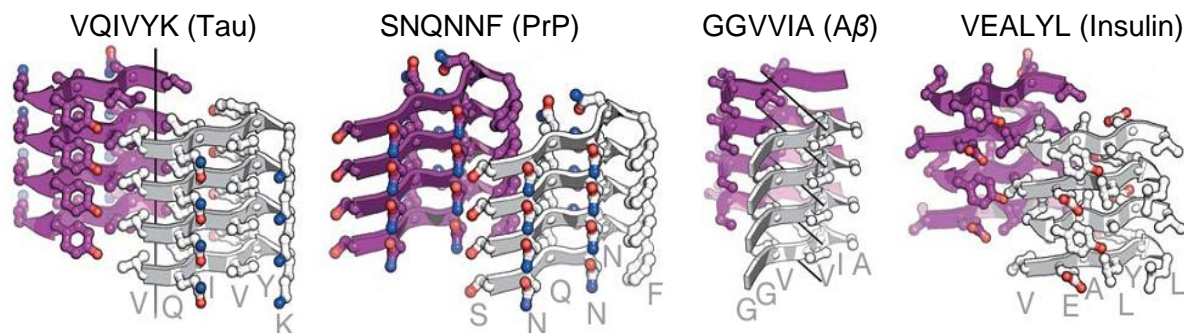


Abbildung 4. Darstellung des *steric zipper* für vier unterschiedliche krankheitsassoziierte Proteine. Dargestellt sind die identifizierten Peptide, die an der Ausbildung des *steric zipper* beteiligt sind. Jede dieser Strukturen repräsentiert eine andere Klasse von *steric zipper*, die sich strukturell in der Bildung des *zipper* unterscheiden. Modifiziert nach [66].

In den letzten Jahren prägten Untersuchungen von DAVID EISENBERG und Mitarbeitern das Verständnis der amyloiden Struktur. Die Herstellung und Untersuchung von Mikrokrystallen von Hexa- bis Oktapeptiden aus amyloiden Sequenzen ermöglichten weitere Einblicke in die Struktur amyloider Aggregate. Im Jahr 2005 postulierte die Gruppe EISENBERG, dass die Fibrillenentstehung auf die Ausbildung eines sogenannten *steric zipper* zurückzuführen sein könnte [66,67]. Darunter versteht man das reißverschlussartige Ineinandergreifen von nur wenigen Aminosäureresten unter Ausbildung des Fibrillerrückgrades (Abbildung 4). Dieses Modell fand bei Untersuchungen verschiedener krankheitsassoziierter Proteine Bestätigung [68].

1.4 Trinukleotidexpansionen als Ursache für amyloide Aggregate

Amyloide Aggregate, das Ergebnis eines alternativen Faltungsweges und Charakteristikum für viele Proteinmissfaltungskrankheiten, können unterschiedliche Ursachen haben. Für Patienten, die beispielsweise unter der neurodegenerativen Krankheit Morbus Parkinson leiden, wurde eine Überproduktion von α -Synuclein als Ursache für die Ablagerung des Proteins in *Lewy bodies* festgestellt. Die Überproduktion des Proteins konnte auf Duplikate oder Triplikate des *α -Synuclein*-Lokus zurückgeführt werden [69]. Die erhöhte Proteinkonzentration führt zur Missfaltung und somit Aggregation von α -Synuclein. Patienten, die an Morbus Alzheimer leiden, zeigen intrazellulär fibrilläre Ablagerungen von Tau. Die Missfaltung des Proteins wird durch eine Hyperphosphorylierung von Tau ausgelöst [70].

Eine weitere Ursache der Proteinmissfaltung kann eine Tripletterweiterung im Gen des betroffenen Proteins sein. Auf Proteinebene führt diese Expansion zu Homopolyaminosäuresequenzen. Zwei Typen von krankheitsverursachenden Expansionen werden in den folgenden Abschnitten vorgestellt.

1.4.1 Polyglutaminexpansionen

Das bekannteste Beispiel ist die neurodegenerative Erkrankung Chorea Huntington, die durch eine abnormale Trinukleotiderweiterung im Gen des Proteins Huntingtin verursacht wird. Das Wildtypprotein besitzt eine Polyglutaminsequenz, bestehend aus 6–34 L-Glutaminresten, die bei Huntington-Patienten auf bis zu 121 Reste expandiert vorliegt [71]. Auf DNA-Ebene zeichnen sich die Tripletterweiterungen durch eine geringe Stabilität aus. Die hohe Tendenz zur Mutation wird damit begründet, dass Polyglutaminsequenzen nahezu ausschließlich durch (CAG)-Trinukleotide codiert werden. Bei Replikation der Sequenz kann es daher zu „Sprüngen“ der Polymerase kommen, die zu einer Verkürzung oder Verlängerung solcher DNA-Bereiche und somit zu ungewöhnlich großen Expansionen von bis zu 360 Basen führen können [72].

Insgesamt existieren neun Krankheiten, die diese Art der Expansion aufweisen und somit als Polyglutaminerkrankungen klassifiziert werden. Neben Chorea Huntington sind verschiedene Formen der spinozerebralen Ataxie bekannt. Hierbei handelt es sich ebenfalls um neurodegenerative Erkrankungen, die im mittleren Lebensalter auftreten und durch Bewegungsstörungen, abnehmenden Orientierungssinn und Demenz gekennzeichnet sind. Allen Polyglutaminerkrankungen ist gemein, dass die expandierten Proteine in makro-

molekularen Ablagerungen aggregieren. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Aggregate einen hohen Anteil an β -Faltblattstrukturen und Eigenschaften von amyloiden Fibrillen besitzen [73,74]. Wie für die meisten Proteine, die zu Fibrillen umfalten, werden alternative Faltungswege angenommen, die das lösliche Protein in die amyloide Konformation umlagern. Eine durch die Sequenzerweiterung bedingte veränderte Konformation des löslichen Proteins könnte zur Selbstassemblierung zu oligomeren Spezies und folglich zur Fibrillenbildung führen [75]. Zudem deuten Untersuchungen von Fiumara *et al.* auf polyglutamininduzierte intermolekulare Wechselwirkungen hin, die in *coiled coil*-Konformationen resultieren und somit möglicherweise eine Zwischenstufe während der Umlagerung zur amyloiden Konformation darstellen [76].

1.4.2 Polyalaninexpansionen

Neben Amyloidosen, die durch Polyglutaminerweiterungen im betreffenden Protein verursacht werden, sind neun Krankheiten bekannt, die durch eine Expansion von Alaninsequenzen hervorgerufen werden. Auf DNA-Ebene sind diese Trinukleotiderweiterungen weitaus stabiler als DNA-Abschnitte, die für Polyglutaminsequenzen codieren, da die Alaninabschnitte durch heterogene Triplets codiert werden (GCG > GCC > GCA \gg GCT) [72].

Verglichen mit den Polyglutaminexpansionen sind die Sequenzerweiterungen von Alaninsegmenten relativ gering: Die längste Alaninexpansion von 33 Resten wurde im Transkriptionsfaktor PHOX2B gefunden [77]. Die Aggregatbildung der Proteine, die von einer Alaninexpansion betroffen sind, scheint ein allgemeines Charakteristikum der Sequenzerweiterung zu sein. Ob die Ablagerungen jedoch amyloider Natur sind, ist derzeit nicht hinreichend geklärt. Untersuchungen von Peptiden bestehend aus 13 Alaninen zeigten, dass die Alaninsequenz in der Lage ist, ausgehend von einer α -helikalen Struktur, zu einer β -Faltblattstruktur umzulagern. Lediglich eine Inkubation der Peptide bei 65 °C und 5 mg/ml war für die Konformationsänderung ausreichend und resultierte in fibrillären Aggregaten [78]. Ferner konnte eine Korrelation zwischen der Länge der Alaninsequenz und der Tendenz zur Aggregatbildung festgestellt werden.

Bei acht der neun krankheitsassoziierten Proteinen, die von einer Alaninexpansion betroffen sind, handelt es sich um Transkriptionsfaktoren. Eine Missfaltung dieser Proteine und der meist damit verbundene Funktionsverlust führen zu frühen embryonalen Entwicklungsstörungen. Eine Ausnahme bildet die Okulopharyngeale Muskeldystrophie (OPMD), eine Krankheit, deren Symptome erst im Alter von > 50 Jahren auftreten und an deren Pathogenese kein Transkriptionsfaktor, sondern das nukleäre Polyadenylat-Bindeprotein 1 (PABPN1) beteiligt ist. Die Entwicklungsstörungen können neben der

Alaninexpansion durch andere Faktoren ausgelöst werden. Darunter fallen *missense*-Mutationen [79], *frame shifts*, Deletionen [80] und Expansionen [81]. OPMD wird allein durch eine Erweiterung des Alaninsegmentes ausgelöst.

1.5 Die Okulopharyngeale Muskeldystrophie

Die Okulopharyngeale Muskeldystrophie (OPMD), eine Proteinmissfaltungskrankheit, die auf eine Trinukleotidexpansion zurückzuführen ist, wurde 1915 erstmalig von TAYLOR beschrieben [82]. Eine Erweiterung von (GCN)-Tripletts auf bis zu sieben zusätzliche Codons wurde auf dem Chromosomenabschnitt 14q11 in dem Gen identifiziert, welches das nukleäre Polyadenylat-Bindeprotein 1 (PABPN1) codiert [83]. Die Wildtypsequenz besitzt im 5'-Bereich zehn aufeinanderfolgende (GCN)-Trinukleotide, die direkt an das „Start-ATG“ im Exon 1 anschließen. Eine Erweiterung dieser Sequenz um zwei bis sieben (GCN)-Codons führt zu den typischen Symptomen der Krankheit [84]. Ein ungleiches *crossover* zwischen zwei fehlgepaarten Allelen wird heute als die Ursache von Triplettextensionen angenommen [85,86].

Bei OPMD-Patienten treten erste Symptome im Alter von 50–60 Jahren auf. Die Dystrophie beschränkt sich auf die Rachen- und Augenlidmuskulatur sowie die Muskeln der proximalen Extremitäten. Die Erschlaffung der Muskulatur führt zu herabhängenden Augenlidern (Ptosis) und Schluckbeschwerden (Dysphagie), die im Verlauf der Krankheit zu schwerer Unterernährung führen können [87,88]. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Länge der Expansion und dem Auftreten erster Symptome bzw. der Schwere des Krankheitsverlaufes konnte nicht festgestellt werden [89].

1980 beschrieben TOMÉ und FARDEAU tubuläre Ablagerungen in den Zellkernen der Muskelsynzytia von OPMD-Patienten (Abbildung 5) [90]. Heute ist bekannt, dass die fibrillären Aggregate vornehmlich aus expandiertem PABPN1 bestehen. Ferner wurden Komponenten des Ubiquitin-Proteasom-Systems, die Hitzeschockproteine HSP40 und HSP70 sowie Polyadenylat-RNA in den Einschlüssen identifiziert [91–94]. Ob die PABPN1-Aggregate aus amyloiden Fibrillen bestehen, ist bis heute noch nicht geklärt, ebenso wenig wie der genaue Mechanismus der Pathogenese. Im Abschnitt 1.7 werden mögliche Ursachen der Symptome von OPMD, wie sie derzeit in der Literatur diskutiert werden, vorgestellt.

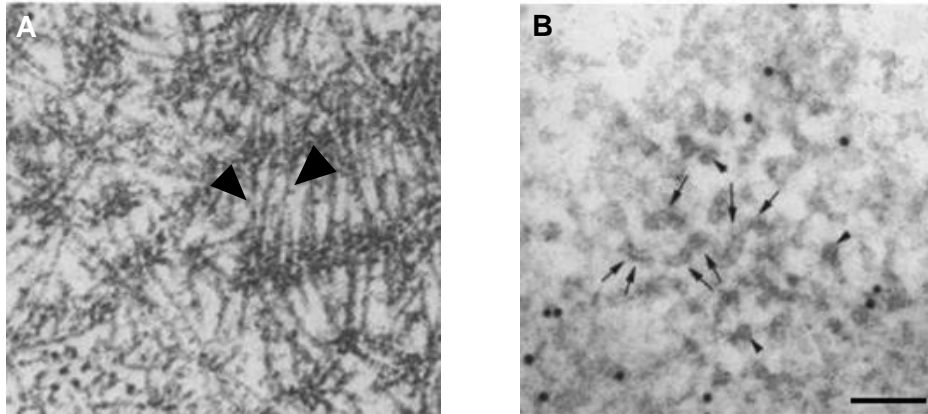


Abbildung 5. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von fibrillären Ablagerungen im Zellkern eines Muskelsynzytiums (71000-fach vergrößert) (A) und Immuno-Gold-markierte PABPN1-Ablagerungen in Mäusemuskelzellen (B). Balken entspricht 100 nm. Abbildungen entnommen aus Ref. [90] (A) bzw. Ref. [95] (B).

1.6 Das nukleäre Polyadenylat-Bindeprotein 1

Eine Triplettextension im Gen des nukleären Polyadenylat-Bindeproteins 1 (*PABPN1*) führt zur myopathischen Krankheit OPMD. Da PABPN1 eine zentrale Rolle bei der Entstehung der Muskeldystrophie spielt, wird das Protein im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

Die biologische Funktion von PABPN1 liegt in einer essenziellen Beteiligung bei der Prozessierung von pre-mRNA im Zellkern. Zusammen mit dem *cleavage and polyadenylation specificity factor* (CPSF) und der Polyadenylatpolymerase (PAP), stimuliert das nukleäre Protein die Synthese des Polyadenylat-Schwanzes an das 3'-Ende von pre-mRNA [96,97]. Ferner ist PABPN1 an der Kontrolle des Polymerisierungsprozesses beteiligt. Bei Menschen resultiert die Polyadenylierung in einer durchschnittlichen Länge des Poly(A)-Schwanzes von 200–250 Basen [98–101]. Ferner wird PABPN1 eine Beteiligung am nukleären Export von RNA zugeschrieben, da das Protein zwischen Nucleo- und Zytoplasma transloziert [102,103]. Zytoplasmatische Funktionen von PABPN1 werden kontrovers diskutiert [104]. PABPN1 wird in sogenannten *speckles* im Zellkern gefunden [105]. *Speckles* sind Bereiche im Zellkern, die neben PABPN1 unter anderem snRNPs und *splicing*-Faktoren enthalten [106].

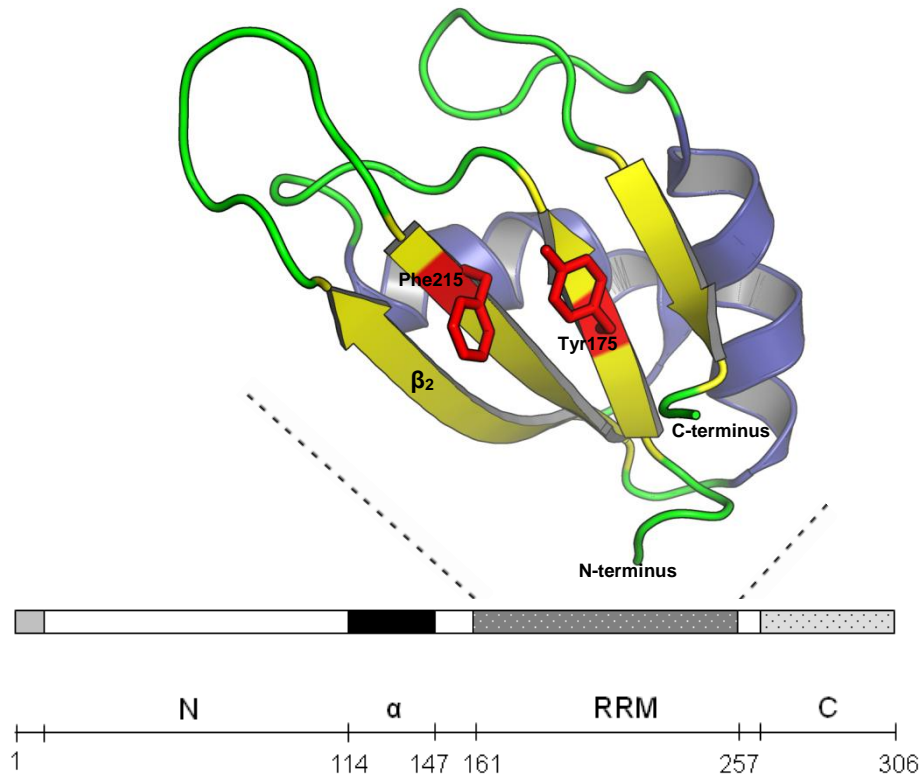


Abbildung 6. Schematische Darstellung von PABPN1 mit der Kristallstruktur der RRM-Domäne. Der hellgraue Balken stellt die N-terminale Oligoalaninsequenz, der darauf folgende weiße Balken das N-terminale Segment (N) von PABPN1 dar. Der schwarze Balken zeigt den α -helikalen Bereich (α), gefolgt von der RNA-Erkennungsdomäne (*RNA recognition motif*, RRM) und der C-terminalen Region von PABPN1 (C) in gepunkteten dunkel-, bzw. hellgrauen Balken. Die Kristallstruktur zeigt die RRM-Domäne mit den Aminosäuren, die an der RNA-Bindung beteiligt sind (rot); der β -Strang 2 ist mit β_2 gekennzeichnet (pdb: 3B4D).

Das aus 306 Aminosäuren bestehende Protein kann in unterschiedliche Regionen eingeteilt werden, die folgende strukturelle Besonderheiten besitzen: Von Met161 bis Thr257 erstreckt sich eine zentrale RNA-Bindedomäne (*RNA recognition motif*, RRM) [107]. Die Struktur und Funktion dieser Domäne sind gut charakterisiert. Die im Jahr 2008 von Ge *et al.* veröffentlichte Kristallstruktur zeigte, dass die RNA-Bindedomäne aus zwei α -Helices und vier β -Strängen besteht (Abbildung 6) [108]. Zwei aromatische Aminosäurereste (Tyr175 und Phe215), die an der Bindung von RNA beteiligt sind, bewirken die Substratspezifität der Domäne. Ferner sind die sich C-terminal an die Domäne anschließenden 30 Aminosäuren an der RNA-Bindung beteiligt und führen zu einer Bindungsaffinität von ca. 8 nM. PABPN1 bindet bevorzugt Poly(A)-RNA, kann aber auch Poly(G)-RNA binden, wenn auch mit einer ca. zehnfach geringeren Affinität [96]. Die Bindung von RNA durch die C-terminale Region ist unspezifisch und erfolgt wahrscheinlich über elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem negativen RNA-Phosphatrückgrad und der basischen C-terminalen Region von PABPN1 [107]. Der basische Charakter wird durch 13 Argininreste innerhalb der C-terminalen 49 Aminosäuren hervorgerufen. Die 13 Guanidiniumgruppen liegen

asymmetrisch dimethyliert vor. Die posttranskriptionelle Modifikation hat keinen Einfluss auf die RNA-Bindung, scheint aber eine Rolle bei der nukleären Lokalisation von PABPN1 zu spielen [109].

Die der RRM-Domäne vorausgehenden 160 Reste bilden die N-terminale Region von PABPN1. Diese Region liegt intrinsisch ungefaltet vor [110]. Sie ist durch einen geringen Anteil an Sekundärstrukturelementen gekennzeichnet und besitzt keine Tertiärkontakte. Strukturberechnungen ergaben für die Aminosäuren 119–147 eine α -helikale Konformation [111]. Über dieses α -helikale Segment der N-terminalen Region interagiert PABPN1 mit der Poly(A)-Polymerase [111]. Direkt an das Startmethionin anschließend, befindet sich eine natürliche Oligoalaninsequenz. Das Segment besteht aus zehn konsekutiven Alaninresten. Wie in Abschnitt 1.5 beschrieben, führt eine Erweiterung dieser Sequenz um lediglich zwei zusätzliche Alanine zu OPMD.

1.7 Derzeitiger Stand der Forschung – die Rolle von PABPN1 bei der Krankheit OPMD

Patienten, die an OPMD leiden, weisen eine Expansion der Alaninsequenz im Protein PABPN1 auf. Die Verlängerung des Alaninsegmentes führt intranukleär zur fibrillären Aggregation des Proteins [91]. Die Aggregatbildung ist mit einer Muskelschwächung in OPMD-Patienten verbunden. In den letzten Jahren wurden unterschiedliche Modellsysteme (Tier- und Zellkulturmodelle) entwickelt, um die molekularen Prozesse, die der Myopathie unterliegen, zu verstehen. Dennoch ist der Zusammenhang zwischen der Expansion der Alaninsequenz in PABPN1, der Proteinaggregation und der Symptomatik von OPMD nicht aufgeklärt. Im folgenden Abschnitt wird Literatur vorgestellt, die die Rolle von PABPN1 in der Muskeldystrophie nach heutigem Kenntnisstand beschreibt.

Allgemein kann eine Aggregation von PABPN1 bei Überexpression in Zellmodellsystemen beobachtet werden: Die transiente Expression von expandiertem PABPN1 in der Fibroblastenzelllinie COS-7 führte zur Ablagerung des Proteins und zum Absterben der Zellen [112]. Auch bei Expression der Deletionsvariante konnte eine Aggregation des Proteins festgestellt werden [95,113]. Das Alaninsegment bzw. die Expansion der Oligoalaninsequenz scheinen keinen Einfluss auf das Aggregationsverhalten von PABPN1 zu haben. Über die Natur dieser Ablagerungen (amorph oder amyloid) ist nicht viel bekannt: Untersuchungen von Fan *et al.* deuteten auf eine erhöhte Resistenz der Aggregate von expandiertem PABPN1 gegenüber der Behandlung mit 1 M KCl an. Ablagerungen des Wildtypproteins dagegen konnten durch KCl aus fixierten COS-7-Zellen gewaschen werden

[114]. Dementgegen beobachteten Tavanez *et al*, dass ebenfalls Aggregate des Wildtypproteins KCl-insensitive Ablagerungen in HeLa-Zellen bilden [95].

In einem *Drosophila melanogaster*-Modell wurden bei Expression von PABPN1-Varianten Ablagerungen in den Zellkernen der Flugmuskulatur mittels Immunfluoreszenzmikroskopie detektiert. Die Bildung der nukleären Einschlüsse konnte ebenfalls für Δ Ala-PABPN1 festgestellt werden, auch wenn diese weniger „dicht gepackt“ erschienen als Aggregate, die bei Expression von (+7)Ala-PABPN1 beobachtet wurden [115]. Die gleichen Beobachtungen wurden in einem anderen Modellorganismus, dem Nematoden *Caenorhabditis elegans*, gemacht. Auch hier führte die Expression von PABPN1 zu einer Akkumulation des Proteins in Muskelnuklei. Lediglich für expandiertes PABPN1 konnte eine „weniger diffuse“ Verteilung festgestellt werden [116]. Beiden Tiermodellen ist jedoch gemein, dass nur die Organismen, die das expandierte Protein exprimierten, einen phänotypischen Defekt aufwiesen (abnormale Flügelpositionen (*D. melanogaster*), bzw. einen Defekt in der motorischen Fortbewegung (*C. elegans*)) [115,116]. Die Assemblierung des Proteins zu intranukleären Aggregaten scheint demnach nicht auf die Expansion des Alaninsegmentes zurückzuführen zu sein, die Muskeldystrophie hingegen sehr wohl.

Bei Untersuchungen zum Assemblierungsverhalten von PABPN1-Fragmenten in der Zervixkarzinomzelllinie HeLa konnte gezeigt werden, dass die C-terminale Region die Aggregation von PABPN1 entscheidend beeinflusst [95]. Auch *in vitro* konnten amorphe Aggregationsprozesse auf den C-terminalen Bereich des Proteins zurückgeführt werden [117]. PABPN1 zeigt demnach von Natur aus eine hohe Tendenz zur Selbstassemblierung. Diese Neigung wurde mithilfe des *yeast two hybrid*-Systems näher untersucht. Zwei potenzielle Oligomerisierungsdomänen wurden in der C-terminalen Region des Proteins identifiziert. Die Bereiche umfassen die Aminosäuren 155–294 und 264–306, zwei Regionen, die essenziell für die Bindung von RNA sind. Dass diese Regionen zu einer funktionellen Assemblierung des Proteins zu sphärischen Partikeln führen, zeigten elektronenmikroskopische Aufnahmen von PABPN1 bei Bindung von Poly(A)-RNA [118]. Bereits die Deletion der letzten sechs Aminosäuren in einer der Regionen verhinderte die nukleäre Aggregation des Proteins in COS-7-Zellen [112]. In der Literatur wird eine zunächst amorphe Zusammenlagerung (C-terminal vermittelt) und eine sich daran anschließende Umlagerung zur amyloiden Fibrille (alaninabhängig) diskutiert [117].

Bis heute sind nur wenige biochemische und keine strukturellen Informationen zu den Proteinablagerungen vorhanden. Erste Versuche, die PABPN1-Aggregate näher zu charakterisieren, erfolgten durch Till Scheuermann und Grit Lodderstedt. Die Untersuchungen fanden *in vitro* anhand der isolierten N-terminalen Region von PABPN1 (Aminosäuren 1–125) statt. Die Untersuchungen bestätigten eine alaninabhängige

Umlagerung. Die Fibrillenbildung war dabei von der Anwesenheit der Alaninsequenz abhängig. In Abwesenheit des Alaninsegmentes konnte keine Fibrillenbildung beobachtet werden. Die Charakterisierung der Aggregate zeigte, dass es sich dabei um amyloide Fibrillen handelte [110].

1.8 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Dissertation war es einen Beitrag zum Verständnis der molekularen Prozesse während der Aggregatbildung von PABPN1 in Muskelsynzytia von OPMD-Patienten zu liefern. In Anlehnung an die Untersuchungen zur Fibrillenbildung der N-terminalen Region von PABPN1, sollte das Gesamtlängen-Protein hinsichtlich des Fibrillierungsverhaltens untersucht werden. Folgende Fragestellungen standen dabei im Mittelpunkt der Arbeit:

1. **Welchen Einfluss hat die Oligoalaninsequenz von PABPN1 auf die Umlagerung des Proteins zur Fibrille?**
2. **Zeigen die Fibrillen des Gesamtlängen-Proteins vergleichbare Eigenschaften mit denen der N-terminalen Region?**

Für die Analysen sollten drei PABPN1-Varianten untersucht werden, die sich in der Länge des Alaninsegmentes unterschieden (Abbildung 7): Das Wildtypprotein mit zehn Alaninresten (WT-PABPN1), eine krankheitsassoziierte, expandierte Variante mit sieben zusätzlichen Alaninen ((+7)Ala-PABPN1) und eine Deletionsvariante ohne N-terminale Alaninsequenz (Δ Ala-PABPN1). Zunächst sollte das lösliche Protein biophysikalisch charakterisiert, anschließend die Fibrillenbildung untersucht und der fibrilläre Zustand analysiert werden.

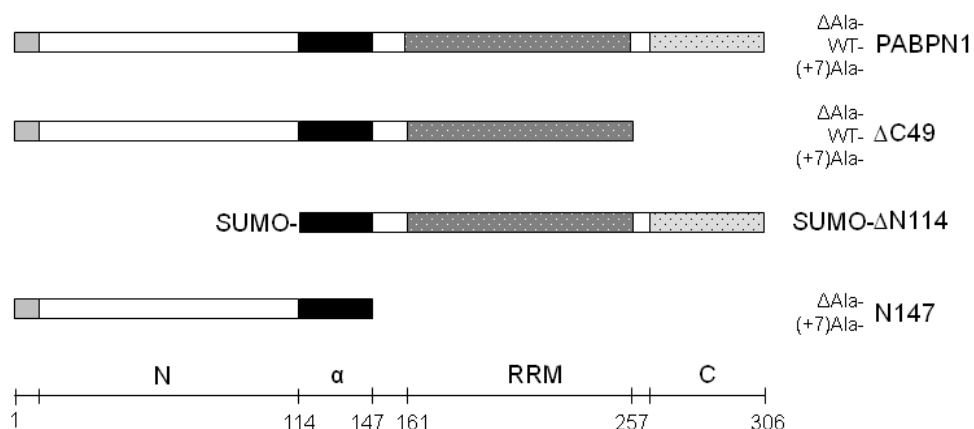


Abbildung 7. Schematische Darstellung von Gesamtlängen-PABPN1 und verschiedenen PABPN1-Fragmenten. Der hellgraue Balken stellt die N-terminale Oligoalaninsequenz, der darauf folgende weiße Balken das N-terminale Segment (N) von PABPN1 dar. Der schwarze Balken zeigt den α -helikalen Bereich (α), gefolgt von der RNA-Erkennungsdomäne (*RNA recognition motif*, RRM) und dem C-terminalen Bereich von PABPN1 (C) in gepunkteten dunkel-, bzw. hellgrauen Balken.

Da sich das Fibrillierungsverhalten des Gesamtlängen-Proteins und das der N-terminalen Region unerwarteterweise voneinander unterscheiden, ergab sich eine weitere Fragestellung:

3. Welche Regionen in PABPN1 sind für die Umlagerung des Gesamtlängen-Proteins zur fibrillären Struktur verantwortlich?

Hierfür sollten unterschiedliche N- und C-terminal-verkürzte PABPN1-Fragmente hinsichtlich der Fähigkeit zur Fibrillenbildung analysiert werden. In Abbildung 7 sind die Proteinfragmente schematisch dargestellt. Für diese Varianten sollte sowohl der lösliche als auch der fibrilläre Zustand analysiert werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

In diesem Abschnitt sind nur die Materialien ausgewiesen, die nicht im Methodenteil benannt wurden.

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien stammten von den Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt), Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe) sowie Sigma-Aldrich Chemie GmbH. Zur Herstellung von Pufferlösungen wurde doppelt destilliertes Wasser (ddH₂O) verwendet.

2.1.2 Standards

Tabelle 1: Protein- und DNA-Standards.

Standards	Hersteller
<i>peqGOLD</i> Proteinmarker I	PeqLab
<i>peqGOLD</i> Proteinmarker II	PeqLab
<i>peqGOLD</i> Proteinmarker IV	PeqLab
<i>GeneRuler</i> 1 kb DNA-ladder	Fermentas
<i>GeneRuler</i> 100 bp Plus DNA-ladder	Fermentas
Ferritin	Boehringer Mannheim
<i>Gel Filtration Calibration Kit LMW</i> - Ovalbumin - Ribonuklease A - Dextranblau	GE Healthcare
Aldolase	Boehringer Mannheim

2.1.3 Säulen und Säulenmatrices

Tabelle 2: Säulen und Matrices zur Proteinanalyse und -reinigung.

Säulen und Matrices	Hersteller
<i>Jupiter 5U C18 300 Å (250 x 4,6 mm)</i>	Phenomenex
<i>Jupiter 5U C5 300 Å (250 x 4,6 mm)</i>	Phenomenex
<i>Acclaim PepMap C18 100 Å (75 µm x 150 mm)</i>	Dionex
<i>Blue Sepharose Fast Flow</i> ¹	GE Healthcare
<i>Macro-Prep High Q Support</i> ²	Bio-Rad
<i>Source 15S</i> ²	GE Healthcare
<i>Superdex S75</i> ³ und <i>S200</i> ⁴	GE Healthcare
<i>HisTrap HP 5 ml</i>	GE Healthcare
<i>Hi Trap Q XL 5 ml</i>	GE Healthcare
¹ 250 ml gepackt in Leersäule <i>XK 50</i>	GE Healthcare
² 20 ml gepackt in Leersäule <i>XK 16/20</i>	GE Healthcare
³ 120 ml in <i>XK 16</i>	GE Healthcare
⁴ 25 ml gepackt in Leersäule <i>Tricorn 10/300 GL</i>	GE Healthcare

2.1.4 *E. coli*-Stämme

Für die Amplifizierung von Plasmid-DNA wurden die *E. coli*-Stämme *OneShot TOP10* (Invitrogen) bzw. *XL1-Blue* (Stratagene) verwendet. Die Zellen lagen sowohl elektro- als auch chemokompetent vor. Die rekombinante Genexpression wurde mit dem *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) (Novagen) durchgeführt. Dieser war zusätzlich mit dem Plasmid pUBS520 transformiert [119]. Die Expression von SUMO-Fusionskonstrukten erfolgte in dem Stamm *E. coli* BL21 (DE3) *CodonPlus-RP* (Stratagene). Die zusätzlichen Plasmide in diesen Stämmen codieren für seltene tRNAs, um Probleme des *codon usage* zu vermeiden. Die genotypischen Merkmale der einzelnen Stämme sind den Produktbeschreibungen und Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3: Kurzbeschreibung der verwendeten *E. coli*-Stämme.

<i>E. coli</i> -Stamm	Antibiotikumresistenz	zusätzliche tRNA-Gene
<i>OneShot TOP10</i>	Streptomycin	
<i>XL1-Blue</i>	Tetrazyclin	
BL21 (DE3), pUBS520	Kanamycin	<i>dnaY</i> (AGA, AGG)
BL21 (DE3) <i>CodonPlus-RP</i>	Chloramphenicol	<i>argU</i> (AGA, AGG); <i>proL</i> (CCC)

2.1.5 Geräte

Tabelle 4: Geräte, die in dieser Arbeit Anwendung fanden.

Gerät	Hersteller
<i>Avanti J-20</i> und <i>J-25</i> Zentrifuge	Beckman Coulter
<i>Centrifuge 5702R</i> Greinerzentrifuge	Eppendorf
<i>Electroporator 2510</i>	Eppendorf
<i>PCR-Mastercycler Gradient</i>	Eppendorf
HPLC <i>Gina 50</i>	Gyncotek
pH-Meter <i>pH 526</i>	WTW
Elektrophoreseeinheit EPS	Pharmacia Biotech
Elektrophoreselaufkammern	Hofer und PeqLab
Fermentationsreaktor (15 l) <i>Biostat C-DCU3</i>	B. Braun Biotech International

2.1.6 Weitere Materialien

Tabelle 5. Weitere Materialien.

Material	Hersteller
Dialyseschläuche (MWCO 3500)	Spectrum-Laboratories
Heparin-Natriumsalz (8000-25000 g/mol)	AppliChem
tRNA	Roche
rRNA (16S-, 23S- rRNA aus <i>E. coli</i>)	Roche
L-Tryptophan	Fluka

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Minipräparation nach BIRNBOIM und DOLY, 1979 [120]

Der Zellaufschluss beruhte auf der alkalischen Lyse in Gegenwart von SDS und diente der Isolierung rekombinanter Plasmide zur anschließenden Untersuchung mittels Restriktionsenzymen. Zunächst wurden die *E. coli*-Zellen einer 5 ml-Übernachtskultur durch Zentrifugation 10 min bei 4000 x g sedimentiert. Die Resuspendierung des Zellpellets erfolgte in 200 µl Lösung I. Für die Zellyse wurden 400 µl Lösung II zur Suspension gegeben, vorsichtig invertiert und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Zelllysat durch Zugabe von 300 µl Lösung III neutralisiert. Durch 15-minütige Zentrifugation bei 12000 x g wurden denaturierte Proteine und Zelltrümmer sedimentiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und im Anschluss die Plasmid-DNA durch Ethanol-fällung isoliert (siehe 2.2.1.3).

Tabelle 6: Pufferlösungen zur Plasmidpräparation nach BIRNBOIM und DOLY [120].

Lösung I	Lösung II	Lösung III
25 mM Tris/HCl pH 7,4 10 mM EDTA 15% (w/v) Saccharose 100 µg/ml RNase A	200 mM NaOH 1% (w/v) SDS	3 M Na-Acetat pH 4,7

Minipräparation mit dem peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I (PeqLab)

Das Kit wurde verwendet um qualitativ hochwertige Plasmid-DNA für Sequenzierungs- oder PCR-Reaktionen zu erhalten. Die Präparation erfolgte aus einer 10 ml-Übernachtskultur und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Abweichend davon erfolgte die Elution der Plasmid-DNA mit 50 µl ddH₂O.

2.2.1.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Diese Methode diente der Entfernung von Proteinkontaminationen aus Nucleinsäurelösungen. Hierfür wurde die Probe mit 1 Vol. Rotiphenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 (v/v)) versetzt. Anschließend wurde intensiv gemischt und 5 min bei 12000 x g zentrifugiert, um eine Phasentrennung zu beschleunigen. Im Anschluss wurde die wässrige Phase abgenommen. Diese, die DNA enthaltende Fraktion wurde nochmals mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 (v/v)) extrahiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde die DNA durch eine Ethanol-fällung präzipitiert.

2.2.1.3 Fällung von Nucleinsäuren durch Ethanol

Die Isolation von Nucleinsäuren aus wässrigen Lösungen erfolgte durch Ethanol-fällung [121]. Hierfür wurde die Probenlösung mit 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat und 2,5 Vol. 96% (v/v) eiskaltem Ethanol versetzt. Nach kurzer Durchmischung der Lösung wurde diese für 10 min bei RT (Oligo-(A)-RNA) bzw. 2 h bei -20 °C (Plasmid-DNA) inkubiert. Die gefällten Nucleinsäuren wurden anschließend durch 30-minütige Zentrifugation bei 12000 x g sedimentiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 200 µl eiskaltem 80% (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet bei 50 °C 10 min getrocknet.

2.2.1.4 *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Polymerase Chain Reaction (PCR) zur Amplifizierung von DNA-Sequenzen [122]

Die PCR wurde eingesetzt, um die unterschiedlichen DNA-Fragmente in den Vektor pETSUMOadapt zu klonieren. Zur Amplifizierung der codierenden Sequenz aus den Ausgangsvektoren wurden die in Tabelle 7 gezeigten Primer verwendet. Die Primer wiesen zum einen eine zur Gensequenz komplementäre Region (unterstrichen) und zum anderen einen Überhang zur Generierung einer Erkennungssequenz für die Restriktionsnuklease *BsaI* auf (blau). Für die PCR wurde die *Pwo*-DNA-Polymerase (PeqLab) verwendet. Es wurde ein Reaktionsmaßstab von 100 µl gewählt und die Reaktion entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Die *annealing*-Temperaturen sind Tabelle 7 zu entnehmen.

„Kolonie-PCR“

Eine „Kolonie-PCR“ wurde durchgeführt, um schnell eine große Anzahl Kolonien auf das Vorhandensein der relevanten Plasmid-DNA zu untersuchen. Die Kolonien wurden dabei direkt von der Agarplatte in 60 µl steriles ddH₂O überführt und 10 min bei 95 °C lysiert. Anschließend wurden 4 µl des Zelllysates in 16 µl vorgelegten Reaktionsansatz pipettiert. Es wurden die gleichen Primer verwendet wie zur Gewinnung des entsprechenden PABPN1-Fragmentes. Die Reaktion wurde durch die *Pwo*-DNA-Polymerase (PeqLab) katalysiert, die Reaktionsansätze nach Herstellerangaben pipettiert.

Ortsspezifische Mutagenese

Diese Methode diente der Einführung von Punktmutationen (z.B. Stopp-Codon) oder der Deletion kürzerer DNA-Sequenzen im Ausgangsplasmid. Zur Durchführung wurde das *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies) verwendet. Die Methode beruht auf der Amplifizierung der gesamten Template-DNA unter Verwendung von Mutagenese-Primern. Die Primer sind komplementär zum Mutterstrang, beinhalten jedoch die gewünschte Basenmutation. Die Sequenzen der eingesetzten Primer sind Tabelle 7 zu entnehmen. Durch eine PCR wurde, unter Verwendung einer hochprozessiven DNA-Polymerase (*Pfu Ultra*), die gesamte Plasmid-DNA amplifiziert. Die Durchführung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben.

2.2.1.5 Zwischenklonierung in den Vektor *pCR-Blunt II-TOPO*

Zur Herstellung der Δ C49-Varianten wurden Primer verwendet, die mit neun der zehn GCA-Triplets der cDNA-Sequenz von PABPN1 hybridisieren. Somit entstanden PCR-Produkte, die sich in der Anzahl der GCA-Codons unterscheiden. Um das *amplikon* mit der (GCA)₁₀-Sequenz zu isolieren, wurde deshalb in den *pCR-Blunt II-TOPO*-Vektor (Invitrogen) kloniert. Die Klonierung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben. Die erhaltenen Klone wurden auf das Vorhandensein der (GCA)₁₀-DNA-Sequenz mittels „Kolonie-PCR“ analysiert (siehe 2.2.1.4) und konnten für weitere Klonierungsschritte herangezogen werden.

Tabelle 7: Primer-Sequenzen zur Herstellung der verschiedenen PABPN1-Fragmente. Hervorgehoben ist die zum Template komplementäre Basensequenz (unterstrichen), die eingeführte Restriktionssequenz für die Nuklease *Bsal* zur Klonierung in den pETSUMOadapt-Vektor (blau); das inserierte Stopp-Codon (rot) und die Position der im Template deletierten (GCA)₁₀-Sequenz (^). Schmelztemperatur der Primer: T_m.

Ausgangsplasmid	Primer-Name und -Sequenzen	T _m	Annealing-Temperatur	Zielkonstrukt in pETSUMOadapt
ΔC49 in pUK	<i>ΔC49 Forward</i> 5' -AGACGT <u>GGTCTC</u> ATGGTATGGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA-3'	79,9 °C	65 °C	WT-ΔC49
	<i>ΔC49 Reverse</i> 5' -TTGTTA <u>GGTCTC</u> GGATCCTTATGTTGTGCTGATGCCTGGTCTGTTGGT-3'	75,4 °C		
(+)Ala-PABPN1 in pET11a	<i>ΔC49 Forward neu</i> 5' -GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT <u>GGTCTC</u> ATGGTATGGC-3'	69,4 °C	65 °C	(+)Ala-ΔC49
	<i>ΔC49 Reverse</i> 5' -TTGTTA <u>GGTCTC</u> GGATCCTTATGTTGTGCTGATGCCTGGTCTGTTGGT-3'	75,4 °C		
WT-ΔC49 in pETSUMOadapt	<i>Forward</i> 5' -CAGATTGGTGGT^ATGGGAGCAGCAGGAGGA-3'	70,9 °C	65 °C	ΔAla-ΔC49
	<i>Reverse</i> 5' -TCCTCCTGCTGCTCCCAT^ACCACCAATCTG-3'	70,9 °C		
ΔAla-ΔC49 und (+)Ala-ΔC49 in pETSUMOadapt	<i>N-147 F</i> 5' -CGAGGTAGAGAAGCAG <u>TAG</u> ATGAATATGAGTCCAC-3'	69,5 °C	55°C	ΔAla-N147 und (+)Ala-N147
	<i>N-147 R</i> 5' -GTGGACTCATATTCAT <u>CTA</u> CTGCTTCTCTACCTCG-3'	69,5 °C		

2.2.1.6 Hydrolyse durch spezifische Restriktionsendonukleasen

Für die Restriktionen von Plasmid-DNA oder PCR-Produkten wurden *FastDigest*-Restriktionsenzyme (Fermentas) verwendet. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze folgte den Herstellerangaben. Um eine vollständige Restriktion zu gewährleisten, wurde die Inkubationszeit auf 30 min verlängert.

2.2.1.7 Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren

Um eine *Re-ligation* eines linearisierten Zielvektors zu vermeiden, wurden die 5'- und 3'-Phosphatgruppen der DNA hydrolysiert. Die Reaktion wurde durch eine thermosensitive alkalische Phosphatase katalysiert (*FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase* (1 U/μl), Fermentas). Die Reaktion wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.1.8 Ligation

Für die Insertion eines DNA-Fragmentes in einen linearisierten Vektor wurde die T4-DNA-Ligase (5 U/μl) von Fermentas verwendet. Die Ligase katalysiert die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einem 5'-Phosphatrest und einer 3'-Hydroxylgruppe doppelsträngiger DNA. Der *ligation*-Ansatz wurde entsprechend den Herstellerangaben pipettiert. Das zu inserierende DNA-Fragment wurde dabei im fünffach molaren Überschuss gegenüber dem linearisierten Vektor eingesetzt. Die *ligation* erfolgte bei 16 °C über Nacht.

2.2.1.9 Agarosegel-Elektrophorese

Diese Methode diente der Auftrennung und Identifizierung von DNA-Fragmenten. Die Fragmente werden dabei entsprechend ihrer Ladung und damit Größe in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Es wurden 1–2% (w/v) Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer durch Erwärmen gelöst und anschließend in die Gelkammer gegossen. Die Proben wurden mit DNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen überführt. Die elektrophoretische Trennung erfolgte innerhalb 1 h in 1x TAE-Puffer durch Anlegen einer Spannung von 90 V. Die DNA-Fragmente wurden durch eine 15-minütige Inkubation des Agarosegels in einer Ethidiumbromidlösung (0,5 μg/ml) und anschließender Anregung mit UV-Licht sichtbar gemacht.

Tabelle 8: Zusammensetzung des TAE- und DNA-Probenpuffers.

TAE-Puffer (50x)	DNA-Probenpuffer (5x)
2 M Tris/HCl pH 8.5	10 mM Tris/HCl
1 M Essigsäure	5 mM Na-EDTA
100 mM Na-EDTA	50 % (w/v) Sucrose
	5 % (v/v) Glycerin
	0,25 % (w/v) Bromphenolblau

2.2.1.10 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte durch die Firma *Eurofins MWG Operon*. Hierfür wurde 1 µg gereinigte Plasmid-DNA versendet. Als Primer wurden *T7* und *T7term* zur Sequenzierung von pET-Vektoren und *M13 uni (-21)* zur Sequenzierung von *pCR-Blunt II-TOPO*-Vektoren eingesetzt. Die Datenauswertung erfolgte mit dem Programm *Vector NTI Advance 11* (Invitrogen).

2.2.1.11 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand der Absorption ultravioletten Lichtes der Wellenlänge 260 nm. Für doppelsträngige DNA entspricht hierbei eine Absorption von 1 einer DNA-Konzentration von 50 ng/µl. Zudem kann die Nukleinsäurelösung auf Kontaminationen mit Proteinen (A_{260}/A_{280}) und Phenol (A_{260}/A_{230}) analysiert werden. Für reine Nukleinsäure-Lösungen betragen diese Quotienten 1,8–2.

2.2.1.12 5'-Markierung von RNA mit [γ - 32 P]-ATP

Ausgangsmaterial war ein RNA-Oligonukleotid bestehend aus 14 Adenylatresten (Oligo-(A)-RNA), das von Uwe Kühn (AG Wahle, MLU Halle) zur Verfügung gestellt wurde. Grundlage für die Markierung der RNA war eine Polynukleotidkinase-(PNK)-Reaktion, bei der das radioaktive γ -Phosphat des [γ - 32 P]-ATP auf die Hydroxylgruppe am 5'-Ende des Oligonukleotides übertragen wurde. Die PNK-Reaktion erfolgte in einem 30 µl-Maßstab bei 37 °C für 1,5 h (Tabelle 9).

Im Anschluss wurde die RNA mithilfe einer Ethanol-fällung präzipitiert, wobei Mononukleotide in Lösung blieben. Die RNA wurde in 50 µl 10 mM HEPES, 10 mM KCl, pH 7 resuspendiert. Die Quantifizierung der markierten RNA erfolgte durch die DEAE-Methode (siehe 2.2.1.13).

Tabelle 9: Zusammensetzung des PNK-Reaktionsansatzes.

PNK-Reaktionsansatz (30 µl)
30 pmol A14-RNA
3 µl 10x PNK-Puffer
5-20 µCi [γ - ³² P]-ATP (5000 Ci/nmol)
10 U T4-PNK (Fermentas)
ad 30 µl nukleasefreies ddH ₂ O

2.2.1.13 „DEAE-Methode“ zur Quantifizierung radioaktiver Markierungen

Grundlage dieser Methode ist die Wechselwirkung von Nukleinsäuren mit dem auf Zellulose gekoppelten basischen Anionentauscher Diethylaminoethyl (DEAE). Das DEAE-Papier bindet Oligo- und Polynukleotide, Mononukleotide werden zurückgehalten [123]. Zunächst wurde das DEAE-Papier mit 10 mM Natriumdiphosphat equilibriert, anschließend mit Ethanol gewaschen und dann getrocknet. Zur Quantifizierung der markierten RNA wurden jeweils 10 µl einer 1:50 verdünnten Probe nach der PNK-Reaktion und nach Ethanolfällung auf das DEAE-Papier aufgetragen. Anschließend wurde das Papier mehrmals mit DE 81-Puffer gewaschen [124]. Schließlich wurde der Streifen in Szintillationsröhrchen überführt und mit 2 ml einer Szintillationsflüssigkeit (*LumasafePlus*, Perkin Elmer) versetzt. Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte in einem Szintillationszähler (*TRI-CARB 2100TR*, Packard).

Tabelle 10: Bestandteile des DE 81-Puffers nach ROWEN und KORNBERG [124].

DE 81-Puffer
0,3 M Ammoniumformiat pH 7,8
10 mM Natriumdiphosphat
0,1% (w/v) SDS

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

Alle in diesem Abschnitt benannten Medien oder Puffer wurden sterilfiltriert (Porengröße 0,22 µm) oder im Autoklaven 20 min bei 121 °C autoklaviert. Des Weiteren wurden Antibiotika verwendet, um eine Positivselektion auf die gewünschten Zellklone zu erreichen. Die Endkonzentration der Antibiotika Kanamycin und Chloramphenicol betrug 50 µg/ml und für Ampicillin und Karbenicillin 100 µg/ml. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in LB-Medium, bei 120 rpm und 37 °C.

Tabelle 11: Zusammensetzung des LB-Mediums.

LB-Medium
1% (w/v) Trypton
0,5% (w/v) Hefeextrakt
0,5% (w/v) NaCl

2.2.2.1 Transformation von Plasmid-DNA in *Escherichia coli*

Je nach Zielstellung erfolgte die Transformation in unterschiedliche *E. coli*-Stämme. Zur Propagierung von Plasmid-DNA wurden die *E. coli*-Stämme *XL1-Blue* (Stratagene) und *OneShot TOP10* (Invitrogen) verwendet, für die rekombinante Genexpression BL21(DE3)-Stämme (Novagen und Stratagene).

Transformation durch Elektroporation

Bei dieser Methode wurden 40 µl elektrokompetente Zellen mit 20–100 ng Plasmid-DNA versetzt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (PeqLab) überführt. Die Transformation erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 2,5 kV. Im Anschluss wurde die Zellsuspension in 1 ml auf 37 °C erwärmtes SOC-Medium überführt und 30 min bei 37 °C kultiviert.

Transformation durch Hitzeschock

Hierfür wurden 40 µl chemokompetente Zellen mit 20–100 ng Plasmid-DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert, anschließend 45 s einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt und erneut 2 min auf Eis inkubiert. Nach erfolgter Transformation wurde zur Zellsuspension 1 ml auf 37 °C vorgewärmtes SOC-Medium gegeben und 30 min bei 37 °C kultiviert.

Tabelle 12: Zusammensetzung von SOB- und SOC-Medium.

SOB-Medium	SOC-Medium
2% (w/v) Trypton	SOB-Medium
0,5% (w/v) Hefeextrakt	1/100 Vol. 1 M MgSO ₄
10 mM NaCl	1/100 Vol. 40% (w/v) D-Glucose
	2,5 mM KCl

2.2.2.2 Rekombinante Genexpression

Die rekombinante Genexpression wurde für die Geamlängen-PABPN1-Varianten im *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) pUBS520 durchgeführt [119]. Die Expression der SUMO-Fusionsproteine erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3) *CodonPlus-RP* (Novagene). Um die Bildung von *inclusion bodies* zu unterbinden, wurde die Temperatur während der dreistündigen Expression auf 30 °C reduziert. Die Induktion der Genexpression erfolgte bei einer Endkonzentration von 1 mM IPTG.

Expression im Schüttelkolben

Für die Expression in Schüttelkolben wurde eine 200 ml-Übernachtskultur mit einer Einzelkolonie angeimpft und 14–16 h inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde die Hauptkultur im Verhältnis 1:100 (v/v) angeimpft. Für die Hauptkultur wurden 5-Liter-Schüttelkolben verwendet, die 1,5 l LB-Medium enthielten. Während der Wachstumsphase wurde die Zelldichte anhand der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600 nm}) am Photometer überprüft. Bei Erreichen einer OD_{600 nm} zwischen 0,5 und 0,8 erfolgte die Induktion der Genexpression durch 1 mM IPTG.

Fed-Batch-Verfahren

Um höhere Zelldichten pro Medienvolumen zu erreichen, erfolgte die Kultivierung der Zellen und die anschließende Expression im *fed-batch*-Verfahren. Zunächst wurde hierfür eine 20 ml-Übernachtskultur mit einer Einzelkolonie versetzt und 14–16 h lang inkubiert. Mit der Übernachtskultur wurden zwei 200 ml-Vorkulturen im Verhältnis 1:100 (v/v) angeimpft und 8 h kultiviert. Nach Inkubation wurden die Zellen durch 15-minütige Zentrifugation bei 4000 x g sedimentiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 50 ml sterilem Wasser resuspendiert und diente als Inokulum für die Fermentation.

Für die *fed-batch*-Kultivierung wurden 300 g Hefeextrakt, 3 g Ammoniumchlorid und 1 ml *antifoam* in 5 l ddH₂O gelöst und anschließend im Fermenter 20 min bei 121 °C sterilisiert. Vor dem Start der Fermentation wurde dieses Medium steril mit 250 ml 12% (w/v)

D-Glucose-Lösung, 250 ml 1,6% (w/v) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -Lösung und 500 ml 13,2% (w/v) K_2HPO_4 -Lösung komplettiert. Separat wurden 2 l einer *feeding*-Lösung hergestellt, die 600 g Hefeextrakt und 250 g D-Glucose enthielt (beide Komponenten wurden getrennt autoklaviert und im Anschluss steril vereinigt). Während der Kultivierung wurde der pH-Wert mithilfe 20% (w/v) Phosphorsäure und 10% (w/v) KOH-Lösung reguliert.

Nach Inokulation des Fermenters wurden die Zellen 15 h bei 37 °C kultiviert und erreichten so eine $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ von ca. 50. Anschließend erfolgte die Induktion der Genexpression. Das verwendete *feed*-Profil ist in Abbildung 8 dargestellt.

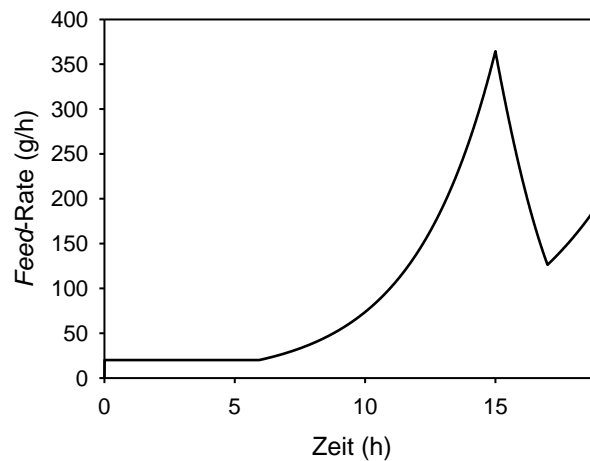


Abbildung 8. *Feed*-Profil für die Fermentation von Gesamtlängen-PABPN1.

2.2.3 Biochemische und biophysikalische Methoden

2.2.3.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die meisten Proteine binden SDS, wobei negativ geladene SDS-Protein-Komplexe entstehen, die ein konstantes Ladung-Masse-Verhältnis aufweisen. Daher diente diese Methode der elektrophoretischen Trennung von Proteinen in einem SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PA-Gel) entsprechend ihrer Ladung und Größe. Für die Auftrennung von Proteinen im Bereich von 100–25 kDa wurden 14% (v/v) SDS-PA-Gele nach LÄMMLI [125], für die Trennung im Bereich unterhalb von 25 kDa Tris/Tricin-Gele [126] verwendet. Die Proteinlösung wurde mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 98 °C denaturiert. Anschließend wurden die Proben in die Geltaschen überführt und durch Anlegen einer Stromstärke von 50 mA innerhalb 1–2 h elektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluss erfolgte die Färbung der Proteinbanden mit *Coomassie Brilliant Blau* [127].

Tabelle 13: Zusammensetzung der SDS-PA-Gele. Die Acrylamidlösung setzte sich aus 30% Acrylamid und 0,8% Bisacrylamid zusammen; Sodiumdodecylsulfat (SDS), N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED); Ammoniumperoxodisulfat (APS): 10% (w/v).

Trenngel 14% (v/v)		Sammelgel 6% (v/v)	
7 ml Acrylamidlösung		1,2 ml Acrylamidlösung	
4 ml ddH ₂ O		3,3 ml ddH ₂ O	
4 ml Trenngelpuffer (4x)		1,5 ml Sammelgelpuffer (4x)	
50 µl TEMED		30 µl TEMED	
100 µl APS		60 µl APS	

Sammelgelpuffer (4x)	Trenngelpuffer (4x)	Laufpuffer (10x)
500 mM Tris/HCl, pH 6,8	3 M Tris/HCl, pH 8,85	250 mM Tris/HCl, pH 8,3
0,4% (w/v) SDS	0,4% (w/v) SDS	1% (w/v) SDS
		1,87 M Glycin

Tabelle 14: Zusammensetzung der Tris/Tricin-SDS-PA-Gele und der Laufpuffer. Die Acrylamidlösung setzte sich aus 30% Acrylamid und 0,8% Bisacrylamid zusammen; Sodiumdodecylsulfat (SDS), N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED), Ammoniumperoxodisulfat (APS) 10% (w/v).

Trenngel 16%		Sammelgel 4%	
8,8 ml Acrylamidlösung		1,4 ml Acrylamidlösung	
430 µl ddH ₂ O		4,22 ml ddH ₂ O	
5,32 ml Gelpuffer (3x)		2 ml Gelpuffer (3x)	
1,3 ml Glycerin (98%)		30 µl TEMED	
50 µl TEMED		60 µl APS	
100 µl APS			

Gelpuffer (3x)	Anodenpuffer (10x)	Kathodenpuffer (10x)
3 M Tris/HCl, pH 8,45 3% (w/v) SDS	2 M Tris/HCl, pH 8,9	1 M Tris/HCl 1 M Tricin 1% (w/v) SDS

Tabelle 15: Bestandteile des SDS-Probenpuffers und der *Coomassie*-Färbe- und -entfärbelösung.

SDS-Probenpuffer (5 x)	<i>Coomassie</i> -Färbelösung	<i>Coomassie</i> -Entfärbelösung
100 mM Tris/HCl, pH 8	10% (v/v) Essigsäure	10% (v/v) Ethanol
4,8% (w/v) SDS	1 g/l <i>Brilliant Blau G250</i>	10% (v/v) Essigsäure
16% (v/v) Glycerin		
2% (v/v) β-Mercaptoethanol		
0,1% (w/v) Bromphenolblau		

2.2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand der Absorption ultravioletten Lichtes bei einer Wellenlänge von 280 nm. Die daraus resultierende Proteinkonzentration wurde nach dem LAMBERT-BEER-Gesetz berechnet (Gleichung 1).

$$A_{280} = \epsilon_{280} \cdot c \cdot d \quad \text{Gleichung 1}$$

A_{280}	Absorption bei 280 nm
ϵ_{280}	molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm ($M^{-1}cm^{-1}$)
c	Proteinkonzentration (M)
d	Schichtdicke der Küvette (cm)

Die Extinktionskoeffizienten der Proteine wurden nach GILL und VON HIPPEL über die Plattform *Protparam* (<http://web.expasy.org/protparam>) berechnet und sind Tabelle 16 zu entnehmen [128]. Die Aufnahme des Proteinspektrums von 240–400 nm ermöglichte die Überprüfung der Proteinlösung auf Kontaminationen mit DNA (Absorption bei 260 nm). Ferner sollte keine Absorption oberhalb von 320 nm zu beobachten sein, da diese auf Lichtstreuungseffekte durch Proteinaggregate hindeutet.

Tabelle 16: Molare Extinktionskoeffizienten bei 280 nm (ϵ_{280}) der verschiedenen PABPN1-Konstrukte.

PABPN1-Variante	$\epsilon_{280} [M^{-1} cm^{-1}]$
Gesamtlängen-PABPN1	20400
$\Delta C49$	5960
SUMO- $\Delta N114$	20400
(+7)Ala-N147, Δ Ala-N147	1490
N-(+7)Ala, N- Δ Ala	1490

Konzentrationsbestimmung von fibrillärem Protein

Da es sich bei fibrillärem Protein um (geordnete) Aggregate handelt, ist eine Konzentrationsbestimmung mittels UV-Absorptionsspektroskopie nicht möglich. Die Proteinkonzentration kann jedoch indirekt bestimmt werden. Hierfür wurde fibrilläres Protein aus dem Fibrillierungsansatz bekannter Proteinkonzentration durch Ultrazentrifugation (siehe 2.2.3.3) sedimentiert. Anschließend konnte die Konzentration an nicht fibrillierten, also löslichem Protein im Überstand bestimmt werden (siehe 2.2.3.3). Die Differenz aus Proteingesamtmenge und löslichem Protein ergab näherungsweise den Proteinanteil in der sedimentierten Proteinfraction, den Fibrillen.

Bei Sensitivität des fibrillären Proteins gegenüber Guanidiniumchlorid, das heißt, konnten die Fibrillen durch Guanidiniumchlorid denaturiert und somit solubilisiert werden, wurde die Proteinkonzentration nach Solubilisierung eines Aliquots an fibrillärem Protein bestimmt.

2.2.3.3 Ultrazentrifugation

Die Ultrazentrifugation diente der Sedimentation von amorphen oder fibrillären Proteinaggregaten. Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Zentrifugation bei 105000 x g für 1 h an der *Optima TLX CE* Ultrazentrifuge (Beckman Coulter) in 1,5 ml Zentrifugationsgefäßen (*Microfuge Tube*, Beckman).

2.2.3.4 Limitierte Proteolyse

Die limitierte Proteolyse wurde mit zwei unterschiedlichen Proteasen durchgeführt: zum einen mit Trypsin aus Rinderpankreas (3264,1 U/mg, AppliChem), zum anderen mit Proteinase K (30 U/mg, Roche). Das Massenverhältnis zwischen Trypsin zu Protein betrug 1:600, zwischen Proteinase K und Protein 1:1000. Die Hydrolyse fand in PF-Puffer (Tabelle 18) bei 20 °C statt. Die Proteolyseansätze wurden beginnend mit der Reaktion der längsten Dauer nacheinander gestartet und nach erfolgter Hydrolyse alle zum gleichen Zeitpunkt beendet. Das Abstoppen der Reaktion wurde im Falle von Trypsin mit der fünffach molaren Menge an Aprotinin (AppliChem), im Falle von Proteinase K mit 10 mM PMSF (AppliChem) erreicht. Anschließend wurden die Ansätze mit SDS-Probenpuffer versetzt und mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese analysiert (siehe 2.2.3.1).

2.2.3.5 Filterbindungsassay, adaptiert nach SACHS und KORNBERG (1985) [129]

Diese Methode diente der Bestimmung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante (K_D) zwischen einem RNA-Liganden und verschiedenen PABPN1-Varianten. Als Ligand wurde ^{32}P -markierte Oligo-(A)-RNA, bestehend aus 14 Adenylatresten verwendet (siehe 2.2.1.12). Im Reaktionsansatz wurden zunächst die PABPN1-Varianten mit Filterbindungspuffer (Tabelle 17) auf Endkonzentrationen im Bereich von 0–200 nM verdünnt. Anschließend wurden die Verdünnungen mit einer konstanten Menge (8,8 fmol) an Oligo-(A)-RNA komplettiert. Das Reaktionsvolumen betrug dabei 40 μl . Nach 30-minütiger Inkubation bei RT wurden 35 μl des Ansatzes auf einen Nitrozellulosefilter pipettiert (NC 20, Porengröße 0,2 μm , Whatman). Um unspezifische Bindungen der RNA auf dem Filter zu unterbinden, wurden diese in Waschpuffer vorinkubiert, der zudem 5 $\mu\text{g/ml}$ rRNA (Roche) enthielt. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran mit 5 ml eiskaltem Waschpuffer gespült und die Menge der auf dem Filter retardierten RNA mithilfe eines Szintillationszählers (*TRI-CARB 2100TR*, Packard) quantifiziert. Hierfür wurden die Filter in Szintillationsgefäße überführt und mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit (*LumasafePlus*, Perkin Elmer) versetzt.

Zusätzlich wurde die Hintergrundstrahlung und die Strahlungsintensität der eingesetzten Konzentration an Oligo-(A)-RNA bestimmt. Die Auswertung erfolgte entsprechend Wahle *et al.* 1993 [99].

2.2.3.6 Konkurrenz der RNA-Bindung

Mithilfe des Konkurrenzassays wurde die Spezifität der Bindung von Oligo-(A)-RNA durch PABPN1 untersucht. Zunächst wurden 8,8 fmol des Liganden (Oligo-(A)-RNA) mit aufsteigenden Mengen an Kompetitor (tRNA, rRNA) inkubiert. Im nächsten Schritt wurde der Reaktionsansatz mit einer PABPN1-Proteinlösung versetzt. Die Konkurrenz erfolgte bei einer PABPN1-Konzentration, die der zuvor bestimmten Dissoziationskonstante (K_D) entsprach. Die Reaktion wurde in Filterbindungspuffer durchgeführt (Tabelle 17), das Volumen betrug 40 μ l. Nach Inkubation bei RT für 30 min wurden 35 μ l des Reaktionsansatzes entnommen und der Anteil an PABPN1 gebundener Oligo-(A)-RNA bestimmt (siehe 2.2.3.5). Der Ansatz ohne Kompetitor wurde dreimal pipettiert und diente als Referenz (100% Bindung), auf die die anderen Messwerte normiert wurden.

Tabelle 17: Pufferzusammensetzungen für den Filterbindungsassay.

Filterbindungspuffer	Waschpuffer
50 mM Tris/HCl; pH 7,9	50 mM Tris/HCl; pH 8
100 mM KCl	100 mM NaCl
1 mM EDTA	1 mM EDTA
1 mM DTT	(+ 5 μ g/ml rRNA)
10% (v/v) Glycerin	
0,01% (v/v) NP-40	

2.2.3.7 Circular dichroismus (CD)-Messung

Die CD-Spektren wurden an einem *J-810 Spektropolarimeter* (Jasco) aufgenommen. Das Gerät wurde während der Messungen kontinuierlich mit Stickstoff gespült (2,5 l/min). Bei einer Spaltbreite von 1 nm und einer Messgeschwindigkeit von 50 nm/min wurde alle 0,5 nm ein Datenpunkt gemessen (*response* 1 s). Die Spektren wurden 60-fach akkumuliert. Sofern nicht anderes vermerkt, wurden alle Messungen bei 20 °C durchgeführt. Die eingesetzten Proteinkonzentrationen lagen im Bereich von 0,5–1 mg/ml. Es wurden Präzisionsküvetten aus Quarzglas (*Suprasil*, Hellma) verwendet.

Fern-UV-CD-Spektren

Um Aussagen über die Sekundärstrukturanteile treffen zu können, wurden CD-Spektren im Fern-UV-Bereich zwischen 250–190 nm aufgenommen. Die Küvettschichtdicke betrug 0,01 cm. Um die CD-Spektren verschiedener Proteine miteinander vergleichen zu können, wurden die pufferkorrigierten CD-Spektren mithilfe Gleichung 2 auf die mittlere residuelle Elliptizität ($[\Theta]_{\text{MRW}}$) normiert.

Nah-UV-CD-Spektren

Der charakteristische „Fingerabdruck“ eines Proteins kann durch Messung von CD-Spektren im Nah-UV-Bereich erhalten werden. Hierfür wurden Spektren im Bereich 400–250 nm aufgenommen. Es wurde eine Küvette der Schichtdicke von 1 cm verwendet. Der Vergleich der pufferkorrigierten CD-Spektren erfolgte nach Normierung auf die molare Elliptizität ($[\Theta]$) (Gleichung 3).

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \frac{\theta \cdot M}{10 \cdot d \cdot c \cdot N} \quad \text{Gleichung 2}$$

$$[\Theta] = \frac{\theta \cdot M}{10 \cdot d \cdot c} \quad \text{Gleichung 3}$$

$[\Theta]_{\text{MRW}}$	mittlere residuelle Elliptizität ($\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$)	c	Proteinkonzentration in mg/ml
$[\Theta]$	molare Elliptizität ($\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$)	N	Anzahl der Aminosäuren
θ	gemessene Elliptizität (mdeg)	d	Küvettschichtdicke (cm)
M	molare Masse (g/mol)		

2.2.3.8 Intrinsische Fluoreszenz

Um Aussagen über die Exposition aromatischer Aminosäuren des gefalteten (oder entfalteten) Proteins treffen zu können, wurden Fluoreszenzspektren der intrinsischen Fluorophore (Phe, Tyr, Trp) aufgenommen. Die Aufnahme der Fluoreszenzspektren der aromatischen Aminosäuren erfolgte nach Anregung bei einer Wellenlänge von 280 nm. Die Tryptophan-Fluoreszenzspektren wurden nach Anregung der Probe mit Licht einer Wellenlänge von 295 nm aufgenommen. Im Bereich von 300–400 nm wurde die Intensität des emittierten Lichtes gemessen. Hierbei wurde die Signalstärke 0,2 s detektiert, integriert und als Messpunkt alle 1 nm aufgezeichnet. Die Spektren wurden 5-fach akkumuliert und pufferkorrigiert. Alle Messungen erfolgten bei 20 °C unter Verwendung einer Fluoreszenzküvette aus Quarzglas (*Suprasil*, Hellma) mit einer Schichtdicke von 1 cm. Die Spaltbreiten betragen für die Anregung 5 nm, für die Emission 8 nm. Es wurde ein Fluoreszenzspektrometer der Reihe *Horiba Jobin Yvon* (Instruments S.A., Inc) verwendet.

2.2.3.9 Fouriertransformierte Infrarotspektroskopie (FTIR)

Die Probentechnik der abgeschwächten Totalreflexion (*attenuated total reflection*, ATR) erlaubt die Untersuchung von Proteinaggregaten hinsichtlich des Sekundärstrukturgehaltes in wässrigen Lösungen [130,131]. Die Proteinkonzentration der löslichen und fibrillären Proteinspezies waren höher als 3 mg/ml. Fibrilläres Protein wurde zuvor durch Ultrazentrifugation (siehe 2.2.3.3) sedimentiert und in PF-Puffer aufgenommen (Tabelle 18). Monomeres Protein wurde gegen PF-Puffer dialysiert um einen exakten Pufferabgleich zu gewährleisten. Die Messung erfolgte im 30 µl Maßstab an einem ATR-FTIR-Spektrometer *Tensor 27* (Bruker). Die Spektren wurden im Bereich 4000–1000 cm^{-1} mit einer Auflösung von 4 cm^{-1} aufgenommen. Jeweils 64 Messungen wurden zu einem Spektrum akkumuliert und pufferkorrigiert. Die Spektren wurden auf die Absorption bei 1550 cm^{-1} normiert.

2.2.3.10 Fibrillierungsansätze

Zunächst wurden die Proteinlösungen ultrazentrifugiert um mögliche amorphe Aggregate oder fibrilläre Vorstufen zu entfernen, die die Kinetik beeinflussen könnten (siehe 2.2.3.3). Die Fibrillierungen der PABPN1-Varianten fanden in PABPN1-Fibrillierungspuffer (PF-Puffer) statt, die Fibrillenbildung der N-terminalen Domäne von PABPN1 in N-Fibrillierungspuffer (NF-Puffer) (Tabelle 18). Um den reduzierten Zustand der Cysteine im Protein aufrechtzuerhalten, wurde alle zwei Tage DTT zu einer Endkonzentration von 1 mM

dazugegeben. Die exakten Bedingungen, unter denen die Fibrillierungen getestet wurden, werden in den entsprechenden Abschnitten angegeben.

Tabelle 18: Zusammensetzung der Fibrillierungspuffer für die N-terminale Region von PABPN1 (NF-Puffer) und die anderen PABPN1-Varianten (PF-Puffer).

PABPN1-Fibrillierungspuffer (PF-Puffer)	N-Fibrillierungspuffer (NF-Puffer)
50 mM Tris/HCl; pH 7,9	5 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,9
1,5 M KCl	150 mM NaCl
1 mM EDTA	1 mM EDTA
1 mM DTT	
10% (v/v) Glycerin	

2.2.3.11 Detektion amyloider Fibrillen durch Thioflavin T- Bindung

Thioflavin T (ThT) ist ein kationisches Benzothiazolanilin, welches als klassischer Nachweis amyloider Fibrillen eingesetzt wird [55]. In Anwesenheit von fibrillärem Protein verändert sich das Emissionsspektrum. Eine daraus resultierende Fluoreszenzintensitätserhöhung bei 482 nm kann derart für kinetische Analysen der Fibrillenbildung herangezogen werden.

Für den ThT-Assay wurde eine Quarzglas Küvette (*Suprasil*, Hellma) mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet. Das Reaktionsvolumen betrug 200 µl und enthielt 50 µM ThT und 2 µM des zu analysierenden Proteins. Der Assay fand in den entsprechenden Fibrillierungspuffern der Proteinvarianten statt. Die Änderung der Fluoreszenzintensität wurde an einem Fluoreszenzspektrometer der Reihe *Horiba Jobin Yvon* (Instruments S.A., Inc) gemessen. Hierbei erfolgte die Anregung des Farbstoffes bei einer Wellenlänge von 450 nm (Spaltbreite 5 nm). Es wurden Fluoreszenzspektren in einem Bereich von 465–550 nm (Spaltbreite 8 nm) aufgenommen. Die Signale wurden über 0,2 s integriert und je 1 nm ein Messpunkt aufgezeichnet. Die Messung erfolgte bei 20 °C. Anschließend wurden die Spektren pufferkorrigiert und die Fluoreszenzintensität bei 482 nm zur Darstellung der Kinetik verwendet.

2.2.3.12 Solubilisierung von fibrillärem Protein

Um die Sensitivität von fibrillärem Protein gegenüber dem Denaturierungsmittel Guanidiniumchlorid (GdmCl) zu bestimmen, wurde ein Solubilisierungsassay etabliert. Zunächst wurde die fibrilläre Proteinspezies aus dem Fibrillierungsansatz durch Ultrazentrifugation isoliert (siehe 2.2.3.3). Die Sedimentation der Fibrillen erfolgte im

50 µl-Maßstab. Die Überstände wurden vereinigt und dienten der Konzentrationsbestimmung von noch löslichem Proteinanteil. Näherungsweise konnte so die Proteinmenge in der unlöslichen Fraktion berechnet werden (siehe 2.2.3.2). Darauf folgend wurde das fibrilläre Protein mit 200 µl PF-Puffer mit steigender GdmCl-Konzentration für 1 h bei 20 °C inkubiert. Nach Inkubation wurde die unlösliche Proteinfraction erneut durch Ultrazentrifugation isoliert. Die Überstände dienten nun der Bestimmung der solubilisierten Proteinmenge. Sofern die Fibrillen sensitiv gegenüber GdmCl waren, wurde die unlösliche Fraktion nach dem zweiten Ultrazentrifugationsschritt in 6 M GdmCl vollständig gelöst und konnte so zur Bestimmung des noch nicht solubilisierten Proteins herangezogen werden. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte am UV-Photometer (siehe 2.2.3.2).

2.2.3.13 *Seed*-Präparation aus fibrillärem Protein

Die Präparation von *seeds* (fragmentierte Fibrillen) erfolgte ausschließlich aus Fibrillen der expandierten N-terminalen Region von PABPN1 (N-(+7)Ala). Fibrilläres Protein (500 µl Fibrillierungsansatz mit 0,5 mM Protein) wurde durch Ultrazentrifugation sedimentiert (siehe 2.2.3.3). Anschließend wurden amorphe Proteinaggregate durch einstündige Inkubation in 6 M GdmCl solubilisiert und das fibrilläre, unlösliche Protein erneut durch Zentrifugation isoliert. Über den Proteinanteil in den Überständen konnte die Proteinmenge im Pellet berechnet werden (siehe 2.2.3.2). Im Anschluss wurden die Fibrillen in PF-Puffer (100–200 µl) resuspendiert und so eine Konzentration eingestellt, die für die *seeding*-Experimente notwendig war. Die Fragmentierung zu *seeds* erfolgte mithilfe der Ultraschallsonde. Die Fibrillensuspension wurde dabei mit 10 x 10 Pulsen und einer Amplitude von 70% behandelt. Zwischen den Pulsen wurden die Fibrillen auf Eis gekühlt. Die entstandenen *seeds* wurden in entsprechenden Volumina (5–10 µl) den Fibrillierungsansätzen zugesetzt. Zur optischen Kontrolle wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen der Präparationen angefertigt (siehe 2.2.3.14).

2.2.3.14 Anfertigung von Grids für die Elektronenmikroskopie

Um die Anwesenheit von fibrillären Strukturen zu bestätigen, wurden Grids für die Elektronenmikroskopie angefertigt. Hierfür wurden kohlebeschichtete Kupfergrids (Plano) verwendet. Einer Inkubation in Bacitracin (0,1 mg/ml) für 1 min folgte eine dreiminütige Inkubation mit der Proteinlösung (ca. 0,5 mg/ml). Anschließend wurde 3 x 1 min mit ddH₂O gewaschen. Im letzten Schritt wurden die Grids mit Uranylacetat (1% (w/v)) innerhalb von 15 s negativ kontrastiert. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Lösungen mit Filterpapier entfernt. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen erfolgten am *EM 600* (Zeiss) in Kooperation mit Gerd Hause (Universitätsbiozentrum Halle).

2.2.3.15 *Reversed Phase - High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC)

Die RP-HPLC wurde eingesetzt, um gereinigtes Protein zu entsalzen oder um Peptidfragmente aufzutrennen. Für das Entsalzen wurde eine *Jupiter 5u C5*-Säule (Phenomenex), für die Auftrennung der Peptidfragmente eine *Jupiter 5u C18*-Säule (Phenomenex) verwendet. Die Proteine bzw. Proteinfragmente wurden durch einen Gradienten steigender Hydrophobizität eluiert. Als Laufmittel diente ddH₂O mit 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure (TFA). Die Elution erfolgte durch Acetonitril (ACN) mit 0,1% (v/v) TFA. Die Flussgeschwindigkeit betrug 0,5 ml/min. Nach Probeninjektion (100 µl, 200 ng Protein) wurde die Säule 15 min mit 2% (v/v) ACN gespült. Im Anschluss wurde im Zeitraum von 50 min auf 70% (v/v) ACN und nach weiteren 10 min auf 100% (v/v) ACN erhöht. Die Identifizierung der Fraktionen, die Protein enthielten, erfolgte anhand der Absorption bei den Wellenlängen 215 nm und 280 nm.

2.2.3.16 Test auf oligomere Spezies während der Fibrillenbildung durch Gelfiltration

Die analytische Gelfiltration diente der Detektion oligomerer Spezies während der Fibrillenbildung. Für die Analyse wurde eine *Superdex S200*-Säule (GE Healthcare) mit einem Säulenvolumen von 25 ml verwendet. Als Laufmittel diente PF-Puffer (Tabelle 18). Zeitabhängig wurden 100 µl Proteinlösung einer Proteinkonzentration von 60 µM aufgetragen. Die Injektion erfolgte durch einen *superloop* der Größe 100 µl. Vor der Probeninjektion wurde das Aliquot mit 5 µl einer L-Tryptophan-Stammlösung (3,23 mM) versetzt. L-Tryptophan (Fluka), gelöst in PF-Puffer, diente als interner Standard. Die Gelfiltration wurde bei einem Fluss von 1 ml/min durchgeführt. Eine Normierung der erhaltenen Chromatogramme erfolgte auf die Absorptionsintensität bei 280 nm des L-Tryptophanstandards.

2.2.3.17 Massenspektrometrie (MS)

Verifizierung der gereinigten Proteine

Die Massenbestimmung der monomeren Varianten von PABPN1 wurde von Angelika Schierhorn durchgeführt (Max-Planck-Gesellschaft, Halle). Zunächst wurden die Proteine mittels RP-HPLC entsalzt (siehe 2.2.3.15) und anschließend durch MALDI-TOF-MS an einem *Ultraflex 3*- oder *REFLEX*-Massenspektrometer (Bruker-Franzen-Analytik) analysiert.

Identifizierung von Proteolyseprodukten

Die massenspektrometrische Analyse von Proteinfragmenten nach Proteolyse wurde von Christian Ihling (AG Sinz, MLU Halle) durchgeführt. Hierfür wurden die Proteinfragmente zunächst mittels SDS-PAGE getrennt. Die relevanten Gelbanden wurden ausgeschnitten. Nach enzymatischer Proteolyse im Gel mit Chymotrypsin wurden die resultierenden Peptide aus den Gelbanden extrahiert und mittels LC/MS/MS analysiert. Dabei wurden die Peptidgemische zunächst mittels *nano*-RP-HPLC getrennt (*Ultimate Nano-HPLC*-System, Dionex). Die *nano* ESI/MS/MS-Analyse erfolgte mit einem *LTQ Orbitrap XL*-Hybrid Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific). Hierfür wurden abwechselnd Gesamtmassenspektren im Bereich m/z 300–2000 (Orbitrapanalysator; Auflösung 60000 bei m/z 400) und Fragmentmassenspektren der zu den fünf intensivsten Signalen im Gesamtmassenspektrum korrespondierenden Ionen in der linearen Ionenfalle aufgenommen. Die Datenprozessierung erfolgte mit dem *Proteome Discoverer 1.0* (Thermo Fisher Scientific). Die MS/MS-Daten wurden mittels *Mascot*-Datenbanksuche (*Mascotserver 2.2*, Matrixscience) gegen die Aminosäuresequenz der Proteinvarianten abgeglichen. Zugelassene Massentoleranzen waren ± 3 ppm für Vorläuferionen bzw. $\pm 0,8$ Da für Fragment-Ionen.

2.2.3.18 Konzentrierung von Proteinlösungen

Für die Konzentrierung von Proteinlösungen im Bereich von 200–10 ml wurde die *Amicon* Rührzelle (Millipore) mit einer geeigneten Filtrationsmembran (MWCO 3000 oder 10000) verwendet. Die Konzentrierung kleinerer Volumina erfolgte mithilfe der *Amicon Ultra-15* Zentrifugationseinheiten (Millipore).

2.2.4 Proteinreinigung

Alle verwendeten Puffer wurden sterilfiltriert (Zellulosenitrat-Filter, Porengröße 0,45 µM, Sartorius Stedim Biotech) und entgast. Die Zugabe von DTT zu den entsprechenden Puffern erfolgte erst unmittelbar vor deren Verwendung. Alle Arbeiten wurden bei 4 °C im Kühlraum oder auf Eis durchgeführt. Die chromatographischen Reinigungsschritte erfolgten am ÄKTA-System (*Explorer* oder *Purifier*) von GE Healthcare. Die Proteinlösungen wurden mithilfe eines *superloops* geeigneter Größe (GE Healthcare) auf die Chromatographiesäule aufgetragen. Wenn nicht anders beschrieben, erfolgten die chromatographischen Schritte bei einem Fluss von 1 ml/min. Die fraktionierten Proteinlösungen wurden mittels SDS-PAGE analysiert (siehe 2.2.3.1). Nach dem finalen Chromatographieschritt wurden die Elutionsfraktionen, die das Zielprotein enthielten, vereinigt und gegen PF-Puffer dialysiert (Tabelle 18). Die Konzentrierung erfolgte wie unter 2.2.3.2 und 2.2.3.18 beschrieben. Die Aliquots wurden bei -80 °C gelagert.

2.2.4.1 Zellaufschluss

Zunächst wurde das Zellpellet (20–40 g) in 5 ml Zellaufschlusspuffer pro Gramm Zellfeuchtmasse resuspendiert. Anschließend wurde zu der Zellsuspension Lysozym (22770 U/mg, AppliChem) zu einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml gegeben und 30 min inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Hochdruckdispersion (*Gaulin Micron 40* Homogenisator, APV) bei einem durchschnittlichen Druck von 800 bar in drei Durchgängen. Zur Hydrolyse von Nukleinsäuren wurde das Zelllysate anschließend mit 60 U Benzonase (Merck) und Magnesiumchlorid (Endkonzentration 2 mM) versetzt und 30 min inkubiert. Unlösliche Proteine und Membranbestandteile wurden durch 20-minütige Zentrifugation bei 75000 x g pelletiert. Es wurde mit dem Überstand weitergearbeitet.

Abweichungen von diesem Protokoll und die unterschiedlichen Zellaufschlusspuffer werden in den entsprechenden Abschnitten beschrieben.

2.2.4.2 Reinigung der Gesamtlängen-PABPN1-Varianten

Die Reinigung der Gesamtlängen-Proteine erfolgte modifiziert nach BIENROTH (1991) [97].

Blaue Sepharose

Da PABPN1 mit dem Farbstoff *Cibacron Blue F3G-A* in Wechselwirkung tritt, wurde diese Affinitäts-Chromatographie verwendet, um PABPN1 aus dem Zelllysate anzureichern. Die Chromatographie wurde bei einem Matrixvolumen von 250 ml und einem Fluss von 3 ml/min durchgeführt. Zunächst wurde die Säule mit Puffer BS-A equilibriert, bevor das Zelllysate (150–300 ml) auf die Säule aufgetragen wurde. Anschließend wurde mit Puffer BS-A, darauf folgend mit Puffer BS-B und erneut mit Puffer BS-A gewaschen (Tabelle 19). Die Elution erfolgte durch Puffer BS-C. Die Proteinlösungen der relevanten Elutionsfraktionen wurden vereinigt und mit 1 Vol. Puffer Q-A verdünnt, um eine amorphe Aggregation wegen zu hoher Proteinkonzentration zu unterbinden. Anschließend wurde das im Puffer enthaltene L-Arginin durch Dialyse gegen Puffer Q-A entfernt.

Tabelle 19: Zusammensetzung des Zellaufschlusspuffers und der Puffer für den ersten Chromatographieschritt zur Reinigung der Gesamtlängen-PABPN1-Varianten. Proteaseinhibitor: *Protease Inhibitor Cocktail EDTA free* (Roche).

Zellaufschlusspuffer I	Puffer BS-A
5 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,9	50 mM Tris/HCl; pH 7,9
150 mM KCl	150 mM KCl
1 mM EDTA	1 mM EDTA
1 mM DTT	1 mM DTT
10% (v/v) Glycerin	10% (v/v) Glycerin
Proteaseinhibitor (1 Tablette in 250 ml)	
Puffer BS-B	Puffer BS-C
50 mM Tris/HCl; pH 7,9	50 mM Tris/HCl; pH 7,9
150 mM KCl	150 mM KCl
1 mM EDTA	1 mM EDTA
1 mM DTT	1 mM DTT
10% (v/v) Glycerin	10% (v/v) Glycerin
4 M NaCl	1 M L-Arginin

Anionenaustausch-Chromatographie

Aufgrund der zahlreichen negativ geladenen Aminosäuren im N-terminalen Bereich von PABPN1 wurde das Protein im nächsten Schritt mithilfe der Anionenaustausch-Chromatographie angereichert. Hierfür wurden 20 ml einer Matrix verwendet, die als funktionalen Liganden ein quartäres Ammoniumion trägt (Macro-Prep High Q, BioRad). Vor dem Auftragen der Proteinlösung (200–300 ml) wurde die Säule mit Puffer Q-A equilibriert (Tabelle 20). Die chromatographische Auftrennung erfolgte durch einen linearen Gradienten über 14 SV mit Puffer Q-B. Für die anschließende Evaluierung wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm sowie die Leitfähigkeit aufgezeichnet. Nach Identifizierung der relevanten Proteinlösungen wurden diese vereinigt und gegen Puffer S-A dialysiert.

Tabelle 20: Pufferzusammensetzung für die Anionenaustausch-Chromatographie.

Puffer Q-A	Puffer Q-B
50 mM Tris/HCl; pH 7,9	50 mM Tris/HCl; pH 7,9
150 mM KCl	500 mM KCl
1 mM EDTA	1 mM EDTA
1 mM DTT	1 mM DTT
10% (v/v) Glycerin	10% (v/v) Glycerin

Kationenaustausch-Chromatographie

Da der C-terminale Bereich von PABPN1 durch die vorhandenen 13 Argininreste bei neutralem pH eine positive Nettoladung besitzt, wurden die Proteinvarianten im letzten Reinigungsschritt mittels einer Kationenaustausch-Chromatographie gereinigt. Die Säulenmatrix (20 ml) trägt hierbei eine Methylsulfonat-Gruppe (*Source 15S*, GE Healthcare). Nach Equilibrierung des Säulenmaterials mit Puffer S-A wurde die Proteinlösung (100–150 ml) aufgetragen. Die anschließende Elution erfolgte durch einen linearen Gradienten über 9 SV mit Puffer S-B.

Tabelle 21: Pufferbestandteile der Kationenaustausch-Chromatographie.

Puffer S-A	Puffer S-B
20 mM K-HEPES; pH 7,9	20 mM K-HEPES; pH 7,9
150 mM KCl	500 mM KCl
1 mM EDTA	1 mM EDTA
1 mM DTT	1 mM DTT
10% (v/v) Glycerin	10% (v/v) Glycerin

2.2.4.3 Reinigung von PABPN1-Fragmenten mit N-terminaler 6 x His-SUMO-Fusion

Die PABPN1-Fragmente wurden im Rahmen dieser Arbeit mit N-terminaler 6 x His-SUMO-Fusion exprimiert. Die Histidin-Fusion ermöglichte die Reinigung über eine Ni²⁺-Affinitäts-Chromatographie, die SUMO-Domäne (*small ubiquitin-related modifier*) die spezifische Spaltung der Fusion. Die Hydrolyse erfolgte dabei durch die SUMO1-Protease, eine Cystein-Protease, die die Tertiärstruktur von SUMO erkennt und spaltet [132].

Ni²⁺-Affinitäts-Chromatographie I

Zunächst wurde das Fusionsprotein durch eine Ni²⁺-Affinitäts-Chromatographie (5 ml *HisTrap HP*, GE Healthcare) aus dem Zelllysat angereichert. Hierfür wurde das Säulenmaterial mit Zellaufschlusspuffer II equilibriert und anschließend die Zellsuspension (100–150 ml) auf die Säule aufgetragen. Nicht oder nur schwach mit dem Säulenmaterial wechselwirkende Proteine wurden durch Waschen der Matrix mit Zellaufschlusspuffer II und Ni-Waschpuffer entfernt. Die Elution erfolgte durch einen linear ansteigenden Imidazolgradienten (Ni-Elutionspuffer) über 12 SV.

Tabelle 22: Zusammensetzung des Zellaufschlusspuffers für die Reinigung von SUMO-Fusions-Konstrukten und der Puffer des ersten Chromatographieschrittes.

Zellaufschlusspuffer II	Ni-Waschpuffer
5 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,9	50 mM Tris/HCl; pH 7,9
150 mM KCl	150 mM KCl
0,5 mM DTT	0,5 mM DTT
10% (v/v) Glycerin	10% (v/v) Glycerin
	20 mM Imidazol
Ni-Elutionspuffer	
50 mM Tris/HCl; pH 7,9	
150 mM KCl	
0,5 mM DTT	
10% (v/v) Glycerin	
250 mM Imidazol	

Hydrolyse der SUMO-Fusion und Ni²⁺-Affinitäts-Chromatographie II

Für die Abspaltung der 6 x Histidin-SUMO-Fusion wurde die Proteinlösung mit 0,05% (v/v) SUMO1-Protease (0,5 mg/ml) versetzt und der Reaktionsansatz über Nacht gegen Puffer-Q-A dialysiert (Tabelle 20). Um anschließend die Hydrolyseprodukte und die Protease aus der Proteinlösung zu entfernen, wurde erneut eine Ni²⁺-Affinitäts-Chromatographie durchgeführt. Die PABPN1-Variante konnte nun, ohne die Fusion, nicht mehr mit der Säulenmatrix wechselwirken und fand sich im Durchfluss wieder; die SUMO1-Protease und 6 x His-SUMO wurden jedoch an der Matrix komplexiert. Als mobile Phase wurde Puffer-Q-A verwendet. Die sich anschließenden Reinigungsschritte werden im folgenden Abschnitt erklärt.

Sich anschließende Reinigungsschritte der verschiedenen PABPN1-Fragmente

(1) ΔC49-Varianten: Anionenaustausch-Chromatographie

Die ΔC49-Varianten weisen einen pI von 4,5 auf, resultierend in einer negativen Nettoladung bei pH 7,9. Dies ermöglichte eine anschließend Reinigung mithilfe der Anionenaustausch-Chromatographie (5 ml *HiTrap Q*, GE Healthcare). Vor der Probenauftragung (100–150 ml) wurde die Säulenmatrix zunächst mit Puffer-Q-A equilibriert. Die Trennung erfolgte durch einen linearen Gradienten über 14 SV mit Puffer-Q-B (Tabelle 20).

(2) N147-Varianten: Größenausschluss-Chromatographie (Gelfiltration)

Im Anschluss an die Spaltung der SUMO-Fusion und der Ni²⁺-Affinitäts-Chromatographie II wurden die N114-Varianten mittels Gelfiltration (120 ml, *Superdex 75*-Säule, GE Healthcare) gereinigt. Als Laufpuffer wurde Puffer-Q-A verwendet. Die Trennung fand in mehreren Läufen statt, wobei 7 ml Proteinlösung je Durchgang auf die Säule aufgetragen wurden.

(3) Reinigung der SUMO-ΔN114-Variante

Die Reinigung der SUMO-ΔN114-Variante erfolgte analog 2.2.4.3. Da nach Spaltung der SUMO-Fusion ein Großteil des Proteins amorph aggregierte, wurde auf die Hydrolyse der Fusion verzichtet. Das Protein wurde im Kontext des SUMO-Fusionsproteins gereinigt. Der Ni²⁺-Affinitäts-Chromatographie I folgte als zweiter Reinigungsschritt die Anionenaustausch-Chromatographie (siehe Reinigung der ΔC49-Varianten).

2.2.4.4 Reinigung der SUMO1-Protease

Die SUMO1-Protease wurde benötigt, um die SUMO-Fusion von der relevanten PABPN1-Variante abzuspalten [132]. Da die Protease eine N-terminale 6 x Histidin-Fusion besitzt, wurde zunächst eine Ni²⁺-Affinitäts-Chromatographie durchgeführt (5 ml *HisTrap HP*, GE Healthcare). Nachdem das Zelllysat auf die Säule aufgetragen wurde, folgten ein Waschschrift mit SUMO1-Waschpuffer und anschließend die Elution durch einen linearen Gradienten von 0% auf 100% Elutionspuffer über 20 SV (Tabelle 23). Alle relevanten Elutionsfraktionen wurden direkt mit 1 Vol. Lagerpuffer verdünnt, um die Bildung amorpher Aggregate zu unterbinden. Anschließend wurde die Proteinlösung gegen Lagerpuffer dialysiert.

2.2.4.5 Reinigung der N-terminalen Domäne von PABPN1

Die Reinigung der N-terminalen Region (Aminosäuren 1–125) erfolgte, wie in der Dissertation von Grit Lodderstedt beschrieben, siehe Ref. [133].

Tabelle 23: Bestandteile der Puffer für die Reinigung der SUMO1-Protease.

Zellaufschlusspuffer III	SUMO1-Waschpuffer
50 mM Tris/HCl; pH 8,0	50 mM Tris/HCl; pH 8,0
350 mM NaCl	350 mM NaCl
1 mM β-Mercaptoethanol	1 mM β-Mercaptoethanol
0,2% (v/v) NP-40	0,2% (v/v) NP-40
	20 mM Imidazol
SUMO1-Elutionspuffer	Lagerpuffer
50 mM Tris/HCl; pH 8,0	50 mM Tris/HCl; pH 8,0
350 mM NaCl	500 mM NaCl
1 mM β-Mercaptoethanol	1 mM DTT
0,2% (v/v) NP-40	0,2% (v/v) NP-40
250 mM Imidazol	50% (v/v) Glycerin

3 Ergebnisse

Die Grundlagen dieser Arbeit bilden die Dissertationen von Till Scheuermann und Grit Lodderstedt, die im Rahmen ihrer Promotion die N-terminale Region (Aminosäuren 1–125) von PABPN1 hinsichtlich der Fibrillenbildung untersucht hatten. Zusammenfassend wurde eine Beteiligung der Oligoalaninsequenz an der Fibrillenbildung der N-terminalen Region festgestellt: Nur in Anwesenheit des Alaninsegmentes lagerte sich das lösliche Protein zu fibrillären Aggregaten um [134,135]. Die vorliegende Arbeit greift die ursprüngliche Zielstellung wieder auf, nämlich die Untersuchung des Einflusses der Alaninsequenz auf die Fibrillenbildung des Gesamtlängen-Proteins. Im Mittelpunkt stand dabei die Charakterisierung der Fibrillenbildung bzw. der konformationellen Umlagerung des Proteins.

Kapitel I:

Untersuchungen zur Fibrillenbildung von Gesamtlängen-PABPN1 und PABPN1-Deletionsvarianten

3.1 Analyse von Gesamtlängen-PABPN1

3.1.1 Rekombinante Genexpression und Proteinreinigung

Alle Varianten des Gesamtlängen-PABPN1 wurden im *fed-batch*-Verfahren rekombinant hergestellt (siehe 2.2.2.2). Aus 8 l Kulturmedium wurden durchschnittlich 700 g Zellfeuchtmasse erhalten. Die Reinigung der Proteinvarianten erfolgte wie unter 2.2.4.2 beschrieben. Die Elutionsprofile der drei Chromatographieschritte und ein SDS-PA-Gel der gereinigten Proteinvarianten sind in Abbildung 9 dargestellt. Abweichend von BIENROTH et al. [97] wurde bei der *Blauen Sepharose*-Chromatographie mit 1 M L-Arginin eluiert. Eine hohe Absorption von 1400 AU bei 280 nm gab Hinweis auf zahlreiche Kontaminationen mit Fremdproteinen (Abbildung 9A). Im Verlauf der weiteren Reinigungsschritte wurden sowohl Fremdprotein-, als auch DNA-Kontaminationen entfernt. Das Chromatogramm der Kationenaustausch-Chromatographie zeigte einen symmetrischen Peak bei einer Leitfähigkeit von 50 mS/cm, entsprechend einer KCl Konzentration von 440 mM. Der symmetrische Peak deutete auf eine einzige Proteinspezies hin. Das leichte Peak-*tailing* war dabei auf eine zu dicht gepackte Säulenmatrix zurückzuführen, wie durch einen Aceton-Testlauf bestätigt werden konnte. Die Analyse der Proteinfractionen durch SDS-PAGE ist in Abbildung 9D dargestellt. Aus dem mit *Coomassie* gefärbten SDS-PA-Gel wurde für die drei PABPN1-Varianten eine Reinheit von 98% näherungsweise bestimmt. Aus vorangegangenen Studien war bereits bekannt, dass Gesamtlängen-PABPN1 ein ungewöhnliches Laufverhalten in der SDS-PAGE zeigt und bei einer apparenten Molekularmasse von ca. 50 kDa detektiert werden kann [99,136]. Durchschnittlich konnten 60–70 mg Protein aus 30 g Zellfeuchtmasse isoliert werden.

Die gereinigten Proteinvarianten wurden zudem mittels Gelfiltration auf höhermolekulare PABPN1-Spezies untersucht. Ein Aliquot gereinigtes Protein wurde dafür auf eine *Superdex*

S200-Säule (GE Healthcare) aufgetragen und analysiert. PABPN1 eluierte bei einem Volumen von 14 ml in einem symmetrischen Peak (Vergleich mit Abbildung 18). Die Berechnung des STOKES-Radius (R_{St}) ergab einen R_{St} von 35,6 Å. In der Literatur wird für monomeres PABPN1 ein R_{St} von 37,6 Å angegeben. Somit kann davon ausgegangen werden, dass das gereinigte Protein als Monomer vorlag [99].

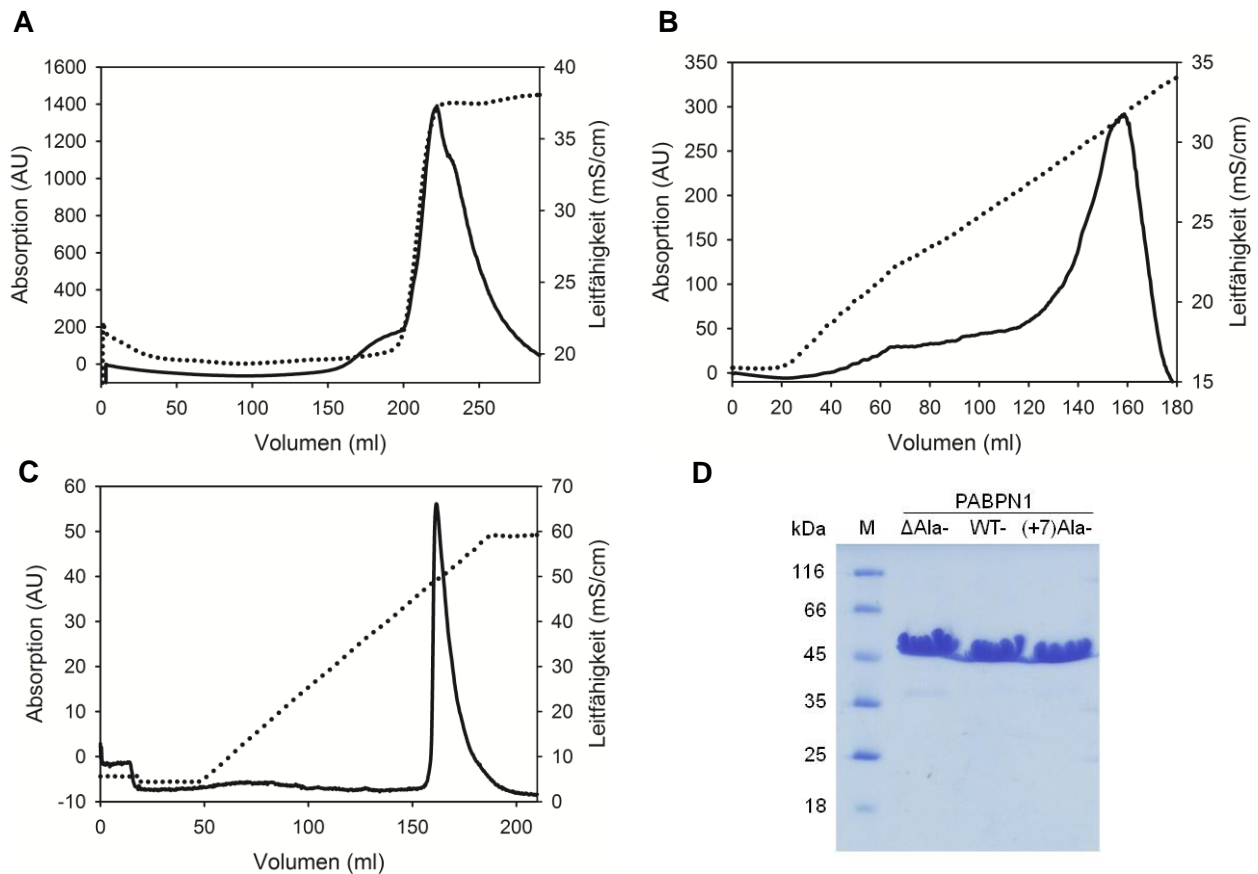


Abbildung 9. Elutionsprofile der verschiedenen Chromatographieschritte zur Reinigung von PABPN1. Gezeigt sind die Absorption bei 280 nm (schwarze Linie) und die Leitfähigkeit (gepunktete Linie) der eluierenden Lösung. (A) Affinitäts-Chromatographie (*Blaue Sepharose*); (B) Anionenaustausch-Chromatographie (*HighQ*); (C) Kationenaustausch-Chromatographie (*Source 15S*). (D) SDS-PA-Gel der gereinigten Protein Varianten. Proteingrößenstandard (M).

3.1.2 Charakterisierung der löslichen Proteine

3.1.2.1 Massenspektrometrie

Nach der Reinigung wurden die Proteine mittels RP-HPLC entsalzt (siehe 2.2.3.15) und konnten so massenspektrometrisch analysiert werden (siehe 3.1.2.1). Die PABPN1-Varianten eluierten nach einer Retentionszeit von 59 min in einem symmetrischen Peak. Die Ergebnisse der Massenspektrometrie verifizierten die verschiedenen PABPN1-Konstrukte (Daten nicht gezeigt).

3.1.2.2 Biophysikalische Charakterisierung

PABPN1 zeichnet sich durch eine hohe Aggregationsneigung *in vitro* aus, die auf Interaktionen zwischen dem sauren N-terminalen Bereich und dem basischen C-terminalen Bereich des Proteins zurückzuführen sein könnte (pI der N-terminalen Reste 1–114: 4,0; pI der C-terminalen Reste 257–306: 11,8). Till Scheuermann fand in seiner Dissertation Bedingungen, unter denen PABPN1 in einem Konzentrationsbereich löslich ist, der für Untersuchungen zur Fibrillenbildung hinreichend war [134]. Der verwendete Puffer beinhaltete 1,5 M KCl, das elektrostatische Wechselwirkungen zwischen N- und C-terminalem Bereich des Proteins reduzieren sollte. Zusätzlich ermöglichte die Zugabe von 10% (v/v) Glycerin lösliches Protein im Konzentrationsbereich von 60 μ M zu analysieren. Die biophysikalische Charakterisierung erfolgte dementsprechend in einem Puffer folgender Zusammensetzung: 50 mM Tris/HCl, pH 7,9, 1,5 M KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% (v/v) Glycerin, nachfolgend als PF-Puffer bezeichnet.

CD-Spektroskopie

Zunächst erfolgte eine Charakterisierung des Faltungszustandes der löslichen Proteine in PF-Puffer. Dabei fanden unterschiedliche biophysikalische Methoden Anwendung. Der Sekundärstrukturgehalt der Varianten wurde anhand des Circular dichroismus im Fern-UV-Bereich bestimmt (siehe 2.2.3.7). Die CD-Spektren der Proteine in PF-Puffer unterschieden sich dabei deutlich von den Spektren der Varianten in denaturierendem Puffer. Ein absolutes Minimum bei 206 nm und ein lokales Minimum bei 220 nm sowie eine maximale Amplitude bei < 200 nm deuteten auf einen dominierenden α -helikalen Strukturanteil in den PABPN1-Varianten hin (Abbildung 10A). In Anwesenheit von 6 M GdmCl zeigten sich dagegen Amplituden, die charakteristisch für ein Spektrum eines unstrukturierten Proteins sind. Innerhalb der Varianten konnte kein Unterschied zwischen den CD-Spektren

festgestellt werden. Ein globaler Einfluss der Oligoalaninsequenz auf den Gesamtstrukturanteil von PABPN1 wurde damit ausgeschlossen. Die Ergebnisse ergänzten und bestätigten vorangegangene strukturelle Untersuchungen des Proteins [134,137].

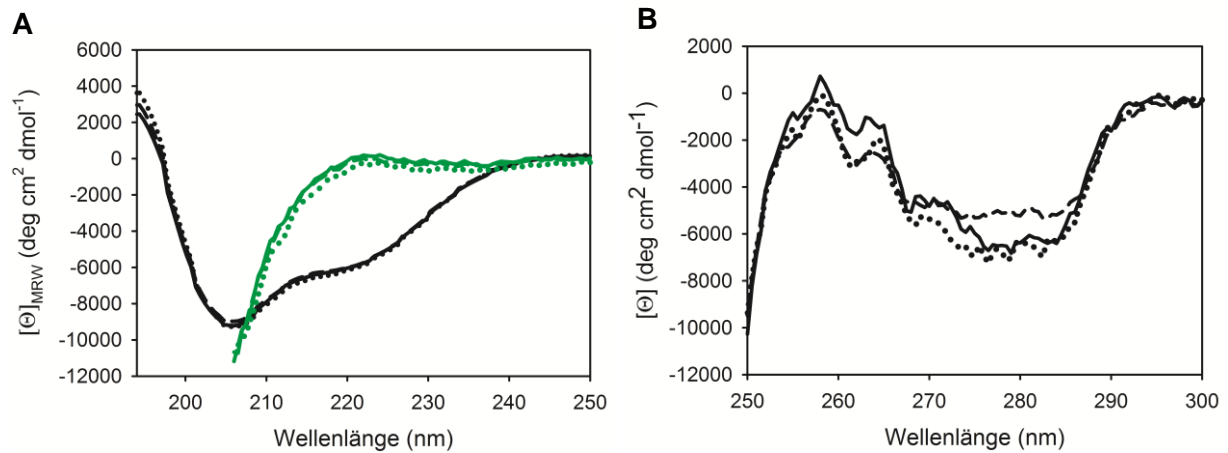


Abbildung 10. CD-Spektren der Gesamtlängen-PABPN1-Varianten im (A) Fern-UV- und (B) Nah-UV-Bereich. Die CD-Spektren der gefalteten Proteine wurden in PF-Puffer (schwarze Linien), die der entfaltenen Proteine in denaturierendem Puffer (grüne Linien) aufgenommen. WT-PABPN1 (durchgezogene Linie), Δ Ala-PABPN1 (gepunktete Linie), (+7)Ala-PABPN1 (gestrichelte Linie). Die Messungen erfolgten bei 20 °C in PF-Puffer; denaturierender Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,9, 6 M GdmCl.

Weitere Aussagen über den Faltungszustand lassen sich anhand der aromatischen Aminosäuren treffen. Hierfür wurde im Absorptionsbereich der aromatischen Aminosäuren der Circular Dichroismus bestimmt (Abbildung 10B). Die Nah-UV-CD-Spektren zeigen den charakteristischen Fingerabdruck eines Proteins. Der Verlauf ist nur schwer vorhersagbar und erlaubt nur bedingt Aussagen über den Faltungszustand eines Proteins. Eine breite Amplitude im Wellenlängenbereich 265–285 nm beschrieb die Tertiärkontakte der aromatischen Aminosäuren innerhalb des Proteins. Da sich 18 der 19 aromatischen Aminosäuren in der Sequenz der letzten 130 Aminosäurereste von PABPN1 befinden, konnte lediglich die Aussage getroffen werden, dass in diesem Bereich Tertiärkontakte vorhanden waren. Zudem war bereits bekannt, dass die isolierte N-terminale Region von PABPN1 nativ ungefaltet vorliegt, hier also keine Tertiärkontakte vorhanden sind [110]. Für die drei PABPN1-Varianten waren keine großen Unterschiede in den Nah-UV-CD-Spektren festzustellen.

Intrinsische Fluoreszenz aromatischer Aminosäuren

Um weitere Informationen über den Faltungszustand der Proteine in PF-Puffer zu erhalten, wurden Fluoreszenzspektren aufgenommen (siehe 2.2.3.8). Die Spektren erlauben Aussagen über die chemische Umgebung und somit die Exposition der aromatischen Aminosäuren. Die Fluoreszenzspektren in PF-Puffer unterschieden sich dabei deutlich von den in denaturierendem Puffer aufgenommenen Spektren, eine Beobachtung, die ebenfalls auf einen gefalteten Zustand der Proteine in PF-Puffer hindeutete.

In Abbildung 11A sind die Fluoreszenzspektren unter Verwendung einer Anregungswellenlänge von 280 nm dargestellt. Durch Entfaltung des Proteins verschob sich dabei das Fluoreszenzmaximum bathochrom um 10 nm. Die Fluoreszenzspektren der entfalteten Proteine zeigten ein Intensitätsmaximum bei 358 nm, die der gefalteten ein Maximum bei 348 nm. Die Verlagerung des Fluoreszenzmaximums zu größeren Wellenlänge ist mit einer zunehmend polaren Umgebung der Chromophore zu erklären. Zudem war eine ausgeprägte Schulter der Proteine im denaturierten Zustand unterhalb von 320 nm zu beobachten. Die Schulter spiegelte das Maximum des Fluoreszenzspektrums der Tyrosinreste wider. In den meisten Proteinen wird das Emissionsspektrum der Tyrosinreste von dem der Tryptophanreste überlagert, da Tryptophan einen weitaus größeren molaren Extinktionskoeffizienten aufweist ($\epsilon_{280}(\text{Tyr}) = 1280 \text{ (M}\cdot\text{cm)}^{-1}$; $\epsilon_{280}(\text{Trp}) = 5690 \text{ (M}\cdot\text{cm)}^{-1}$) [128]. Da PABPN1 zehn Tyrosinreste und einen Tryptophanrest besitzt, konnten die Maxima der Fluoreszenzspektren getrennt voneinander detektiert werden. Im gefalteten Zustand von PABPN1 war die Schulter unterhalb von 320 nm kaum noch zu beobachten. Der Sachverhalt könnte mit einer Energiekopplung zwischen den Tyrosinresten und dem Tryptophanrest zu erklären sein. Es liegt demnach nahe, dass sich im gefalteten Zustand die Tyrosine in Nachbarschaft zu dem Tryptophanrest anordnen und so einen hydrophoben *cluster* bilden. Somit wäre ein Energietransfer von den Tyrosinen auf den Tryptophanrest möglich und würde die Intensitätsabnahme bei 320 nm im gefalteten Zustand erklären. Im entfalteten Zustand fand eine Entkopplung statt, das heißt, der Energietransfer zwischen den Tyrosinen und dem Tryptophanrest ist nun weitaus geringer und es bildet sich ein lokales Maximum bei 308 nm aus, welches die Tyrosinfluoreszenz repräsentiert.

Bei Anregung der Probe mit Licht einer Wellenlänge von 295 nm wird überwiegend der Tryptophanrest (Trp302) angeregt. In PF-Puffer resultierte die Anregung in einem Emissionsmaximum von 352 nm, welches in denaturierendem Puffer zu 359 nm verschoben wurde. Die bathochrome Verschiebung um 7 nm im denaturierten Zustand ist auf eine stärkere Lösungsmittelexposition des Tryptophanrestes zurückzuführen und deutet somit auf ein gefaltetes Protein in PF-Puffer hin.

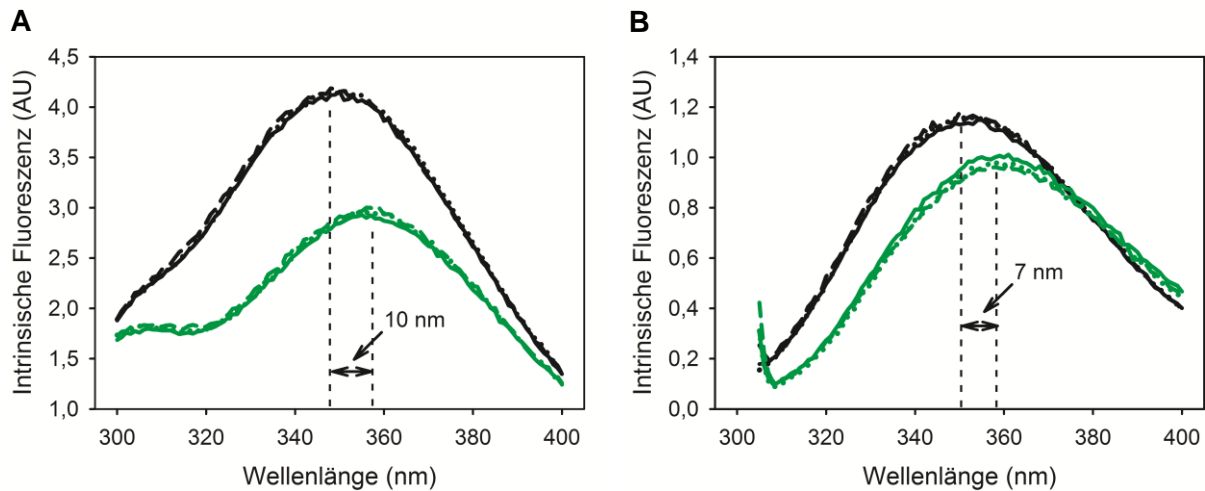


Abbildung 11. Intrinsische Fluoreszenz der PABPN1-Varianten nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von (A) 280 nm und (B) 295 nm. Spektren gemessen in PF-Puffer (schwarz) und denaturierendem Puffer (grün) von WT-PABPN1 (durchgezogene Linie), Δ Ala-PABPN1 (gepunktete Linie) und (+7)Ala-PABPN1 (gestrichelte Linie). Die Messung der Spektren erfolgte bei 20 °C in PF-Puffer; denaturierender Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,9, 6 M GdmCl.

3.1.2.3 Untersuchung der RNA-Bindungsaffinität

PABPN1 interagiert mit der Polyadenylatsequenz von *messenger* RNA. Eine hochaffine Interaktion im unteren nanomolaren Bereich ist hierbei nur dann gegeben, wenn sowohl die RNA-Erkennungsdomäne (*RNA recognition motif*, RRM) als auch die daran C-terminal angrenzenden 30 Aminosäuren den richtigen Faltungszustand besitzen [107]. Mithilfe eines Oligoadenylat-Bindungsassays konnte der Faltungszustand dieser an der RNA-Bindung beteiligten Regionen untersucht werden. Die Bindungsstudien wurden in Form eines Nitrozellulosefilter-Bindungsassays unter Verwendung von 5'-markierter Oligo-(A)-RNA (Oligoadenylat bestehend aus 14 Nukleotiden) durchgeführt (siehe 2.2.3.5).

Das Titrationsexperiment in Abbildung 12 zeigt eine Sättigungskurve, die anschließend durch eine doppelt reziproke Auftragung nach LINEWEAVER-BURK ausgewertet wurde [99,138]. Die berechneten Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten (K_D) sind in Tabelle 24 aufgeführt. Für alle drei PABPN1-Varianten konnten K_D -Werte von ca. 3–6 nM erhalten werden, die sehr gut mit den in der Literatur beschriebenen K_D -Werten von 2–8 nM übereinstimmten [99,107].

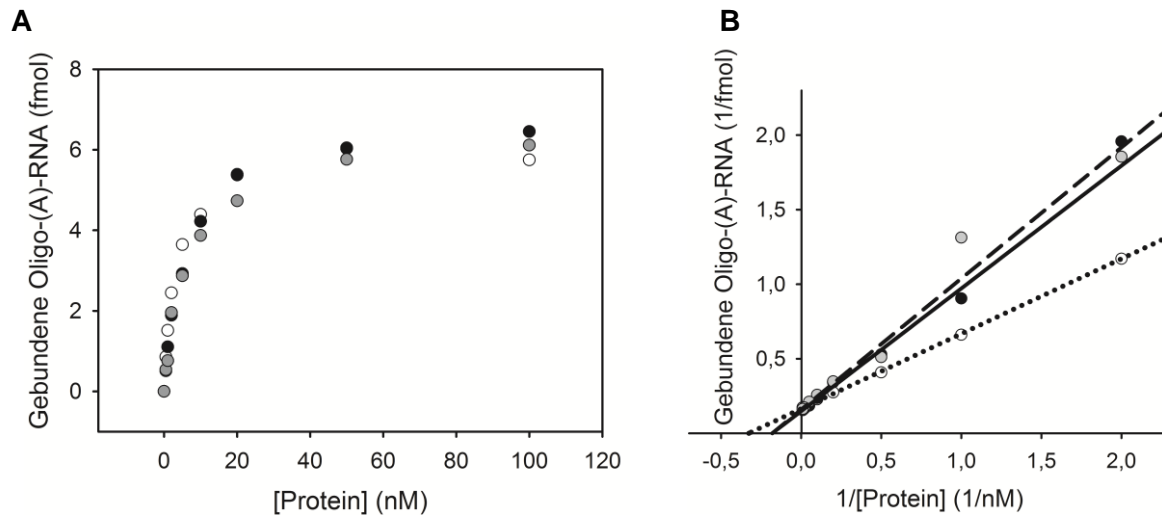


Abbildung 12. Filterbindungsassay. WT-PABPN1 (●, durchgezogene Linie), ΔAla-PABPN1 (○, gepunktete Linie) und (+7)Ala-PABPN1 (●, gestrichelte Linie) (A) Direkte Auftragung der Daten des Titrationsexperimentes. (B) Doppelt-reziproke Auftragung nach LINEWEAVER-BURK zur Ermittlung der Dissoziationsgleichgewichtskonstante (K_D). Als Oligo-(A)-RNA wurde eine RNA bestehend aus 14 Adenylat-Nukleotiden verwendet.

Tabelle 24: Dissoziationskonstanten (K_D) der PABPN1-Varianten bei Bindung von RNA bestehend aus 14 Adenylat-Nukleotiden (A14-RNA). Die K_D -Werte wurden aus der linearen Regression der doppelt-reziproken Auftragung nach LINEWEAVER-BURK berechnet. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) beschreibt die Varianz der Regression.

Protein	K_D für A14-RNA	R^2
WT-PABPN1	5,5 nM	0,995
ΔAla-PABPN1	3,1 nM	0,989
(+7)Ala-PABPN1	5,5 nM	0,962

3.1.3 Charakterisierung des fibrillären Zustandes

3.1.3.1 Fibrillenbildung in Abwesenheit von *Seeds*

Die Analyse der Fibrillenbildung von Gesamtlängen-PABPN1 erfolgte durch den Fluoreszenzfarbstoff Thioflavin T (ThT) (siehe 2.2.3.11). Der ThT-Bindungsassay stellt eine Standardmethode zur Detektion amyloider Fibrillen dar [139]. Die Wechselwirkung von ThT mit amyloiden Strukturen resultiert in einer erhöhten Lichtemission des Fluoreszenzfarbstoffes nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 450 nm. Ein Maximum des Fluoreszenzspektrums in Anwesenheit von Fibrillen ist bei ca. 482 nm zu beobachten (Abbildung 13). Deshalb wurde die Fluoreszenzintensität bei dieser Wellenlänge zur Analyse der Kinetik der Fibrillenbildung herangezogen.

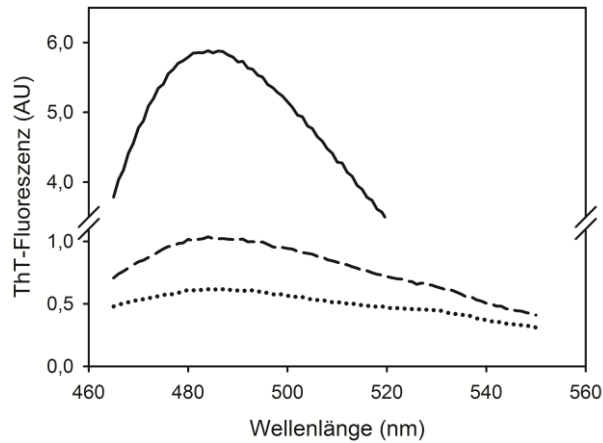


Abbildung 13. Änderung des Thioflavin T-Fluoreszenzspektrums bei Wechselwirkung mit amyloiden Strukturen. Abgebildet ist das ThT-Fluoreszenzspektrum ohne Protein (gepunktete Linie), in Anwesenheit von monomerem (+7)Ala-PABPN1 (gestrichelte Linie) und von fibrillärem (+7)Ala-PABPN1 nach 20 d Inkubation. Die Spektren wurden bei 20 °C mit 50 μ M ThT und 2 μ M Protein in PF-Puffer aufgenommen.

Die Fibrillenbildung der Gesamtlängen-Varianten erfolgte in PF-Puffer bei einer Proteinkonzentration von 60 μ M und 20 °C. Die aufgezeichneten Kinetiken sind in Abbildung 14 dargestellt und zeigten einen hyperbolen Verlauf. Einer exponentiellen Zunahme der Fluoreszenzintensität folgte ein Plateau ab ca. 15 Tagen. Eine Inkubation über diesen Zeitraum hinaus führte zu keiner weiteren Änderung der ThT-Fluoreszenzintensität. Unabhängig von der Oligoalaninsequenz wurde für alle drei PABPN1-Varianten die gleiche Kinetik aufgenommen. Die Variante ohne N-terminale Alaninsequenz (Δ Ala-PABPN1) zeigte die gleiche Kinetik wie WT-PABPN1 und die expandierte Variante (+7)Ala-PABPN1. Ein Einfluss der Oligo-alaninsequenz auf die Fibrillierungskinetik konnte damit unter den gesetzten Bedingungen (Puffer, Temperatur, Proteinkonzentration) ausgeschlossen werden. Um die Bildung von fibrillärem Protein zu bestätigen, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen der Fibrillierungsansätze angefertigt (Abbildung 15). Für alle drei PABPN1-Varianten konnten fibrilläre, unverzweigte Strukturen beobachtet werden. Die unterschiedliche Kontrastierung der Proben in Abbildung 15 kann dabei auf die unterschiedlich starke Anlagerung von Uranylacetat an das absorbierte Protein zurückgeführt werden.

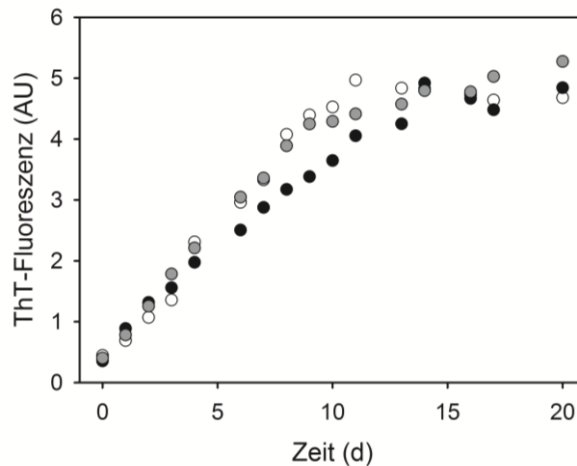


Abbildung 14. Fibrillenbildung von Gesamtlängen-PABPN1. WT-PABPN1 (●), ΔAla-PABPN1 (○) und (+7)Ala-PABPN1 (◐). Die Fibrillenbildung erfolgte bei 20 °C und einer Proteinkonzentration von 60 μM in PF-Puffer (Tabelle 18). In dem Graphen ist die Änderung der ThT-Fluoreszenzintensität bei 482 nm gegen die Inkubationszeit des Fibrillierungsansatzes aufgetragen.

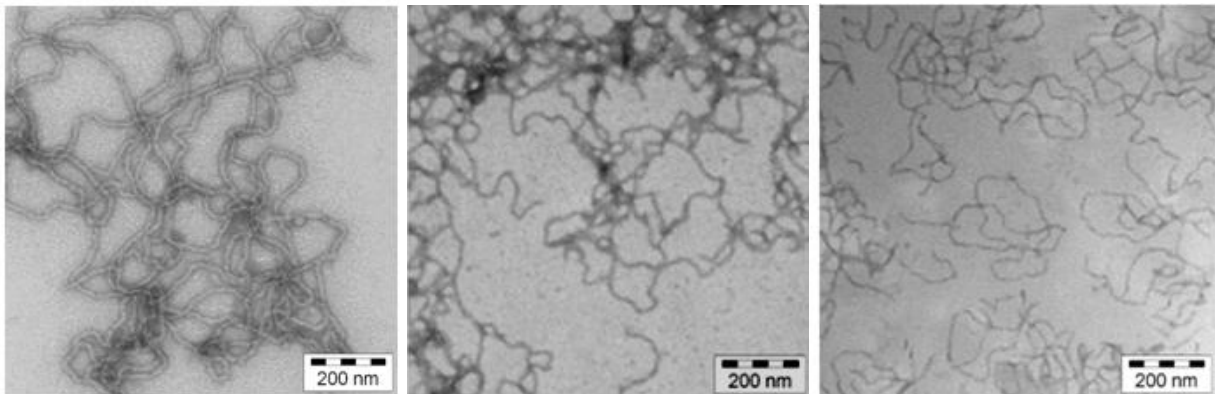


Abbildung 15. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von fibrillärem Gesamtlängen-PABPN1 nach einer Inkubationszeit von 21 d bei 20 °C. WT-PABPN1 (links), ΔAla-PABPN1 (mittig), (+7)Ala-PABPN1 (rechts).

3.1.3.2 Fibrillenbildung in Anwesenheit von *Seeds*

In den meisten Fällen kann die Bildung von amyloiden Fibrillen durch die Zugabe von *seeds* (Fibrillenbruchstücke) beschleunigt werden [23,24]. Um den Einfluss von *seeds* auf das Fibrillierungsverhalten von Gesamtlängen-PABPN1 zu untersuchen, wurden unterschiedliche Mengen an *seeds* zu dem monomeren Protein gegeben und erneut die Kinetik der Fibrillenbildung untersucht. Die *seeds* stammten dabei von Fibrillen der N-terminalen Region (Aminosäuren 1–125) von PABPN1 [133].

Die Kinetiken in Abbildung 16 (A–C) ließen keinen Einfluss der heterologen *seeds* auf die Fibrillenbildung von Gesamtlängen-PABPN1 erkennen. Die initialen Anstiege der Kinetiken waren nahezu gleich. Ein Plateau bildete sich ebenso bei allen Proben ab ca. 15 Tagen aus.

Die leicht erhöhte ThT-Fluoreszenzintensität bei *seed*-Zugabe wurde vermutlich durch die *seeds* selbst verursacht, da diese ja stark verkürzte fibrilläre Strukturen darstellen.

Mittels Elektronenmikroskopie wurden die Proben auf Anwesenheit von Fibrillen untersucht. In Abbildung 17 sind Aufnahmen von fibrillärem Protein gezeigt, welches sich in Anwesenheit von 10% (w/w) *seeds* gebildet hatte. Beim Vergleich der Morphologie von Fibrillen, die in An- oder Abwesenheit von *seeds* gebildet wurden, konnten nur geringfügige Unterschiede festgestellt werden (Vergleich mit Abbildung 15): Unter beiden Bedingungen bildeten sich lange, unverzweigte fibrilläre Strukturen aus, die sich in Anwesenheit von *seeds* scheinbar zu kompakteren Strukturen zusammenlagerten.

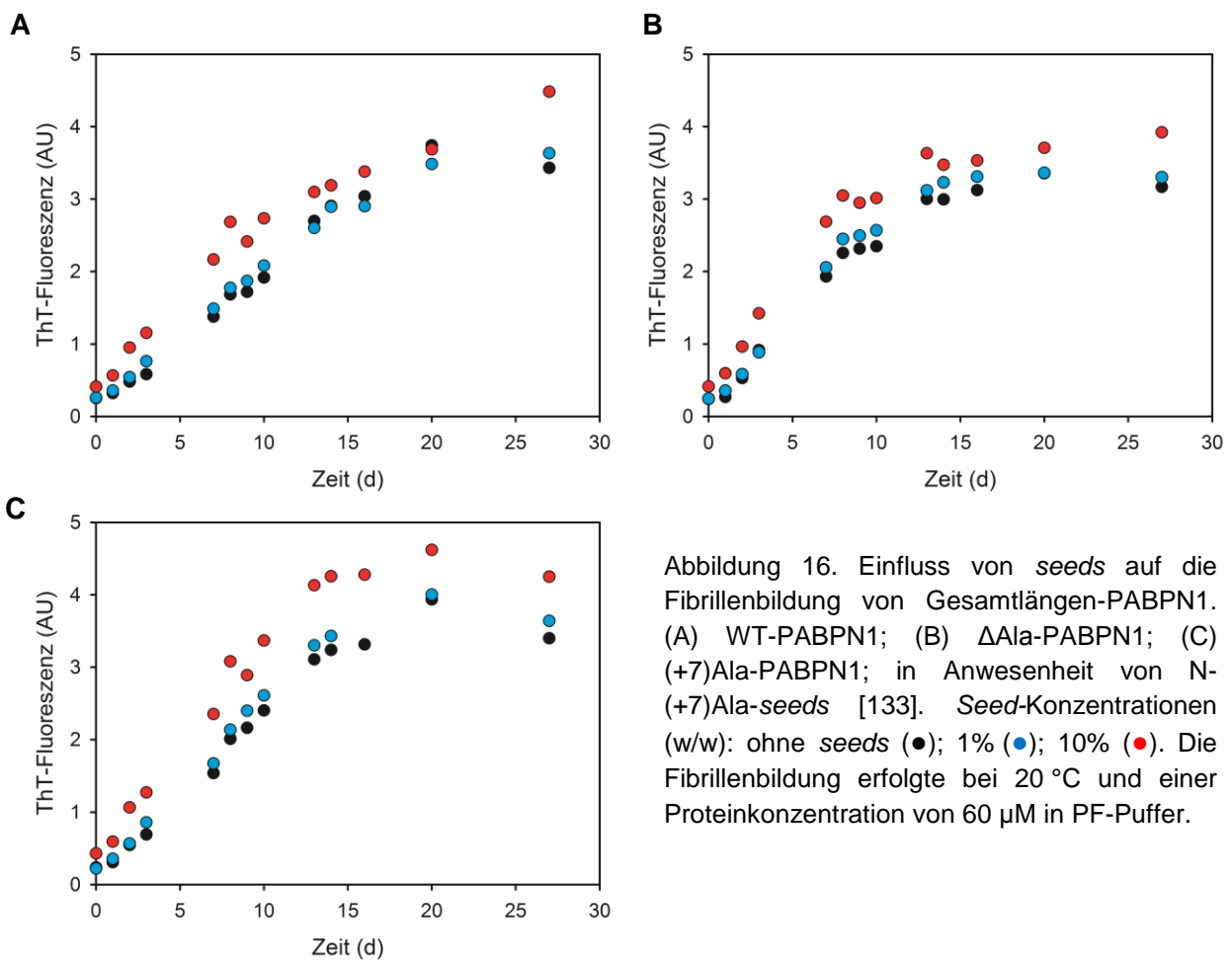


Abbildung 16. Einfluss von *seeds* auf die Fibrillenbildung von Gesamtlängen-PABPN1. (A) WT-PABPN1; (B) Δ Ala-PABPN1; (C) (+7)Ala-PABPN1; in Anwesenheit von N-(+7)Ala-*seeds* [133]. *Seed*-Konzentrationen (w/w): ohne *seeds* (●); 1% (●); 10% (●). Die Fibrillenbildung erfolgte bei 20 °C und einer Proteinkonzentration von 60 μ M in PF-Puffer.

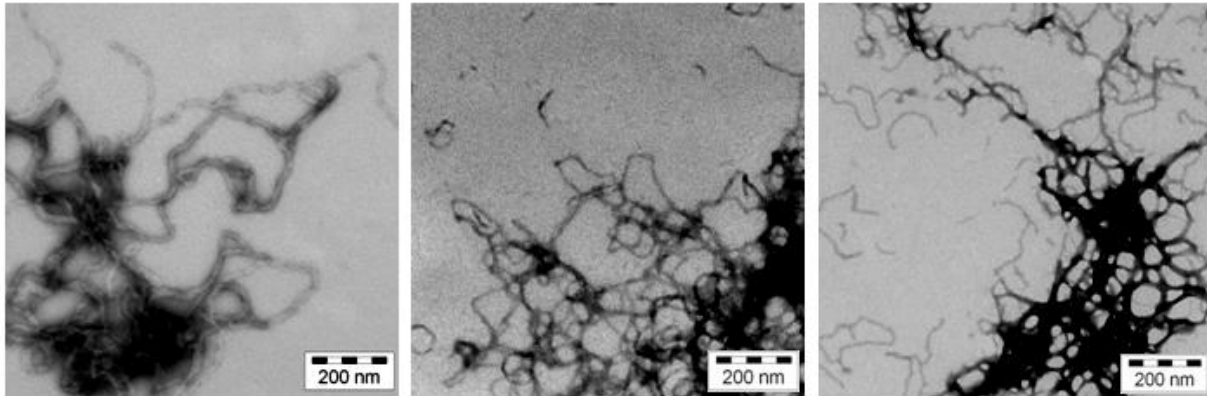


Abbildung 17. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von fibrillärem PABPN1 in Anwesenheit von 10% (w/w) *seeds*. WT-PABPN1 (links); Δ Ala-PABPN1 (mittig), (+7)Ala-PABPN1 (rechts). Die *seeds* stammten von Fibrillen der expandierten N-terminalen Region von PABPN1 (N-(+7)Ala). Aufnahmen nach Inkubation für 10 d bei 20 °C.

3.1.3.3 Untersuchung früher Phasen der Fibrillenbildung

Im Allgemeinen wird angenommen, dass die Entstehung von fibrillären Strukturen über lösliche oligomere Vorstufen verläuft [142–144]. Um die Fibrillenbildung von Gesamtlängen-PABPN1 hinsichtlich der Entstehung solcher Oligomere zu untersuchen, wurden die Fibrillierungsansätze mittels Größenausschluss-Chromatographie (SEC) untersucht. Ein Aliquot von 100 μ l wurde nach unterschiedlichen Inkubationszeiten auf eine „SEC-Säule“ (*Superdex S200*, GE Healthcare) aufgetragen und auf die Anwesenheit von Oligomeren analysiert (siehe 2.2.3.16). Die Normierung der Chromatogramme auf den internen L-Tryptophanstandard erlaubte eine Quantifizierung der Gelfiltrationsläufe (Abbildung 18).

Nach 15 min (Zeit von Probenentnahme bis zur Injektion auf die Säule) war ein prominenter Peak bei einem Elutionsvolumen von ca. 14 ml zu beobachten. Die Analyse durch SDS-PAGE bestätigte, dass die Absorption durch PABPN1 hervorgerufen wurde (nicht gezeigt). Ab einer Inkubationszeit von 12 h war deutlich ein weiteres Maximum der UV-Absorption (280 nm) bei einem Retentionsvolumen von ca. 8,5 ml zu beobachten, das zeitabhängig zunahm. Hierbei handelte es sich um höhermolekulare PABPN1-Spezies. Mit der Entstehung dieser oligomeren Spezies korrelierte eine sinkende Absorption bei einem Elutionsvolumen von 14 ml. Da das Retentionsvolumen im Ausschlussvolumen ($V_0 = 8,6$ ml) der Säule lag, konnte keine nähere Aussage über das Molekulargewicht der oligomeren Spezies getroffen werden. Es kann lediglich gesagt werden, dass die molekulare Masse > 600 kDa war. Für alle drei PABPN1-Varianten wurde das gleiche Laufverhalten und eine ähnliche Flächenzunahme der UV-Absorption bei 8,5 ml (oligomere Spezies) über die Zeit

beobachtet (Abbildung 18D). Ein Einfluss der Oligoalaninsequenz auf die Entstehung von PABPN1-Oligomeren konnte somit ausgeschlossen werden. Die Absorption bei 25 ml entsprach oxidiertem Dithiothreitol (DTT), das in den Fibrillierungsansätzen akkumulierte. Das Signal bei einem Retentionsvolumen von 27 ml entsprach dem L-Tryptophanstandard.

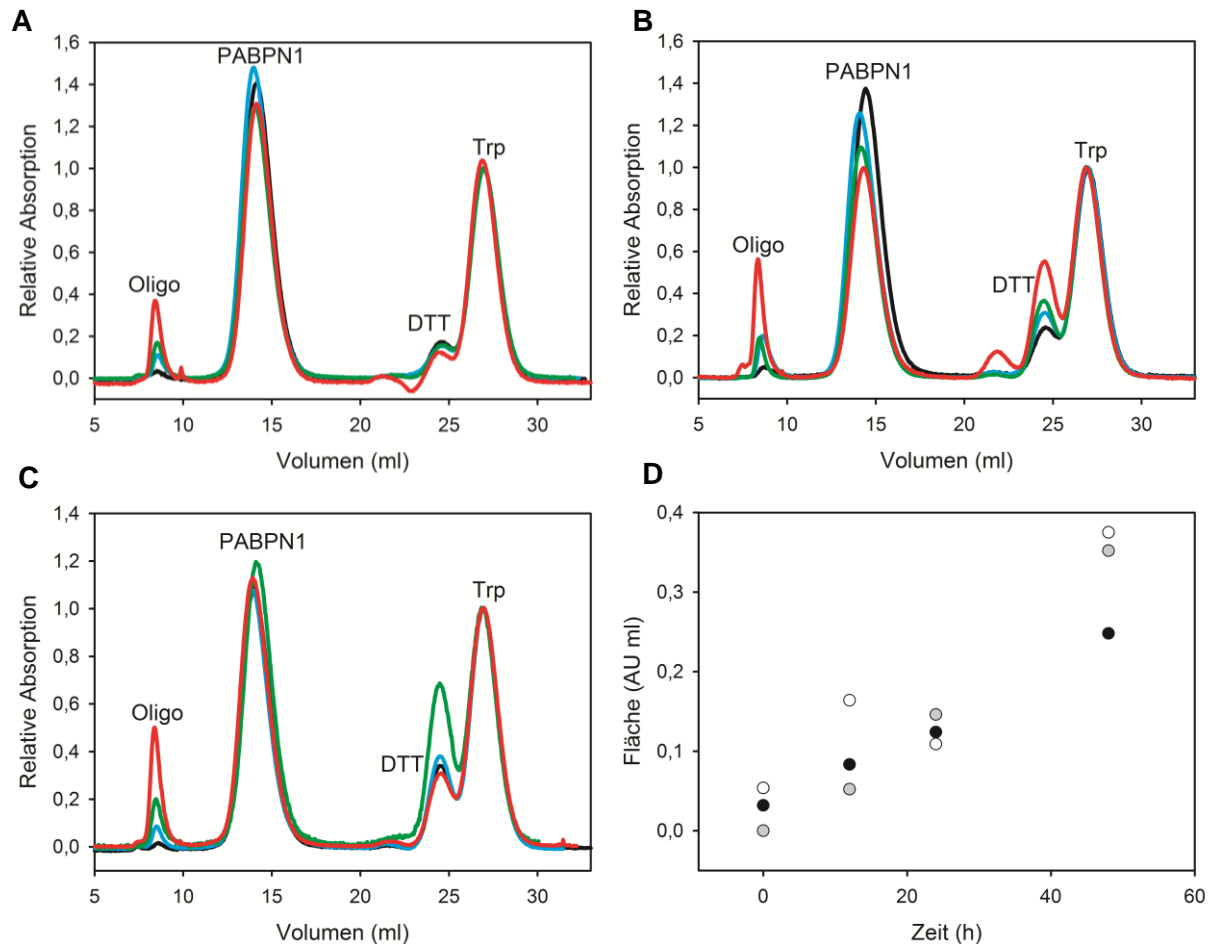


Abbildung 18. Zeitabhängige Größenausschluss-Chromatographie der Fibrillierungsansätze. WT-PABPN1 (A), Δ Ala-PABPN1 (B) und (+7)Ala-PABPN1 (C). Die Inkubation erfolgte in PF-Puffer und bei 20 °C. Nach 15 min (schwarz), 12 h (blau), 24 h (grün) und 48 h (rot) wurde ein Aliquot der Fibrillierungsansätze mit einer *Superdex S200*-Säule analysiert. Lösliches (monomeres) PABPN1 (PABPN1), oligomeres PABPN1 (Oligo), oxidiertes DTT (DTT), L-Tryptophanstandard (Trp). Die Chromatogramme wurden auf die Absorption des internen Standards normiert. (D) Zeitabhängige Zunahme der Peakflächen der Oligomere.

Um zu überprüfen, ob die zunehmende Absorptionsintensität bei 8,6 ml mit der Entstehung von Fibrillen korrelierte, wurde parallel ein Aliquot der Proteinlösung auf die Bindung von Thioflavin T untersucht (nicht gezeigt). Ein Intensitätsanstieg der ThT-Fluoreszenz bei 482 nm bestätigte dabei die Bildung von Fibrillen.

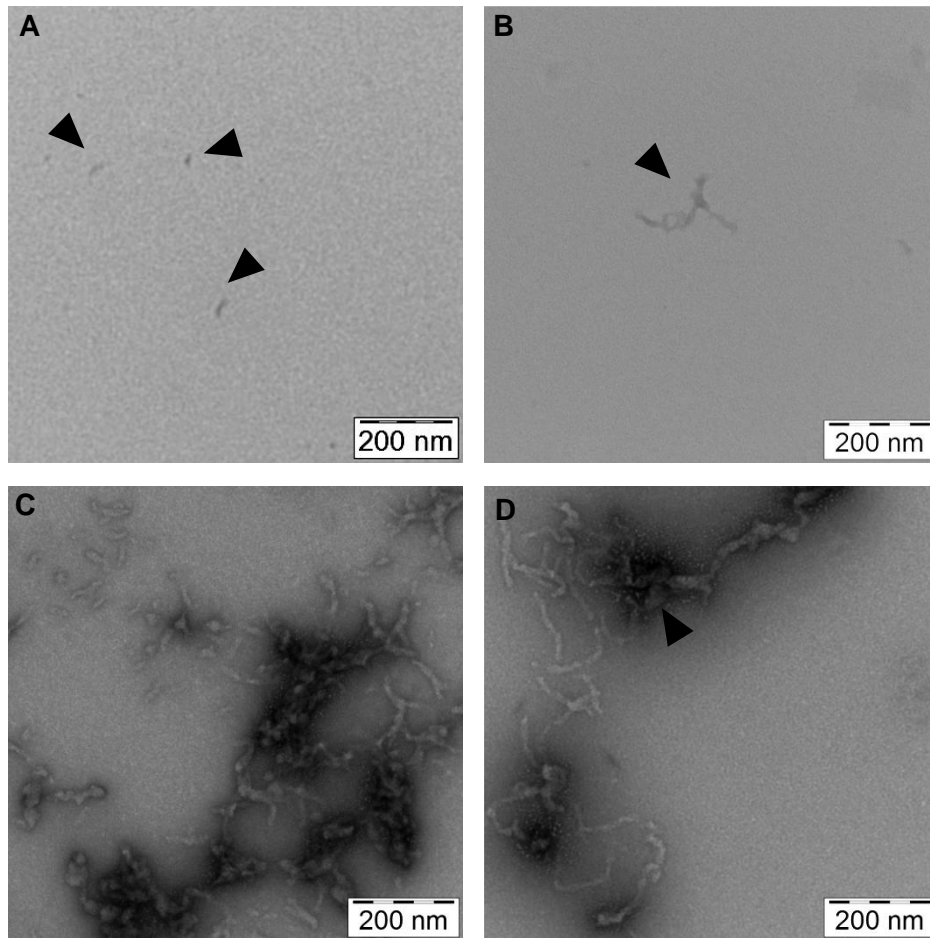


Abbildung 19. Analyse früher Phasen der Fibrillenbildung von WT-PABPN1 mittels Elektronenmikroskopie. Gezeigt sind Aufnahmen nach 15 min (A), 12 h (B), 24 h (C) und 48 h (D) im Vergleich mit Abbildung 18.

Zudem wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt, um die Proben auf die Anwesenheit „früher“ Oligomere zu untersuchen (Abbildung 19). Nach 15-minütiger Inkubation konnten, mit Ausnahme kleiner langgestreckter Gebilde, kaum Strukturen im Elektronenmikroskop detektiert werden (Abbildung 19A). Ob es sich dabei wirklich um PABPN1-Oligomere handelte, konnte nicht geklärt werden. Nach 12 h wurden erste Fibrillen beobachtet (Abbildung 19B). Die Länge der Fibrillen deutete dabei auf eine frühe Spezies hin, da die Strukturen weitaus kürzer und weniger einheitlich waren als es für Fibrillen im Plateau der Kinetik beobachtet werden konnte (Vergleich mit Abbildung 15). Nach 24 und 48 h konnten zahlreiche Strukturen detektiert werden, die zwar noch relativ kurz waren, jedoch schon eine fibrilläre Morphologie zeigten. Zudem wurden viele Bereiche gefunden, die auf eine Zusammenlagerung von weniger strukturierten Aggregaten zu Fibrillen hindeuteten (Abbildung 19D, Pfeile). Generell entstand der Eindruck, dass sich viele unterschiedliche „Fibrillenarten“ in den Präparationen befanden und könnte somit auf zahlreiche Umlagerungs- und Zusammenlagerungsprozesse während der Fibrillenbildung hindeuten.

3.1.3.4 Strukturelle Charakterisierung der Fibrillen durch Infrarotspektroskopie und Circular dichroismus-Messungen

Circular dichroismus- (CD-) Spektroskopie

Nachdem eine Umlagerung von monomerem Protein zu Fibrillen anhand Thioflavin T-Bindung und Elektronenmikroskopie festgestellt werden konnte, wurde im nächsten Schritt die Konformationsänderung spektroskopisch untersucht. Zunächst wurden Fern-UV-CD-Spektren der fibrillären Proteine aufgenommen, um eine eventuelle Änderung des Sekundärstrukturgehaltes zu bestimmen. Hierfür wurde ein Aliquot aus dem Fibrillierungsansatz entnommen und mittels CD-Spektroskopie untersucht.

Bereits nach fünf Tagen Inkubationszeit zeigte sich eine deutliche Amplitudenabnahme des CD-Signals im Bereich 200–230 nm. Aus den Differenzspektren der monomeren und der fibrillären Proteine konnte der größte Unterschied bei einer Wellenlänge von 205 nm festgestellt werden.

Minima bei ca. 222 und 209 nm, sowie ein Maximum bei 192 nm sind für einen hohen Anteil α -helikaler Strukturen im Protein typisch. Eine Abnahme der Amplituden im Bereich unterhalb von 230 nm, verglichen mit dem Spektrum der monomeren Proteine, könnte auf einen verminderten α -helikalen Strukturanteil im fibrillären Protein hindeuten. In amyloiden Fibrillen wird allgemein eine dominierende β -Faltblattstruktur angenommen [139]. In diesem Fall müsste eine Amplitudenzunahme bei ca. 218 nm und bei 196 nm zu beobachten sein. Eine derartige Änderung der CD-Spektren konnte jedoch nicht beobachtet werden (Abbildung 20).

An dieser Stelle sollte berücksichtigt werden, dass eine optische Methode wie die CD-Spektroskopie nur bedingt geeignet ist, um Proteinaggregate (Fibrillen) zu untersuchen. Es wäre auch möglich, dass die verminderte Amplitude in den CD-Spektren der fibrillären Proteine auf zunehmende Lichtstreuung zurückzuführen ist. Zur näheren Charakterisierung der fibrillären Strukturen wurden die Fibrillen mittels Infrarotspektroskopie analysiert.

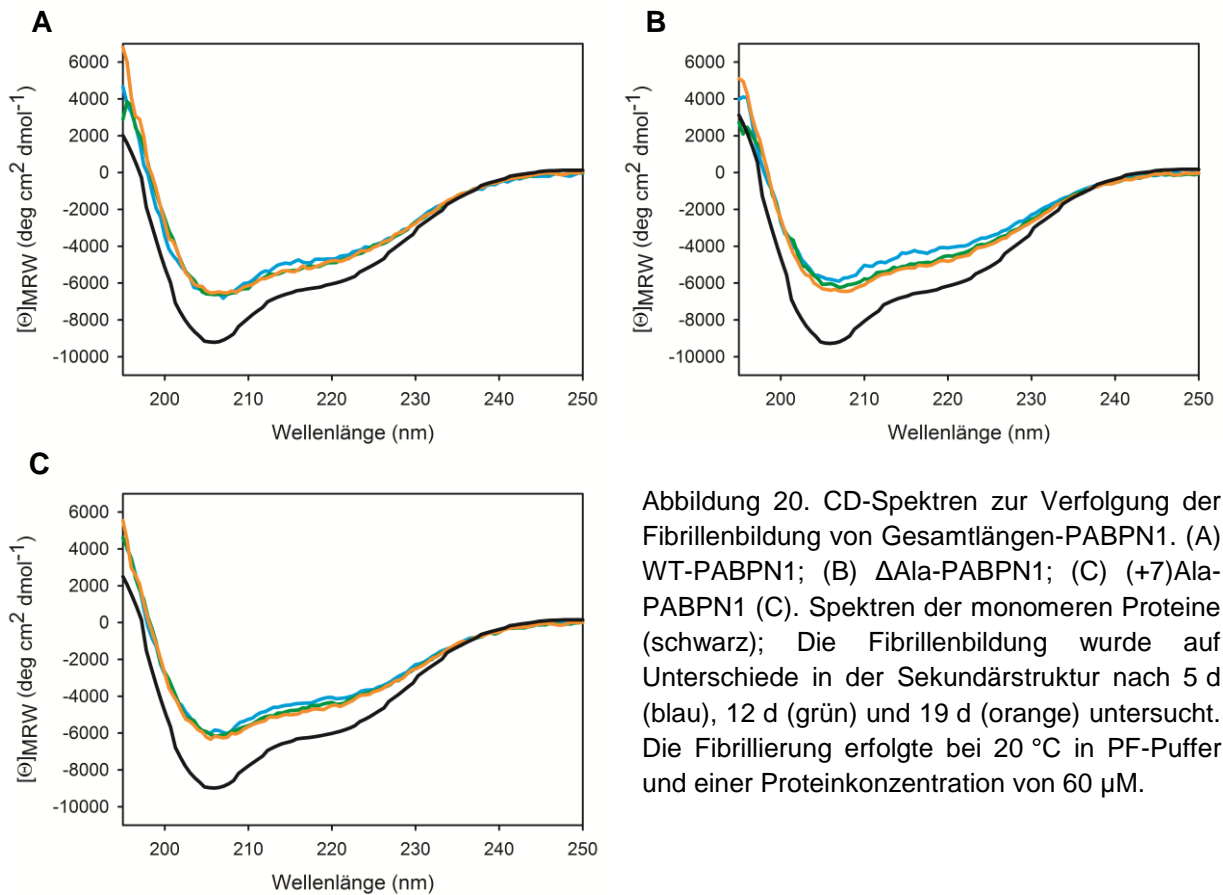


Abbildung 20. CD-Spektren zur Verfolgung der Fibrillenbildung von Gesamtlängen-PABPN1. (A) WT-PABPN1; (B) Δ Ala-PABPN1; (C) (+7)Ala-PABPN1 (C). Spektren der monomeren Proteine (schwarz); Die Fibrillenbildung wurde auf Unterschiede in der Sekundärstruktur nach 5 d (blau), 12 d (grün) und 19 d (orange) untersucht. Die Fibrillierung erfolgte bei 20 °C in PF-Puffer und einer Proteinkonzentration von 60 μ M.

Attenuated total reflectance fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR)

ATR, übersetzt abgeschwächte Totalreflexion, ist eine Methode der Infrarotspektroskopie, um lichtundurchlässige Proben wie beispielsweise Proteinaggregate (Fibrillen) zu untersuchen. Die Analyse findet an der Probenoberfläche statt. Dabei wird die Intensität des reflektierten Lichtes gemessen, welche Rückschlüsse auf die absorbierende Probe ermöglicht.

Fibrilläres Protein wurde durch Ultrazentrifugation vom löslichen Protein isoliert. Anschließend wurden die Fibrillen in PF-Puffer resuspendiert und an einem *ATR-FTIR*-Spektrometer analysiert (siehe 2.2.3.9). Monomeres Protein wurde nach Dialyse gegen PF-Puffer ultrazentrifugiert und das lösliche Protein untersucht.

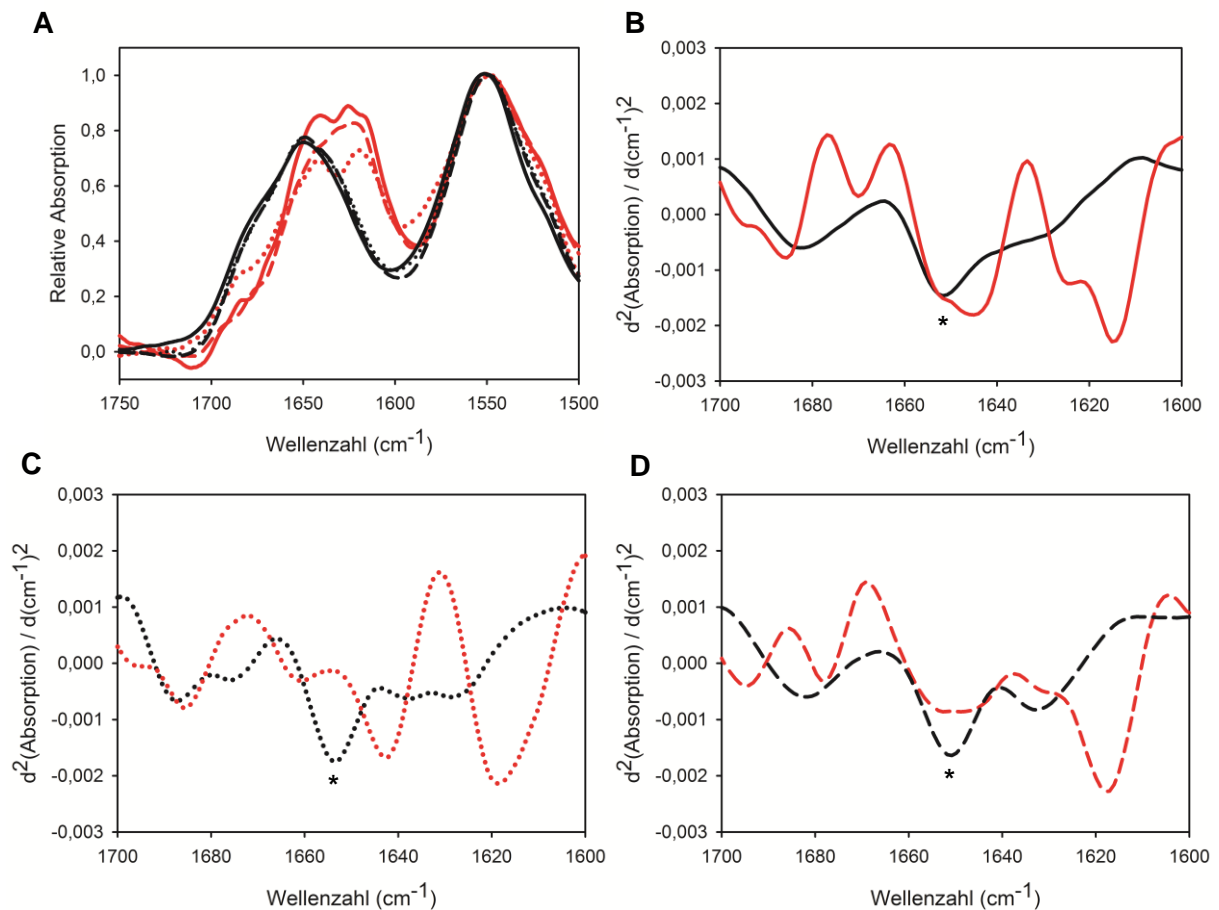


Abbildung 21. Analyse der konformationellen Umlagerung von löslichem zu fibrillärem Protein durch FTIR. (A) FTIR-Absorptionsspektren der löslichen (schwarz) und der fibrillären Proteine (rot) von WT- (durchgezogen), Δ Ala- (gepunktet) und (+7)Ala-PABPN1 (gestrichelt). (B) Zweite Ableitung der Absorptionsspektren der Amid I-Bande von WT-PABPN1 (B), Δ Ala- (C) und (+7)Ala-PABPN1 (D). Die Messungen erfolgten bei 20 °C in PF-Puffer. Die dominierende Absorption der löslichen Proteine ist mit * gekennzeichnet.

In Abbildung 21 sind die Amid I- und Amid II-Bande der FTIR-Absorptionsspektren von löslichem und fibrillärem PABPN1 abgebildet. Im Bereich von 1690–1600 cm⁻¹ (Amid I-Bande) wird die Absorption überwiegend durch C=O-Valenzschwingungen der Säureamidbindungen hervorgerufen. Dies erlaubt eine Analyse des Proteinrückgrades. Somit konnten Informationen über Sekundärstrukturanteile im Protein erhalten werden. Die Spektren der löslichen Proteine unterschieden sich kaum voneinander, hindeutend auf einen sehr ähnlichen Faltungszustand. Um kleinere Schultern in den Spektren sichtbar zu machen, wurde die zweite Ableitung der FTIR-Spektren berechnet. Aus den erhaltenen Spektren wurde die Wellenzahl der maximalen Absorption (v_{max}) der Proteine bestimmt. Für die löslichen Proteine konnte v_{max} bei 1653 cm⁻¹ (*) ermittelt werden. Absorption in diesem Wellenzahlenbereich (1650–1658 cm⁻¹) deutete auf einen überwiegenden α -helikalen Sekundärstrukturanteil im Protein hin [145]. Die FTIR-Absorptionsspektren der Fibrillen waren dagegen zu kleineren Wellenzahlen verschoben. Hohe Absorptionswerte im Bereich von 1640–1620 cm⁻¹ deuteten auf einen dominierenden β -Faltblatt-Strukturanteil hin.

3.1.3.5 Sensitivität der Fibrillen gegenüber Solubilisierung mit Guanidiniumchlorid

Eine Eigenschaft von amyloiden Fibrillen ist, im Vergleich zum löslichen Protein, eine erhöhte Resistenz gegenüber chemischen oder physikalischen Einflüssen [146–149]. So konnte beispielsweise für Fibrillen der N-terminalen Region von PABPN1 eine außergewöhnlich hohe Resistenz gegenüber Denaturierungsmitteln, wie Guanidiniumchlorid und -thiocyanat festgestellt werden [133]. Um die Sensitivität von fibrillärem Gesamtlängen-PABPN1 zu untersuchen, wurde die Disassemblierung der Fibrillen in Anwesenheit von Guanidiniumchlorid (GdmCl) analysiert (siehe 2.2.3.12). Fibrillen des Gesamtlängen-Proteins konnten durch Inkubation mit 6 M GdmCl vollständig aufgelöst werden. Eine detaillierte Analyse ist in Abbildung 22 dargestellt. Hierfür wurde fibrilläres Protein mit steigender Konzentration an GdmCl versetzt. Nach einstündiger Inkubation wurde unlösliches von löslichem, also nicht fibrilliertem Protein durch Ultrazentrifugation getrennt. Anschließend konnte die Proteinmenge im Überstand und, nach vollständiger Entfaltung mit 6 M GdmCl, die Proteinmenge in der unlöslichen Fraktion bestimmt werden.

Bis zu einer Konzentration von 1 M GdmCl wurde kein Protein in der löslichen Fraktion festgestellt. Der gesamte Proteinanteil befand sich in der unlöslichen (fibrillären) Fraktion. Mit steigender GdmCl-Konzentration konnte ein zunehmender Proteinanteil im Überstand detektiert werden, wogegen der Anteil des fibrillären Proteins abnahm. Eine einstündige Inkubation der Fibrillen mit 3 M GdmCl resultierte in einer nahezu vollständigen Solubilisierung der Fibrillen. Die GdmCl-Konzentration, bei der die Hälfte der Fibrillen aufgelöst wurde, konnte bei ca. 2 M festgestellt werden (Abbildung 22).

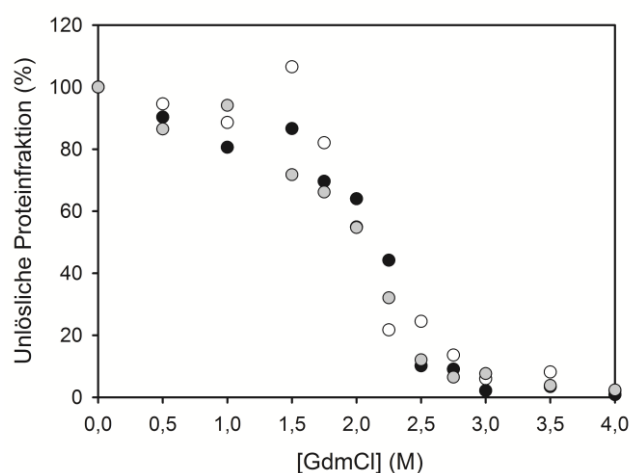


Abbildung 22. Solubilisierung von fibrillärem Gesamtlängen-PABPN1. WT-PABPN1 (●), ΔAla- (○) und (+7)Ala-PABPN1 (●). Gezeigt ist die relative Proteinmenge der unlöslichen (fibrillären) Proteinfraction nach einstündiger Inkubation mit Guanidiniumchlorid unterschiedlicher Konzentrationen.

Parallel wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen der unlöslichen Fraktionen angefertigt, um den Verlauf der Solubilisierung auf mikroskopischer Ebene sichtbar zu machen (Abbildung 23). Nach Inkubation mit 0,5 M GdmCl waren noch klar definierte fibrilläre Strukturen sichtbar. Die starke Zusammenlagerung der Fibrillen könnte aus der Sedimentation der unlöslichen Fraktion (durch Ultrazentrifugation) resultieren. Bereits leicht aufgelöste Strukturen waren nach Inkubation mit 1 M GdmCl und stark aufgelöste, nur noch sehr schwach strukturierte Gebilde nach Inkubation mit 1,25 M GdmCl sichtbar.

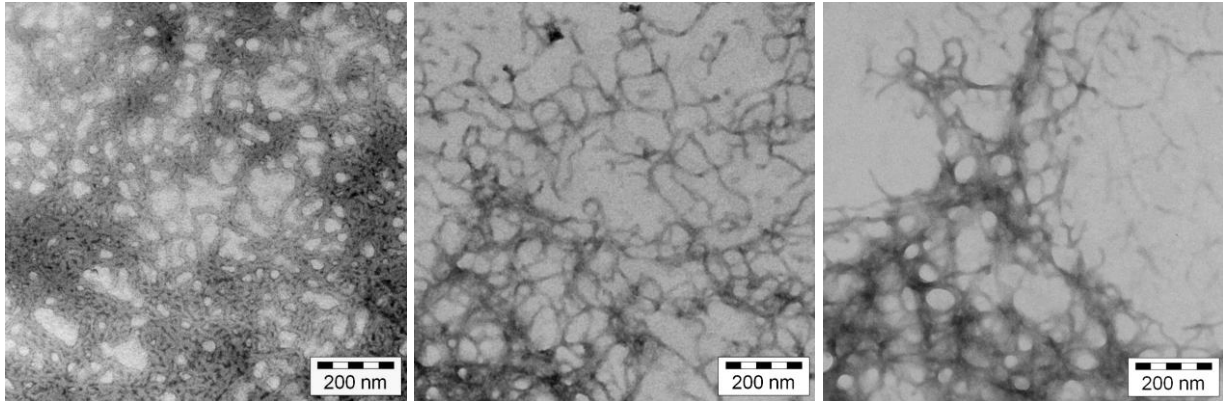


Abbildung 23. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der unlöslichen Fraktionen von WT-PABPN1 nach Solubilisierung mit Guanidiniumchlorid: 0,5 M GdmCl (links), 1 M GdmCl (mittig), 1,25 M GdmCl (rechts).

3.1.3.6 Analyse des fibrillären Proteins hinsichtlich der RNA-Bindungsaffinität

An der hochaffinen Bindung von RNA durch PABPN1 sind die RRM-Domäne (*RNA recognition motif*) und die C-terminal folgenden 30 Aminosäuren beteiligt [107]. Eine veränderte Bindungsaffinität zu Oligo-(A)-RNA sollte somit Rückschlüsse auf eine konformationelle Umlagerung während der Fibrillenbildung in diesem Bereich ermöglichen.

Für die RNA-Bindungsstudien wurde fibrilläres Protein von löslichem durch Ultrazentrifugation abgetrennt. Zunächst wurde untersucht, ob ein Gleichgewicht zwischen löslichem und fibrillärem Protein bestand, das zu einer Dissoziation der Fibrillen nach Isolation führen könnte. Hierfür wurde die isolierte, fibrilläre Fraktion 2 h in PF-Puffer inkubiert und anschließend erneut die unlösliche Fraktion durch Ultrazentrifugation isoliert und der Proteinanteil bestimmt. Annähernd die gesamte Fibrillenmenge konnte nach Inkubation wieder in der unlöslichen Fraktion erhalten werden (Abbildung 24A). Die Fibrillen dissoziierten demnach nicht über den Zeitraum, der für die RNA-Bindungsstudien notwendig ist. Eine RNA-Bindung durch dissoziiertes, monomeres Protein kann damit ausgeschlossen werden.

Um die exakte Proteinkonzentration für den Bindungsassay zu ermitteln, wurde ein Aliquot der Fibrillen in 6 M GdmCl solubilisiert und die Proteinkonzentration bestimmt. Die Bindungsaffinität für Oligo-(A)-RNA wurde anschließend durch den Filterbindungsassay untersucht (siehe 2.2.3.5).

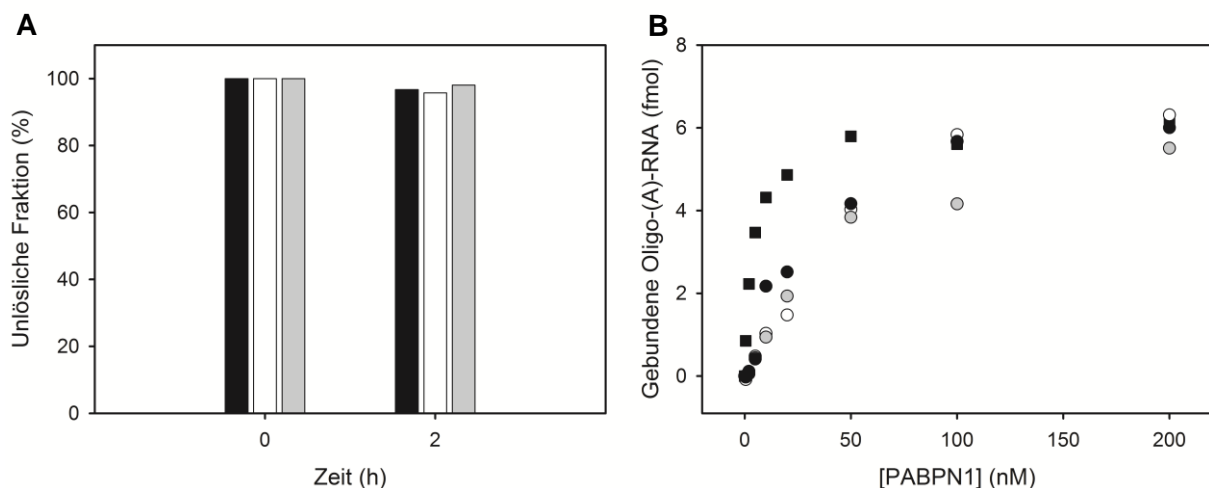


Abbildung 24. Filterbindungsassay der Fibrillen von Gesamtlängen-PABPN1. WT-PABPN1 (●, schwarzer Balken), Δ Ala- (○, weißer Balken) und (+7)Ala-PABPN1 (◐, grauer Balken). (A) Analyse der Beständigkeit der Fibrillen. (B) RNA-Filterbindungsassay. Als Kontrolle wurde lösliches WT-PABPN1 (■) analysiert.

Aus dem Titrationsexperiment ging hervor, dass die fibrillären PABPN1-Varianten Oligo-(A)-RNA binden konnten (Abbildung 24B). Die Bestimmung der K_D -Werte resultierte jedoch in Bindungskonstanten, die um eine Zehnerpotenz höher lagen als die der löslichen Proteine. Die geringere Affinität könnte auf eine Konformationsänderung der RRM-Domäne oder der C-terminalen Region von PABPN1 hindeuten.

Ferner wurde die Spezifität der RNA-Bindung getestet, um eine mögliche unspezifische Assoziation der RNA mit positiv geladenen Bereichen auf der Proteinoberfläche auszuschließen. Hierfür wurde die Bindung der Oligoadenylat-RNA mit rRNA und tRNA kompetiert. Die Bindungsspezifität der unlöslichen Proteine war mit löslichem Protein vergleichbar (siehe 5.2).

3.1.3.7 Limitierte Proteolyse zur Analyse der konformationellen Umlagerung

Um weitere Informationen zur konformationellen Umlagerung zu erhalten, wurden die löslichen und fibrillären Proteine einer limitierten Proteolyse unterzogen (siehe 2.2.3.4). Hierbei wurden zwei unterschiedliche Proteasen verwendet. Zum einen eine spezifische Protease, Trypsin, die C-terminal nach den basischen Aminosäuren L-Lysin und L-Arginin spaltet und zum anderen Proteinase K, die substratunspezifisch ist. Die Proteasen wurden im Überschuss zu den PABPN1-Varianten eingesetzt. Das Massenverhältnis zwischen Protease zu Protein betrug bei Trypsin 1:600, bei Proteinase K 1:1000. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurde die Hydrolyse abgestoppt und die Proben mithilfe SDS-PAGE analysiert (Abbildung 25). Anhand der Proteolysemuster konnten Rückschlüsse auf die Substratzugänglichkeit und damit auf Konformationsunterschiede der PABPN1-Varianten gezogen werden. Wie in Abbildung 25 zu sehen ist, ergaben lösliches und fibrilläres Protein unterschiedliche Proteolysemuster. Allgemein konnte festgestellt werden, dass bei fibrillärem Protein höhermolekulare Hydrolyseprodukte entstanden als bei löslichem PABPN1. Diese Aussage ist für beide Proteasen und alle drei PABPN1-Varianten gültig.

Hydrolyse mit Trypsin

Bei der Hydrolyse des löslichen Proteins mit Trypsin wurde ein rascher Abbau zu niedermolekularen Proteinfragmenten beobachtet (Abbildung 25, linke Spalte). Dabei fiel auf, dass proteolyseresistente Fragmente bei 18 und 14 kDa akkumulierten und nach dreistündiger Inkubation kaum noch höhermolekulare Fragmente zu beobachten waren (Abbildung 25; linke Spalte, Spur 5). In vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte die 14 kDa-Bande der RRM-Domäne von PABPN1, die 18 kDa-Bande der RRM-Domäne mit N-terminalem α -helikalen Segment zugeordnet werden [134].

Unabhängig von der Länge der N-terminalen Alaninsequenz zeigten die löslichen PABPN1-Varianten das gleiche Proteolysemuster. Die Alaninfusion hatte somit keinen Einfluss auf die Substratzugänglichkeit von Trypsin.

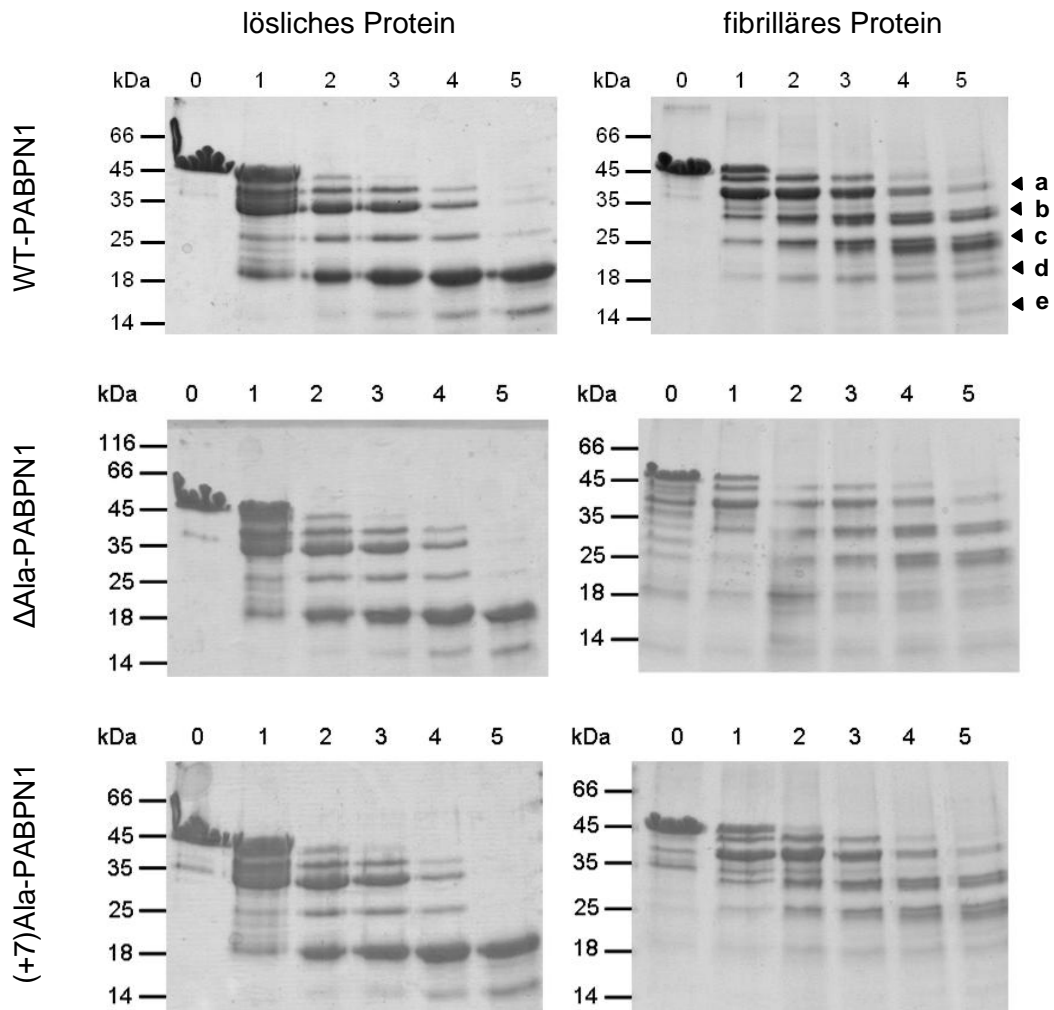


Abbildung 25. SDS-PA-Gele der limitierten Proteolyse von Gesamtlängen-PABPN1 mit Trypsin. Die Ergebnisse der Hydrolyse der löslichen Proteine sind links, die der fibrillären Proteine rechts abgebildet. Die Proteolyse erfolgte im Massenverhältnis 1:600 (Protease zu Protein) bei 20 °C in PF-Puffer. Die Reaktionen wurden nach 10 min (1), 30 min (2), 1 h (3), 2 h (4) und 3 h (5) abgestoppt. Als Kontrolle wurde ein Aliquot vor Zugabe der Protease (0) aufgetragen. Die durch Massenspektrometrie analysierten Banden sind mit a-e gekennzeichnet (Vergleiche mit Abbildung 27).

Im Gegensatz dazu konnte bei der Hydrolyse der fibrillären Proteine ein verändertes Proteolysemuster festgestellt werden (Abbildung 25; rechte Spalte). Banden bei 14 und 18 kDa waren kaum erkennbar, wogegen höhermolekulare Banden bei ca. 25 und 30 kDa vorhanden waren. Die Entstehung dieser Fragmente lässt den Schluss zu, dass Aminosäurereste, die ein Substrat für die Protease darstellten, in der fibrillären Struktur in für Trypsin unzugänglichen, womöglich eng gepackten Bereichen lagen.

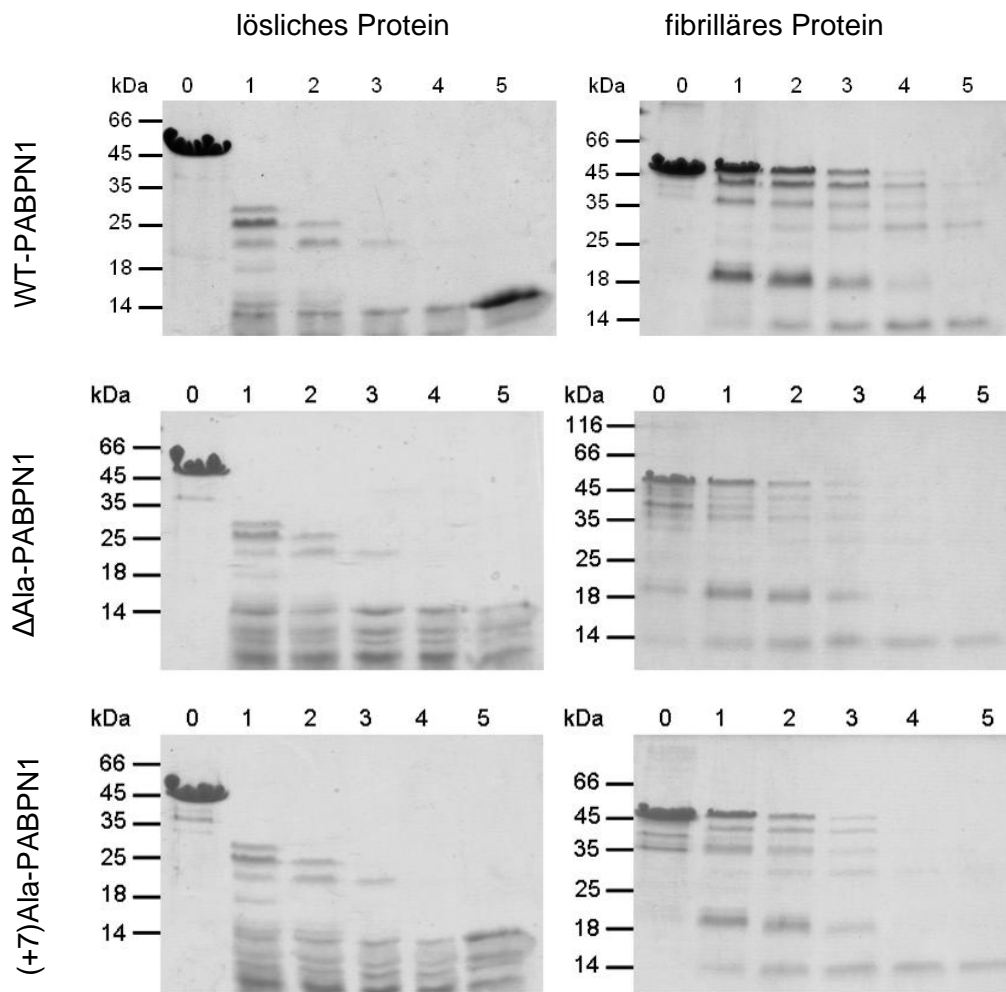


Abbildung 26. SDS-PA-Gele der limitierten Proteolyse von Gesamtlängen-PABPN1 mit Proteinase K. Die SDS-PA-Gele der Hydrolyse der monomeren Proteine sind links, die der fibrillären Proteine rechts dargestellt. Die Proteolyse erfolgte im Massenverhältnis 1:1000 (Protease zu Protein) bei 20 °C in PF-Puffer. Die Reaktionen wurden nach 10 min (1), 30 min (2), 1 h (3), 2 h (4) und 3 h (5) abgestoppt. Als Referenz wurde ein Aliquot ohne Protease (0) aufgetragen.

Hydrolyse mit Proteinase K

Bei der Proteolyse mit der unspezifischen Protease, Proteinase K, zeigten die löslichen Proteine ebenfalls vergleichbare Proteolysemuster: Bereits nach einer Inkubationszeit von 10 min konnte keine Proteinbande mehr bei 50 kDa (intaktes Protein) detektiert werden. Nach zweistündiger Inkubation waren lediglich Proteinbanden < 14 kDa zu beobachten (Abbildung 26; linke Spalte). Ein Einfluss der Oligoalaninsequenz auf eine veränderte Zugänglichkeit der Protease konnte ausgeschlossen werden.

Bei fibrillärem Protein wurde dagegen erneut eine veränderte Substratzugänglichkeit festgestellt, die auf eine konformationelle Umlagerung zu einer kompakteren Struktur in der Fibrille hindeutete (Abbildung 26; rechte Spalte). Sogar nach einstündiger Inkubation mit Proteinase K war noch eine schwache Bande bei 50 kDa erkennbar, die nicht-

hydrolysiertem Protein entsprach. Wurden die Fibrillen 2 h mit der Protease inkubiert, konnte eine proteolysebeständige Bande bei 14 kDa beobachtet werden. Dieses Proteinfragment wurde nach dreistündiger Inkubation nicht weiter abgebaut.

3.1.3.8 Identifizierung der Proteolysefragmente mittels Massenspektrometrie

Nachdem eine Umlagerung zu einer proteolysestabileren Konformation bestätigt werden konnte, ergab sich die Fragestellung, welche Regionen im Protein entscheidend von der Umlagerung beeinflusst bzw. an ihr beteiligt waren. Hierfür wurden die in Abbildung 25 gekennzeichneten Banden nach dreistündiger Proteolyse von fibrillärem WT-PABPN1 analysiert (siehe 2.2.3.17). Sequenzen, die WT-PABPN1 zugeordnet werden konnten, sind in Abbildung 27 dargestellt.

Zunächst war ein Abbau von fibrillärem WT-PABPN1 zu einer Bande von 40 kDa festzustellen (Abbildung 25). Entsprechend identifizierte Peptide sind in Abbildung 27A dargestellt. Eine Sequenzabdeckung konnte dabei nur für den Bereich von Aminosäure 146–306 erhalten werden. Für die N-terminale Region und den Bereich von 178–145 wurden keine Fragmente gefunden. Im Verlauf der Hydrolyse konnte ein Abbau zu 30 kDa- und 25 kDa-Fragmenten beobachtet werden. Für diese Bereiche ermittelte Peptide sind in den Sequenzen B und C dargestellt. Keine der Sequenzen konnte dem N-terminalen Bereich von WT-PABPN1 zugeordnet werden, wogegen der C-terminale Bereich von WT-PABPN1 nahezu vollständig identifiziert wurde (Abbildung 27C).

Die Analyse weiterer Proteinbanden deuteten auf einen Abbau der ersten ca. 100 Aminosäuren hin, da für diesen Bereich keine Peptide ermittelt werden konnten. Berücksichtigt werden sollte jedoch, dass nicht alle Peptidfragmente durch Massenspektrometrie identifiziert werden können, sofern sie nicht ionisieren. Im Verlauf der Proteolyse wurde die Hydrolyse C-terminaler Bereiche beobachtet. Sequenzen konnten nur noch dem Bereich von Aminosäure 146–266 zugeordnet werden (Abbildung 27D und E).

A

MAAAAAAAAA AGAAGGRGSG PGRRRHLVPG AGGEAGEGAP GGAGDYGNGL ESEELEPEEL LLEPEPEPEP
 EEEPPRPRAP PGAPGPGPGS GAPGSQEEEE EPGLVEGDPG DGAIEDPELE AIKARVREME EEAEKCLKELQ
 NEVEKQMNMS PPPGNAGPVI MSIEEKMEAD ARSIYVGNVD YGATAEELEA HFHGC GSVNR VTILCDKFSG
 HPKGFAYIEF SDKESVRTSL ALDESLFRGR QIKVIPKRTN RPGISTTDRG FPRARYRART TNYNSSRSRF
 YSGFNSRPRG RVYRGRARAT SWYSPY

B

MAAAAAAAAA AGAAGGRGSG PGRRRHLVPG AGGEAGEGAP GGAGDYGNGL ESEELEPEEL LLEPEPEPEP
 EEEPPRPRAP PGAPGPGPGS GAPGSQEEEE EPGLVEGDPG DGAIEDPELE AIKARVREME EEAEKCLKELQ
 NEVEKQMNMS PPPGNAGPVI MSIEEKMEAD ARSIYVGNVD YGATAEELEA HFHGC GSVNR VTILCDKFSG
 HPKGFAYIEF SDKESVRTSL ALDESLFRGR QIKVIPKRTN RPGISTTDRG FPRARYRART TNYNSSRSRF
 YSGFNSRPRG RVYRGRARAT SWYSPY

C

MAAAAAAAAA AGAAGGRGSG PGRRRHLVPG AGGEAGEGAP GGAGDYGNGL ESEELEPEEL LLEPEPEPEP
 EEEPPRPRAP PGAPGPGPGS GAPGSQEEEE EPGLVEGDPG DGAIEDPELE AIKARVREME EEAEKCLKELQ
 NEVEKQMNMS PPPGNAGPVI MSIEEKMEAD ARSIYVGNVD YGATAEELEA HFHGC GSVNR VTILCDKFSG
 HPKGFAYIEF SDKESVRTSL ALDESLFRGR QIKVIPKRTN RPGISTTDRG FPRARYRART TNYNSSRSRF
 YSGFNSRPRG RVYRGRARAT SWYSPY

D

MAAAAAAAAA AGAAGGRGSG PGRRRHLVPG AGGEAGEGAP GGAGDYGNGL ESEELEPEEL LLEPEPEPEP
 EEEPPRPRAP PGAPGPGPGS GAPGSQEEEE EPGLVEGDPG DGAIEDPELE AIKARVREME EEAEKCLKELQ
 NEVEKQMNMS PPPGNAGPVI MSIEEKMEAD ARSIYVGNVD YGATAEELEA HFHGC GSVNR VTILCDKFSG
 HPKGFAYIEF SDKESVRTSL ALDESLFRGR QIKVIPKRTN RPGISTTDRG FPRARYRART TNYNSSRSRF
 YSGFNSRPRG RVYRGRARAT SWYSPY

E

MAAAAAAAAA AGAAGGRGSG PGRRRHLVPG AGGEAGEGAP GGAGDYGNGL ESEELEPEEL LLEPEPEPEP
 EEEPPRPRAP PGAPGPGPGS GAPGSQEEEE EPGLVEGDPG DGAIEDPELE AIKARVREME EEAEKCLKELQ
 NEVEKQMNMS PPPGNAGPVI MSIEEKMEAD ARSIYVGNVD YGATAEELEA HFHGC GSVNR VTILCDKFSG
 HPKGFAYIEF SDKESVRTSL ALDESLFRGR QIKVIPKRTN RPGISTTDRG FPRARYRART TNYNSSRSRF
 YSGFNSRPRG RVYRGRARAT SWYSPY

Abbildung 27. Durch Massenspektrometrie identifizierte Aminosäuresequenzen nach dreistündiger Hydrolyse von fibrillärem WT-PABPN1. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm *Mascot*. Die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei der Identifizierung um ein Zufallsergebnis handelte, lag bei den grün hinterlegten Bereichen bei 1% und bei den orange markierten Aminosäuren bei 5%.

Ein zusammenfassender Vergleich der Proteolysemuster von löslichem und fibrillärem WT-PABPN1 (Abbildung 25) deutete auf einen verminderten Abbau des C-terminalen Bereiches hin: Bei Proteolyse des monomeren Proteins wurde eine Akkumulation von Hydrolyseprodukten bei 18 kDa festgestellt. Den Abbauprodukten konnte durch Massenspektrometrie die Sequenz D zugeordnet werden (Abbildung 27). Bei Hydrolyse des fibrillären Proteins dominierten Proteinbanden von 30 kDa und 25 kDa (Sequenzen B und D). Die Hydrolyse C-terminaler Bereiche scheint demnach in der fibrillären Konformation erschwert gewesen zu sein. Die erhöhte proteolytische Resistenz dieses Bereiches könnte auf eine enge Zusammenlagerung der Region hindeuten und gegebenenfalls die fibrilläre Kernstruktur darstellen.

3.1.3.9 Analyse der konformationellen Umlagerung des C-terminalen Bereiches anhand der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz

Die Analyse der Proteinfragmente der limitierten Proteolyse von fibrillärem WT-PABPN1 deutete auf eine konformationelle Änderung im C-terminalen Bereich des Proteins hin. Um diesen Sachverhalt zu bestätigen, wurden Tryptophan-Fluoreszenzspektren der fibrillären Proteine aufgenommen (siehe 2.2.3.8). PABPN1 besitzt einen Tryptophanrest an Position 302 (Trp302). Anhand der Änderungen der Fluoreszenzspektren konnten somit Aussagen über eine Umlagerung in der Umgebung von Trp302 getroffen werden.

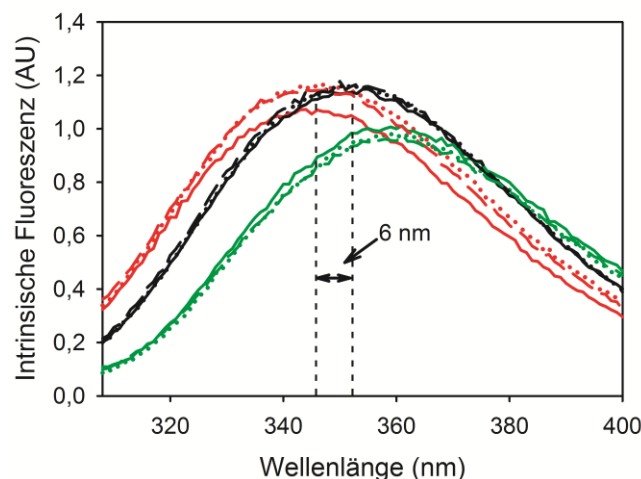


Abbildung 28. Intrinsische Tryptophan-Fluoreszenzspektren der Gesamtlängen-PABPN1-Varianten. Gezeigt sind die Fluoreszenzspektren der monomeren Proteine (schwarz), der entfalteten (rot) und der fibrillären Proteine (grün) von WT-PABPN1 (durchgezogen), Δ Ala- (gepunktete) und (+7)Ala-PABPN1 (gestrichelt). Die Spektren wurden in PF-Puffer bei 20 °C aufgenommen.

Wie unter 3.1.2.2 beschrieben, zeigten die monomeren Proteine ein Trp-Fluoreszenzmaximum bei 352 nm, das infolge der Entfaltung zu 359 nm verschoben war. Im fibrillären Zustand konnte ein Fluoreszenzmaximum von 345 nm festgestellt werden. Diese hypsochrome Verschiebung um 6 nm deutete auf eine verminderte Lösungsmittlexposition von Trp302 hin. Es kann demnach angenommen werden, dass der Bereich um Trp302 bei der Fibrillenbildung an der Umlagerung beteiligt oder unmittelbar davon betroffen war und somit vermehrt vom Lösungsmittel abgeschirmt wurde. Die Blauverschiebung konnte für alle drei Gesamtlängen-PABPN1-Varianten beobachtet werden. Eine Beteiligung der N-terminalen Oligoalaninsequenz bei der Fibrillenentstehung wurde daher ausgeschlossen.

3.2 Analyse von Deletionsvarianten von PABPN1

Die Untersuchungen des Gesamtlängen-Proteins deuteten auf eine Beteiligung der C-terminalen Region von PABPN1 an der Fibrillenbildung hin. Zudem konnte ein Einfluss der N-terminalen Oligoalaninsequenz ausgeschlossen werden. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden C- und N-terminal-verkürzte Varianten des Proteins untersucht. Zunächst wurden drei Deletionsvarianten analysiert, bei denen die letzten 49 Aminosäuren deletiert waren ($\Delta C49$). Analog zum Gesamtlängen-PABPN1 unterschieden sich die Proteine in der Länge des Oligoalaninsegmentes: zehn Alanine (WT- $\Delta C49$), 17 Alanine ((+7)Ala- $\Delta C49$), keine Alanine (ΔAla - $\Delta C49$). Des Weiteren wurde eine Variante hergestellt, die um die ersten 114 Aminosäuren verkürzt war ($\Delta N114$), jedoch die α -helikale Region, die RRM-Domäne und die C-terminalen 49 Aminosäuren besaß (Abbildung 29).

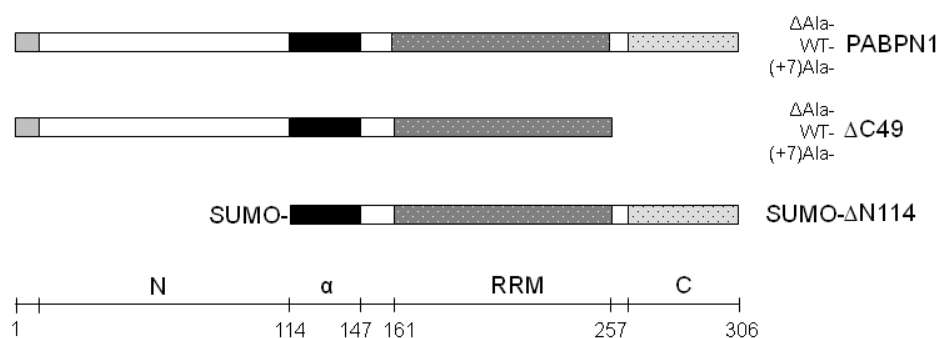


Abbildung 29. Schematische Darstellung von Gesamtlängen-PABPN1 und Deletionsvarianten. N-terminale Oligoalaninsequenz (hellgrau), N-terminales Segment (N), α -helikaler Bereich (α , schwarz), RNA-Erkennungsdomäne (*RNA recognition motif*, RRM, dunkelgrau schraffiert), C-terminaler Bereich (C, hellgrau schraffiert). Die Skalierung der Aminosäurereste bezieht sich auf WT-PABPN1.

3.2.1 Untersuchung und Charakterisierung der Fibrillenbildung von N- und C-terminalen Deletionsvarianten

Zunächst wurde die Fibrillenbildung von Deletionsvarianten von PABPN1 untersucht, die sich im Vorhandensein des N-terminalen Alaninsegmentes bzw. der C-terminalen 49 Aminosäuren unterschieden. Die Analyse erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie für das Gesamtlängen-Protein (PF-Puffer, 20 °C, 60 μ M Protein). Die N-terminale Deletionsvariante (Δ N114) wurde aufgrund einer erhöhten Tendenz zur Aggregation nur im Zusammenhang mit einer N-terminalen SUMO-Fusion analysiert. Als SUMO- Δ N114-Fusion konnte eine Konzentration von 60 μ M erreicht werden.

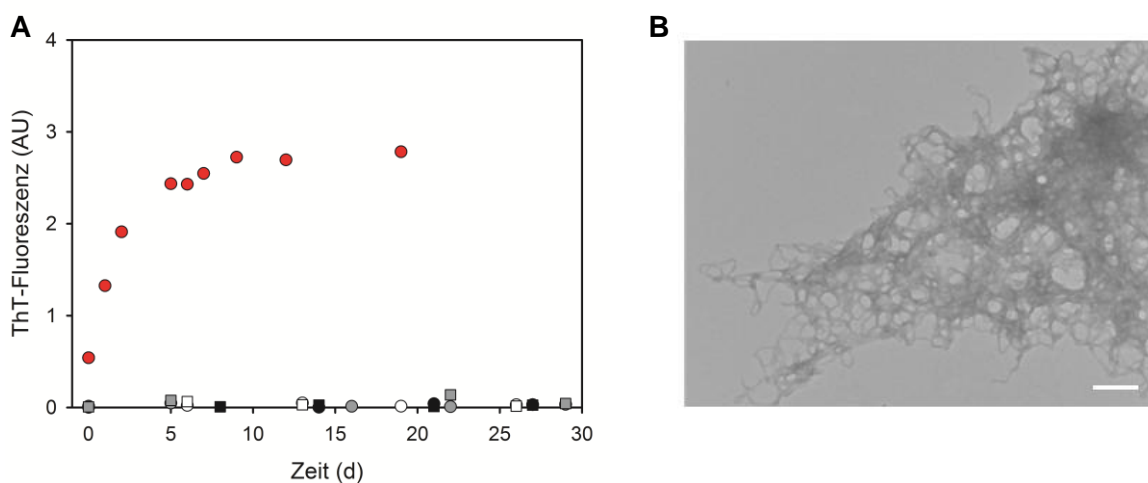


Abbildung 30. Analyse der Fibrillenbildung von PABPN1-Deletionsvarianten. (A) Untersuchung der Fibrillenentstehung anhand der ThT-Fluoreszenz. C-terminale Deletionsvariante WT- Δ C49 (●), Δ Ala- Δ C49 (○) und (+7)Ala- Δ C49 (●); N-terminal-verkürzte Variante SUMO- Δ N114 (●). Proteinkonzentration: 60 μ M (Kreise) und 100 μ M (Vierecke) in PF-Puffer, bei 20 °C. (B) Elektronenmikroskopie von fibrillärem SUMO- Δ N114 nach 12 d. Der Balken entspricht 200 nm.

Für die Δ C49-Varianten konnte kein Anstieg der ThT-Fluoreszenz über einen Zeitraum von 40 Tagen beobachtet und damit eine Fibrillenbildung ausgeschlossen werden. Die Inkubation bei einer höheren Proteinkonzentration von 100 μ M induzierte ebenfalls keine Fibrillierung (Abbildung 30). Bei der Analyse der SUMO- Δ N114-Variante konnte ein Anstieg der ThT-Fluoreszenz bis Erreichen eines Plateaus bei ca. zehn Tagen festgestellt werden. Die Untersuchung der Probe mittels Elektronenmikroskopie zeigte fibrilläre Proteinstrukturen. Zu berücksichtigen ist, dass das Plateau bei einer Fluoreszenzintensität von ca. 3 AU erreicht war. Gesamtlängen-PABPN1 zeigte dagegen ein Plateau bei 5 AU. Das geringere Plateau könnte darauf hindeuten, dass im gleichen Zeitraum weniger SUMO- Δ N114 umlagerte als Gesamtlängen-PABPN1. Eine Quantifizierung der Fibrillen anhand der

ThT-Fluoreszenzintensität ist aber nur bedingt möglich. Darüber hinaus ist über den Einfluss des SUMO-Fusionspartners auf die Fibrillenbildung bisher nichts bekannt.

Um eine mögliche Interaktion zwischen sich überschneidenden Regionen von Δ C49 und SUMO- Δ N114 festzustellen (also zwischen dem α -helikalen Segmenten oder den RRM-Domänen), wurden 30 μ M SUMO- Δ N114 zusammen mit einer äquimolaren Menge an Δ C49-Varianten inkubiert und die Fibrillierungskinetik analysiert (Abbildung 31).

Zunächst konnte kein Einfluss der Δ C49-Varianten festgestellt werden: die Kinetiken der verschiedenen Ko-Fibrillierungsansätze waren vergleichbar. Ein Plateau wurde ab ca. zehn Tagen festgestellt, unabhängig von der Anwesenheit der Δ C49-Variante. Im Vergleich mit der Kinetik von 60 μ M SUMO- Δ N114 allein, zeigten die Plateaus der Ko-Fibrillierungsansätze (30 μ M SUMO- Δ N114 mit 30 μ M Δ C49) eine um die Hälfte reduzierte ThT-Fluoreszenzintensität von ca. 1,5 AU, hindeutend darauf, dass nur SUMO- Δ N114 Fibrillen bildete, ohne Δ C49 mit zu integrieren.

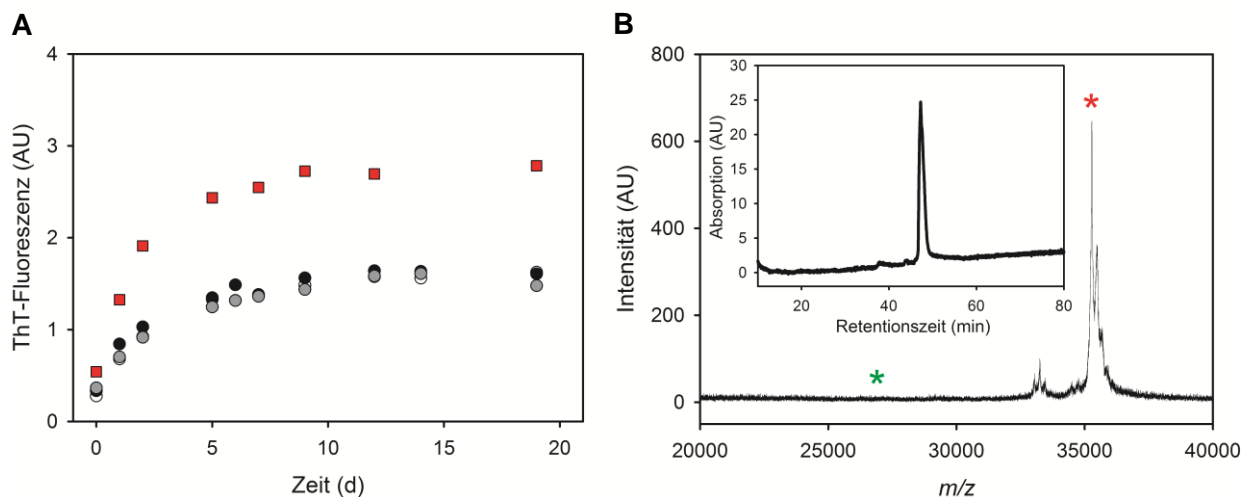


Abbildung 31. Analysen zur Fibrillenbildung von Deletionsvarianten. (A) Fibrillierungskinetiken von 60 μ M SUMO- Δ N114 allein (■) und von 30 μ M SUMO- Δ N114 mit 30 μ M WT- Δ C49 (●), Δ Ala- Δ C49 (○) und mit (+7)Ala- Δ C49 (◐); Fibrillierung in PF-Puffer bei 20 °C. (B) MALDI-MS-Analyse der Fibrillen am Beispiel der Fibrillierung von 30 μ M SUMO- Δ N114 mit 30 μ M WT- Δ C49. Theoretisches m/z von SUMO- Δ N114 (roter Stern), theoretisches m/z von WT- Δ C49 (grüner Stern); HPLC-Chromatogramm der Fibrillen (*inset*), gezeigt ist die Absorption bei 280 nm.

Um den Sachverhalt zu bestätigen, wurde versucht die Deletionsvariante(n) zu identifizieren, die an der Fibrillenbildung beteiligt war(en). Hierfür wurden die Fibrillen aus dem Fibrillierungsansatz durch Ultrazentrifugation isoliert. Einem Waschschrift, durch welchen lösliches Protein entfernt wurde, folgte die Solubilisierung der Fibrillen mit 6 M GdmCl. Diese Proteinlösung wurde mittels HPLC aufgetrennt. Das Chromatogramm in Abbildung 31B zeigt einen einzigen Peak bei einer Retentionszeit von 47 min (*inset*). Die anschließende Analyse mittels Massenspektrometrie identifizierte lediglich SUMO- Δ N114 (Abbildung 31B). Das

Ergebnis bestätigte, dass nur SUMO- Δ N114 an der Fibrillenbildung beteiligt war. Ferner bekräftigte es, dass die C-terminale Region entscheidend an der Fibrillenbildung beteiligt war und eine Interaktion zwischen der RRM-Domäne und/oder des α -helikalen Segmentes verschiedener Proteinmoleküle ausgeschlossen werden kann.

Ferner wurde fibrilläres SUMO- Δ N114 auf die Sensitivität gegenüber GdmCl getestet (Abbildung 32). Verglichen mit Fibrillen von Gesamtlängen PABPN1 wurde eine ähnliche Sensitivität festgestellt. Die Hälfte der Fibrillen konnte nach einstündiger Inkubation bei ca. 2 M GdmCl solubilisiert werden. Eine vollständige Solubilisierung wurde mit Konzentrationen oberhalb 3 M GdmCl erreicht (Vergleich mit Abbildung 22).

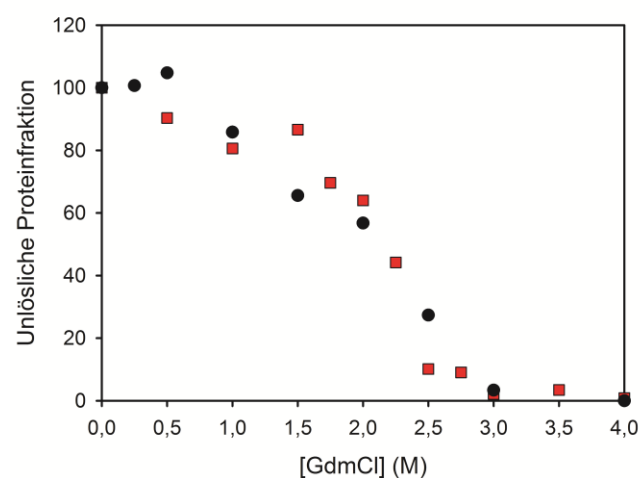


Abbildung 32. Solubilisierung von Fibrillen. Fibrilläres SUMO- Δ N114 (■), Fibrillen von WT-PABPN1 (●). Aufgetragen ist die relative Proteinmenge der unlöslichen (fibrillären) Fraktion nach einstündiger Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an GdmCl.

3.3 Zusammenfassung Kapitel I

Kapitel I befasste sich mit der Untersuchung von Gesamtlängen-PABPN1-Varianten, die sich in der N-terminalen Oligoalaninsequenz unterschieden. Neben dem Wildtypprotein mit zehn Alaninen wurde eine OPMD-relevante expandierte Form mit sieben zusätzlichen Alaninresten und eine Deletionsvariante, in der die Oligoalaninsequenz deletiert war, analysiert. Ferner wurden N- und C-terminal-verkürzte PABPN1-Varianten untersucht. Zusammenfassend konnten folgende Ergebnisse erhalten werden:

1. Die Länge bzw. die Anwesenheit der Oligoalaninsequenz hatte keinen Einfluss auf die Proteingesamtstruktur.

Die untersuchten PABPN1-Varianten zeigten keine Unterschiede im Sekundärstrukturanteil (siehe auch [134]), der Exposition der aromatischen Aminosäuren und der Bindungsaffinität zu Oligo-(A)-RNA.

2. Die Kinetik der Fibrillenbildung von Gesamtlängen-PABPN1 wurde nicht von der Alaninsequenz beeinflusst.

Alle untersuchten PABPN1-Varianten zeigten die gleiche Kinetik der Fibrillenbildung. In Anwesenheit von heterologen *seeds* der expandierten N-terminalen Domäne von PABPN1 konnte keine Beschleunigung der Fibrillenbildung beobachtet werden. Die Analyse der Fibrillenbildung zu frühen Zeitpunkten mittels Gelfiltration war zwischen den Varianten vergleichbar. Morphologisch konnten keine Unterschiede durch Elektronenmikroskopie festgestellt werden.

3. Die Fibrillen von Gesamtlängen-PABPN1 zeigten untereinander vergleichbare biophysikalische Eigenschaften.

CD-Spektren und FTIR-Absorptionsspektren deuteten auf eine Abnahme α -helikaler Strukturanteile und eine Zunahme an β -Faltblattstruktur hin. Die Fibrillen konnten durch Inkubation mit 3 M GdmCl vollständig solubilisiert werden.

4. Ein Einfluss der C-terminalen Region auf die Fibrillenbildung des Gesamtlängen-Proteins konnte festgestellt werden.

Die Analyse der konformationellen Umlagerung mittels limitierter Proteolyse und anschließender Massenspektrometrie, sowie Untersuchungen zur Exposition des Trp302 im löslichen und fibrillären Zustand deuteten auf einen Einfluss der C-terminalen Region auf die Fibrillenbildung hin.

Untersuchungen des Fibrillierungsverhaltens von N- und C-terminal-verkürzten PABPN1-Varianten belegten die Beteiligung der C-terminalen Region an der Fibrillenbildung von Gesamtlängen-PABPN1. Ein Einfluss der N-terminalen 114 Aminosäuren konnte ausgeschlossen werden.

Bei Ko-Fibrillierungsexperimenten von SUMO- Δ N114 mit Δ C49-Varianten wurde in den gebildeten Fibrillen lediglich SUMO- Δ N114 identifiziert. Eine variantenübergreifende Interaktion der RRM-Domäne oder des α -helikalen Segmentes war somit auszuschließen.

Kapitel II:

Kann eine alaninabhängige Fibrillenbildung im Kontext des Gesamtlängen-PABPN1 wiederhergestellt werden?

In Kapitel I konnte eine Beteiligung der C-terminalen 49 Aminosäuren von PABPN1 an der Fibrillenbildung des Proteins festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wurde kein Einfluss des N-terminalen Oligoalaninsegmentes auf die Fibrillierung des Gesamtlängen-Proteins beobachtet. Die Ergebnisse stehen im Widerspruch zu bereits veröffentlichten Daten der isolierten N-terminalen Region (Aminosäuren 1–125) von PABPN1, die ein alaninabhängiges Fibrillierungsverhalten zeigte [110]. Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass sich die gesetzten Bedingungen zur Untersuchung des Gesamtlängen-Proteins und der N-terminalen Region stark voneinander unterschieden (Tabelle 25).

Tabelle 25. Vergleich der Bedingungen zur Untersuchung der Fibrillenbildung des Gesamtlängen-Proteins und der N-terminalen Region von PABPN1 [135].

	Gesamtlänge-PABPN1	N-terminale Region
Puffer	PF-Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,9, 1,5 M KCl, 1 mM EDTA, 10% (v/v) Glycerin	NF-Puffer: 5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7 150 mM NaCl, 1 mM EDTA
Temperatur	20 °C	37 °C
Proteinkonzentration	60 µM	500-2000 µM

Um eine mögliche Unterbindung der alanininduzierten Fibrillenbildung durch das Puffersystem auszuschließen, wurde erneut die N-terminale Region von PABPN1, in dem für das Gesamtlängen-Protein verwendeten System, analysiert. Zwei verkürzte PABPN1-Varianten wurden hierfür untersucht: Zum einen die N-terminale Region, wie sie in den Arbeiten von Till Scheuermann und Grit Lodderstedt untersucht wurde (N-terminalen 125 Aminosäuren) [134,135]; zum anderen eine Variante, die aus den N-terminalen 147 Aminosäuren von PABPN1 bestand (N-terminale und α -helikale Region von PABPN1, N147). Beide Konstrukte wurden mit expandierter Alaninsequenz (N-(+7)Ala bzw. (+7)Ala-N147) und mit fehlendem Alaninsegment (N- Δ Ala bzw. Δ Ala-N147) analysiert (Abbildung 33).

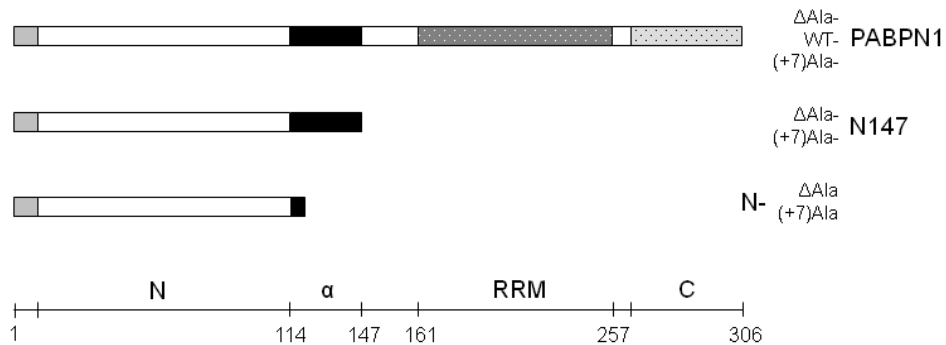


Abbildung 33. Schematische Darstellung von Gesamtlängen-PABPN1 und Deletionsvarianten. N-terminales Segment (N) mit Oligoalaninsequenz (hellgrau), α -helikaler Bereich (α , schwarz), RNA-Erkennungsdomäne (RRM, dunkelgrau schraffiert), C-terminaler Bereich (C, hellgrau schraffiert). Die Skalierung der Aminosäurereste bezieht sich auf WT-PABPN1.

3.4 Ist eine alaninabhängige Fibrillenbildung in PF-Puffer möglich?

3.4.1 Fibrillenbildung N-terminaler Fragmente von PABPN1

Um zu überprüfen, ob per se eine alaninabhängige Fibrillenbildung in PF-Puffer möglich ist, wurden zwei N-terminale Fragmente von PABPN1 analysiert (Abbildung 33). Als „Kontrollfibrillierung“ wurde die Fibrillenbildung von 0,5 mM N-(+7)Ala bei 37 °C untersucht. Um die Bildung der Fibrillen zu beschleunigen, wurden die Proben mit homologen *seeds* versetzt. Von N-(+7)Ala ist bekannt, dass sich das Protein in Anwesenheit von *seeds* rasch zu Fibrillen umlagert [133,135]. In Abbildung 34A ist die Kinetik der Fibrillenbildung dargestellt. Wie erwartet, konnte nur für N-(+7)Ala ein Anstieg der ThT-Fluoreszenz festgestellt werden. Dass die Intensitätszunahme auf der Entstehung von Fibrillen beruhte, wurde mittels Elektronenmikroskopie bestätigt (Abbildung 35). Für N- Δ Ala konnte wie erwartet keine veränderte ThT-Fluoreszenz beobachtet werden. Eine Fibrillenbildung fand nicht statt. Das gleiche Ergebnis konnte für die N147-Varianten erhalten werden (Abbildung 34B): Für (+7)Ala-N147 wurde eine Zunahme der ThT-Fluoreszenz beobachtet. Die Kinetik zeigte dabei einen sigmoiden Verlauf, der mit der Entstehung eines Nukleationskeimes erklärt werden kann. Durch Zugabe von *seeds* wurde die Bildung des Keimes vorweggenommen und die Kinetik war nun durch einen hyperbolen Verlauf charakterisiert. Weder in Anwesenheit noch ohne Zugabe von *seeds* konnte für Δ Ala-N147 ein Anstieg in der ThT-Fluoreszenz beobachtet werden. Die erhöhte ThT-Grundfluoreszenz bei Zugabe von *seeds* ist auf die Anwesenheit der *seeds* zurückzuführen.

Mittels Elektronenmikroskopie wurde die Bildung von Fibrillen bestätigt (Abbildung 35). Morphologisch konnte kein Unterschied zwischen den beiden Varianten festgestellt werden. Die Fibrillen zeichneten sich durch klar abgegrenzte, unverzweigte Strukturen aus und entsprachen in ihrer Morphologie früheren Beobachtungen der Arbeitsgruppe [135].

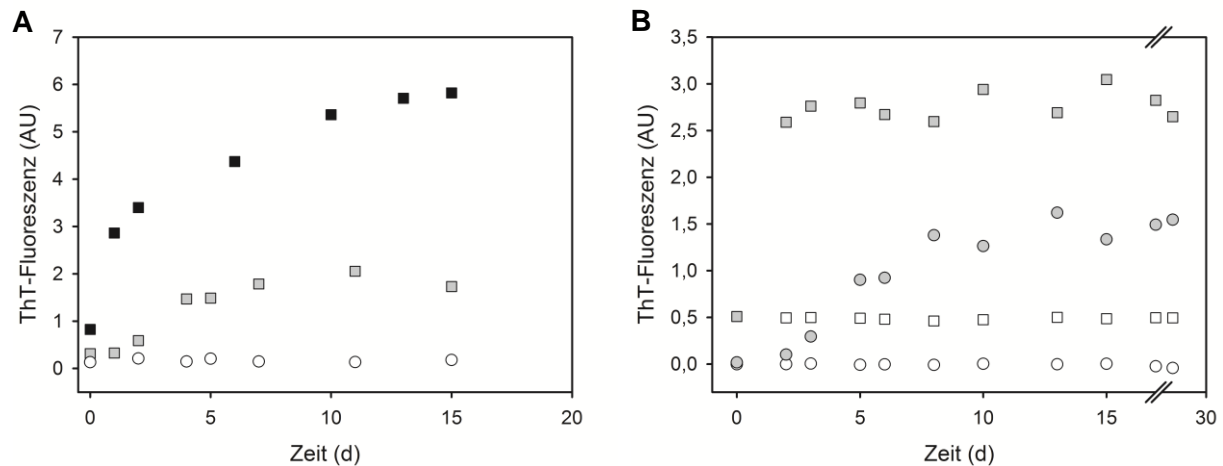


Abbildung 34. Analyse der Fibrillenbildung N-terminaler Fragmente von PABPN1. (A) N-ΔAla mit 1% (w/w) seeds (○); N-(+7)Ala, in Anwesenheit von 1% (w/w) (◼) und 10% (w/w) (◼) seeds. (B) ΔAla-N147 ohne seeds (○) und mit 10% (w/w) seeds (◻); (+7)Ala-N147 ohne seeds (●) und in Anwesenheit von 10% (w/w) (◼) seeds. Die seed-Präparation erfolgte aus fibrillärem N-(+7)Ala. Die Fibrillenbildung wurde in PF-Puffer bei 37 °C und 0,5 mM Protein untersucht.

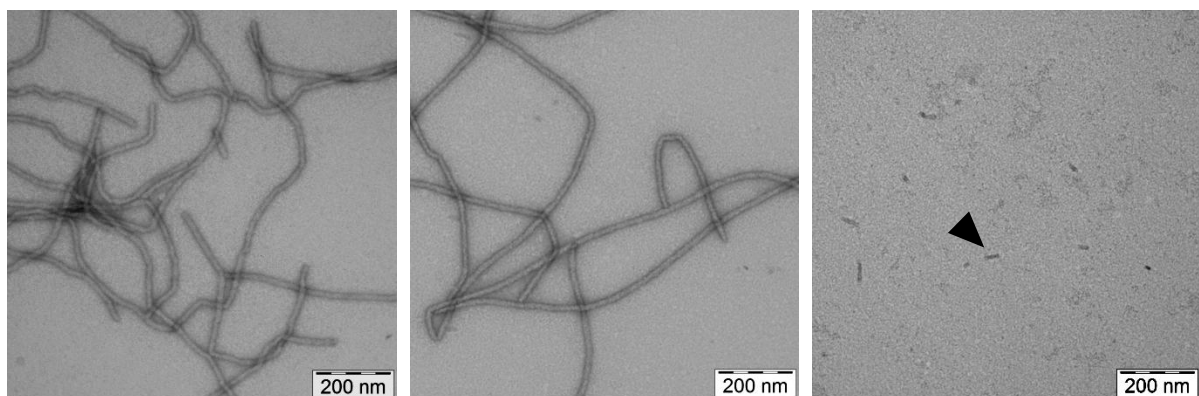


Abbildung 35. Elektronenmikroskopische Aufnahmen C-terminaler Deletionsvarianten in Anwesenheit von 10% (w/w) N-(+7)Ala-seeds. Fibrillen von N-(+7)Ala (links); (+7)Ala-N147 (mittig); ΔAla-N147 (rechts). Der Pfeil deutet auf N-(+7)Ala-seeds.

Für die N-terminalen Fragmente von PABPN1 konnte also eine alaninabhängige Fibrillenbildung in PF-Puffer beobachtet werden. Damit kann ein Einfluss der Pufferkomponenten auf die alanininduzierte Fibrillenbildung ausgeschlossen werden. Zudem konnte kein Einfluss des α-helikalen Segmentes auf die Fibrillenbildung festgestellt werden.

3.4.2 Biophysikalische Charakterisierung von fibrillärem (+7)Ala-N147 und N-(+7)Ala

Da die Fibrillenbildung der N-terminalen PABPN1-Fragmente in PF-Puffer vergleichbar mit der in Ref. [135] war, wurden die Fibrillen hinsichtlich ihrer biophysikalischen Eigenschaften charakterisiert. Die Ergebnisse sollten dem Vergleich der biophysikalischen Eigenschaften der Fibrillen aus zwei unterschiedlichen Puffersystemen dienen (siehe Tabelle 25).

3.4.2.1 Untersuchungen des Sekundärstrukturgehaltes mittels FTIR

Die Analyse des Sekundärstrukturgehaltes von monomerem und fibrillärem N-(+7)Ala und (+7)Ala-N147 erfolgte mittel ATR-FTIR (siehe 2.2.3.9). Die Ergebnisse sind in Abbildung 36 zusammengefasst. Aus der zweiten Ableitung der FTIR-Absorptionsspektren wurde die Wellenzahl der maximalen Absorption (ν_{\max}) in der Amid I-Region ermittelt (*). Für fibrilläres Protein konnte ein ν_{\max} bei 1623 cm^{-1} beobachtet werden. Zudem war eine Absorptionzunahme bei 1695 cm^{-1} zu verzeichnen. Eine Absorption von Licht dieser Wellenzahlen korreliert mit β -Faltblattstrukturen. Bei den monomeren Proteinen dagegen war die Absorption in diesem Bereich weitaus geringer. Die Unterschiede in den FTIR-Absorptionsspektren deuteten eine Zunahme an β -Faltblattstrukturanteil während oder nach der Umlagerung zur Fibrille an. Die ν_{\max} -Werte der monomeren Proteine wiesen auf α -helikale und β -Faltblatt-Strukturanteile, sowie unstrukturierte Bereiche hin. Eine detaillierte Sekundärstrukturanalyse durch Dekonvolution der Spektren wurde nicht durchgeführt.

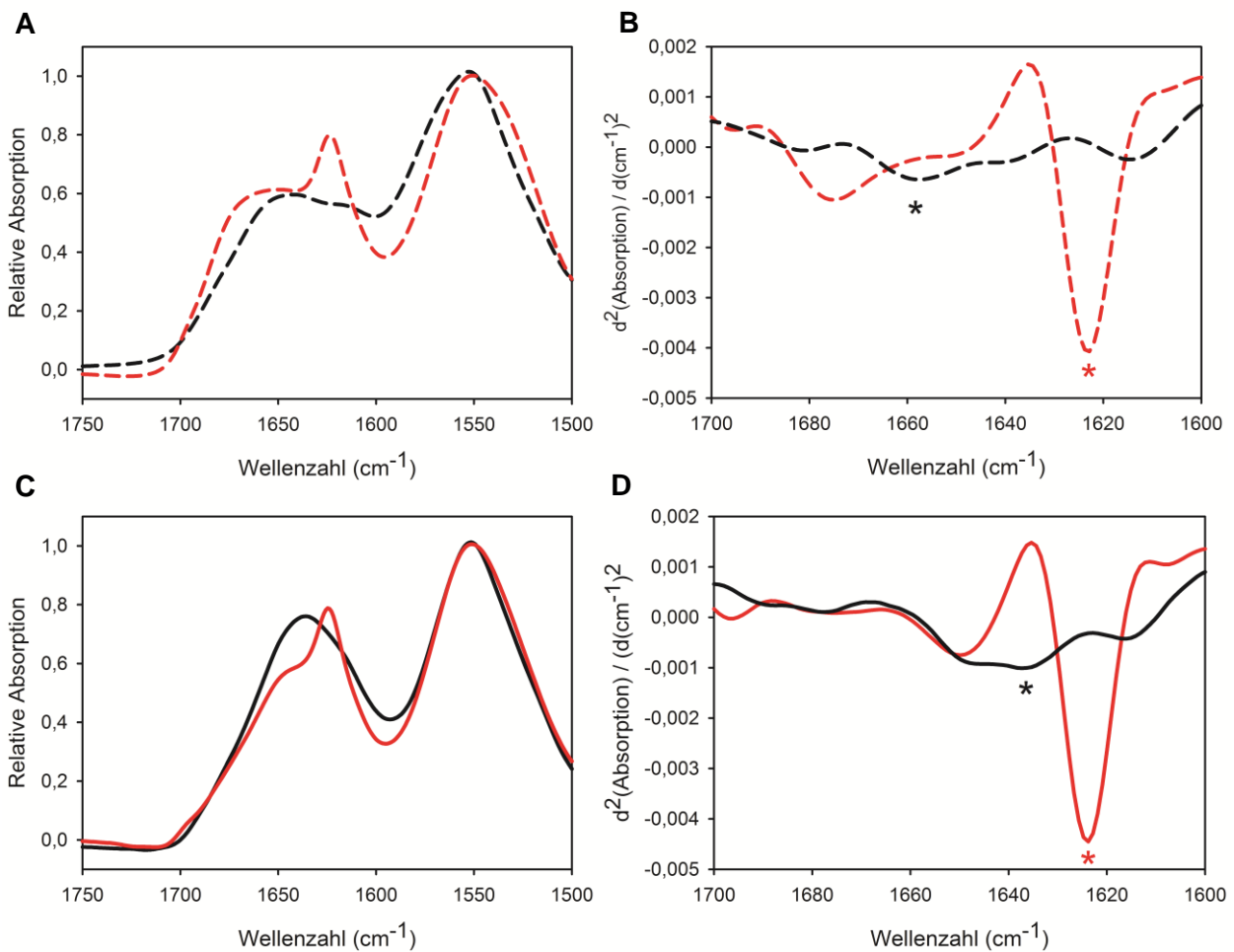


Abbildung 36. ATR-FT-Infrarotabsorptionsspektren von monomerem und fibrillärem N-(+7)Ala (A, B) und (+7)Ala-N147 (C, D). Monomeres Protein (schwarz), fibrilläres Protein (rot). Gezeigt sind die FTIR-Absorptionsspektren (A, C) und die zweite Ableitung der Spektren in der Amid I-Region (B, D). N-(+7)Ala (gestrichelt), (+7)Ala-N147 (durchgezogen). Die Wellenzahl der maximalen Absorption ist mit (*) gekennzeichnet. Die Spektren wurden in PF-Puffer bei 20 °C aufgenommen.

3.4.2.2 Analyse der Sensitivität der Fibrillen gegenüber Guanidiniumchlorid

Fibrillen von N-(+7)Ala, die sich in NF-Puffer gebildet hatten, zeichneten sich durch eine außergewöhnlich hohe Resistenz gegenüber Solubilisierung mit GdmCl aus [133]. Ob die in PF-Puffer gebildeten Fibrillen eine ähnlich geringe Sensitivität gegenüber dem Denaturierungsmittel zeigen, wurde anschließend untersucht. In Abbildung 37 ist das Ergebnis der Solubilisierung von fibrillärem N-(+7)Ala und (+7)Ala-147 dargestellt.

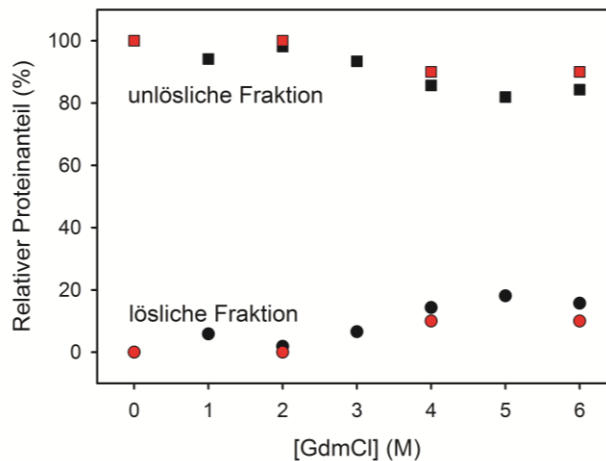


Abbildung 37. Solubilisierung von fibrillärem Protein. N-(+7)Ala (schwarz), (+7)Ala-N147 (rot). Es wurde der Proteinanteil der löslichen Fraktion bestimmt (Kreise) und der Anteil der unlöslichen Fraktion aus der Differenz von eingesetzter und gelöster Menge berechnet (Viertecke).

Sowohl fibrilläres N-(+7)Ala als auch Fibrillen von (+7)Ala-N147 zeigten eine vergleichbar geringe Sensitivität gegenüber dem Denaturierungsmittel GdmCl. Die Untersuchung fand bis zu einer Konzentration von 6 M GdmCl statt. Nach einstündiger Inkubation konnten nur ca. 15% der Fibrillen solubilisiert werden.

Zusammenfassend zeigten die Fibrillen von N-(+7)Ala bzw. (+7)Ala-N147 in PF-Puffer die gleichen biophysikalischen Eigenschaften, wie sie für N-(+7)Ala-Fibrillen zuvor in NF-Puffer ermittelt wurden [110,133]. Die Pufferbestandteile des PF-Puffers hatten verglichen mit NF-Puffer weder einen Einfluss auf die alaninabhängige Fibrillenbildung noch auf die Eigenschaften der Fibrillen.

3.5 Alanininduzierte Fibrillenbildung der Δ C49-Varianten

Im Abschnitt 2.4 konnte gezeigt werden, dass die N-terminalen Fragmente von PABPN1, N-(+7)Ala und (+7)Ala-N147 die gleichen Fibrillierungseigenschaften und vergleichbare biophysikalische Eigenschaften aufwiesen wie in Ref. [135] beschrieben. Es wurde nun der Versuch unternommen zunächst die alanininduzierte Fibrillenbildung im Kontext der Δ C49-Varianten wiederherzustellen, da sie prinzipiell in dem Puffersystem zu beobachten sein müsste.

3.5.1 Fibrillenbildung von $\Delta C49$ bei erhöhter Temperatur und Proteinkonzentration

Analysen der Fibrillenkerstruktur von N-(+7)Ala deuteten auf die Integration von ca. 40 Aminosäuren in den Fibrillenkern hin [150]. Somit sollte die ca. 160 Aminosäuren C-terminal davon gelegene, gefaltete RRM-Domäne keinen oder lediglich einen geringfügigen Einfluss auf die Fibrillenbildung haben und eine alaninabhängige Fibrillierung möglich sein. Aus diesem Grund wurden die $\Delta C49$ -Varianten nun in Analogie zu den Untersuchungen von N-(+7)Ala analysiert: die Proteinkonzentration der $\Delta C49$ -Varianten wurde von 60 μM auf 0,5 mM erhöht. Zudem wurde das Protein bei 37 °C, anstatt bei 20 °C inkubiert. Ferner wurden die Proben mit N-(+7)Ala-seeds versetzt, um den Prozess der Fibrillenbildung zu beschleunigen (Abbildung 38). Es sollte berücksichtigt werden, dass eine derartige Analyse mit Gesamtlängen-PABPN1 nicht möglich war, da das Protein weder bei einer Konzentration von 0,5 mM noch bei einer Temperatur von 37 °C löslich war und in kürzester Zeit amorph aggregierte.

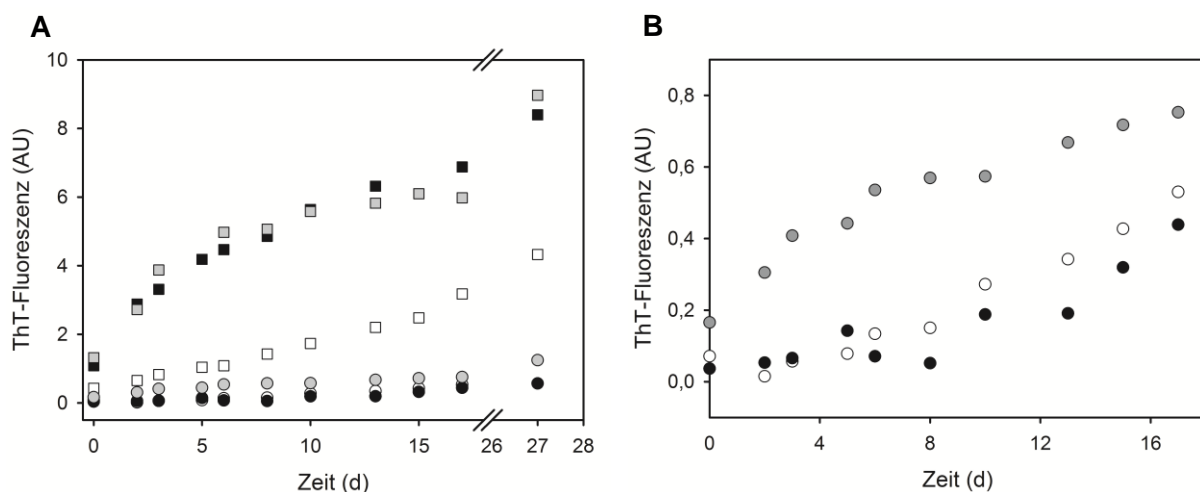


Abbildung 38. Fibrillenbildung von $\Delta C49$ bei erhöhter Proteinkonzentration. (A) Änderung der ThT-Fluoreszenzintensität in Anwesenheit von 5% (w/w) N-(+7)Ala-seeds (Vierecke) und ohne seeds (Kreise). WT- $\Delta C49$ (schwarz), ΔAla - $\Delta C49$ (weiß), (+7)Ala- $\Delta C49$ (grau). (B) Vergrößerung der Kinetiken ohne seeds. Die Untersuchungen fanden in PF-Puffer, bei 37 °C und 0,5 mM Protein statt.

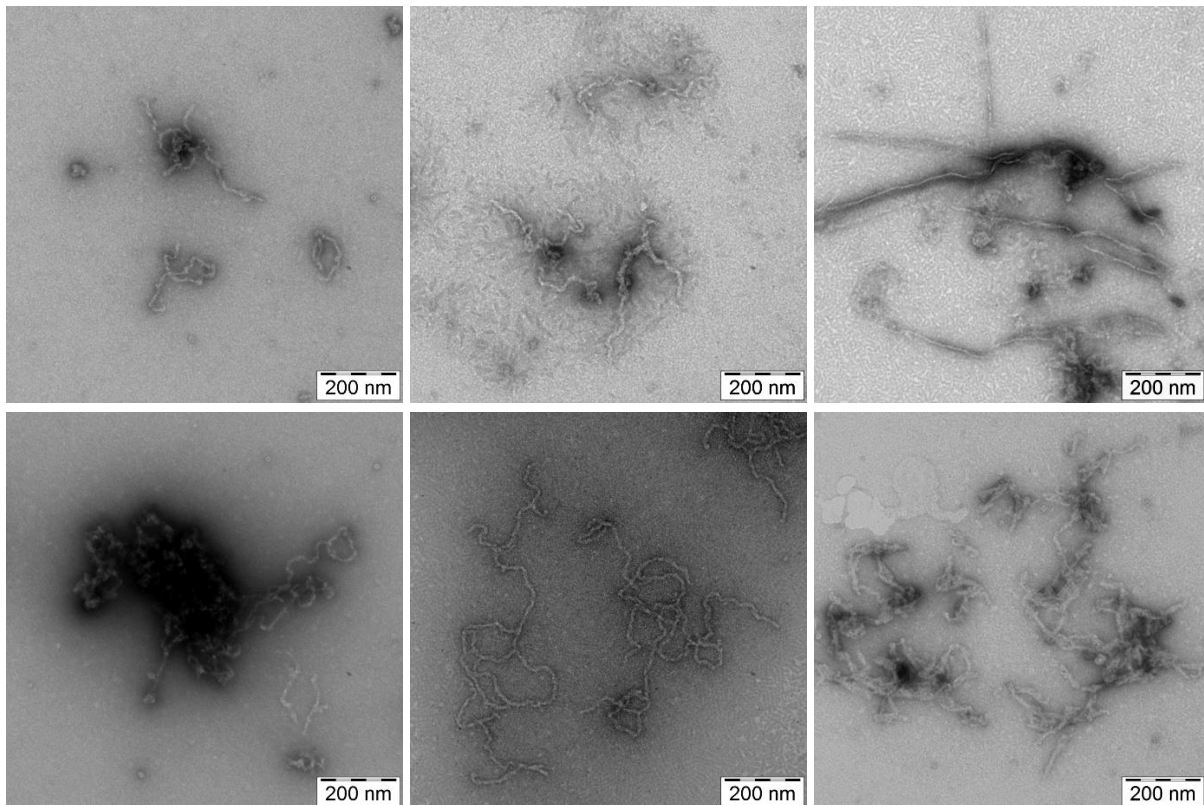


Abbildung 39. Elektronenmikroskopische Aufnahmen fibrillärer $\Delta C49$ -Varianten. Oben ohne *seeds*, unten mit *seeds*, WT- $\Delta C49$ (links), ΔAla - $\Delta C49$ (mittig), (+7) Ala - $\Delta C49$ (rechts).

Die Kinetiken in Anwesenheit von 5% (w/w) *seeds* zeigten einen deutlichen Einfluss der Alaninsequenz: Für WT- $\Delta C49$ und (+7) Ala - $\Delta C49$ konnte ein hyperbolischer Verlauf festgestellt werden. Bei ΔAla - $\Delta C49$ wurde erst ab ca. zehn Tagen eine Erhöhung der ThT-Fluoreszenz beobachtet. In Abwesenheit von *seeds* fibrillierte (+7) Ala - $\Delta C49$ schneller als WT- und ΔAla - $\Delta C49$. Die geringe ThT-Fluoreszenzintensität deutete an, dass nur ein geringer Anteil des Proteins zur Fibrille umlagerte. Ein Großteil an Protein unterlag der amorphen Aggregation während der Inkubation.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigten das hohe Aufkommen amorpher Aggregate. Es konnte die Anwesenheit fibrillärer Strukturen für WT- $\Delta C49$ und (+7) Ala - $\Delta C49$ bestätigt werden, die häufig auf den Grids detektiert wurden (Abbildung 39). Eine Tendenz für die Menge gefundener Fibrillen zwischen den Ansätzen mit und ohne *seeds* konnte nicht festgestellt werden. Die Umlagerung von ΔAla - $\Delta C49$ zeigte sowohl in An- als auch in Abwesenheit von *seeds* überwiegend amorphe Aggregate. Vereinzelt und somit nicht repräsentativ konnten fibrillenartige Strukturen gefunden werden. In Anwesenheit von *seeds* wurden für ΔAla - $\Delta C49$ in einem kleinen Bereich auf dem Grid klar abgegrenzte Fibrillen gefunden. Es ist allerdings wahrscheinlich, dass die Fibrillen aus der *seed*-Präparation stammen und somit Fibrillen von N-(+7) Ala darstellten.

3.5.2 Biophysikalische Charakterisierung von fibrillärem Δ C49

Die unlösliche Fraktion der Fibrillierungsansätze ohne *seeds* von WT- und (+7)Ala- Δ C49 wurden mittels FTIR untersucht. Die Ergebnisse sollten mit dem Vorbehalt betrachtet werden, dass keine homogene Präparation vorlag, da die Proben sowohl amorph aggregiertes als auch fibrilläres Protein enthielten. An dieser Stelle wird deshalb nur auf die Verschiebung der Wellenzahl der maximalen Absorption (ν_{\max}) der Amid I-Region, von ca. 1638–1644 cm^{-1} der monomeren Proteine zu etwa 1625–1627 cm^{-1} der unlöslichen Proteine hingewiesen (Abbildung 40). Beide Absorptionsbereiche deuten auf β -Faltblattstrukturanteile hin. Weitere Aussagen zur Sekundärstruktur wären aufgrund der Probenqualität rein spekulativ.

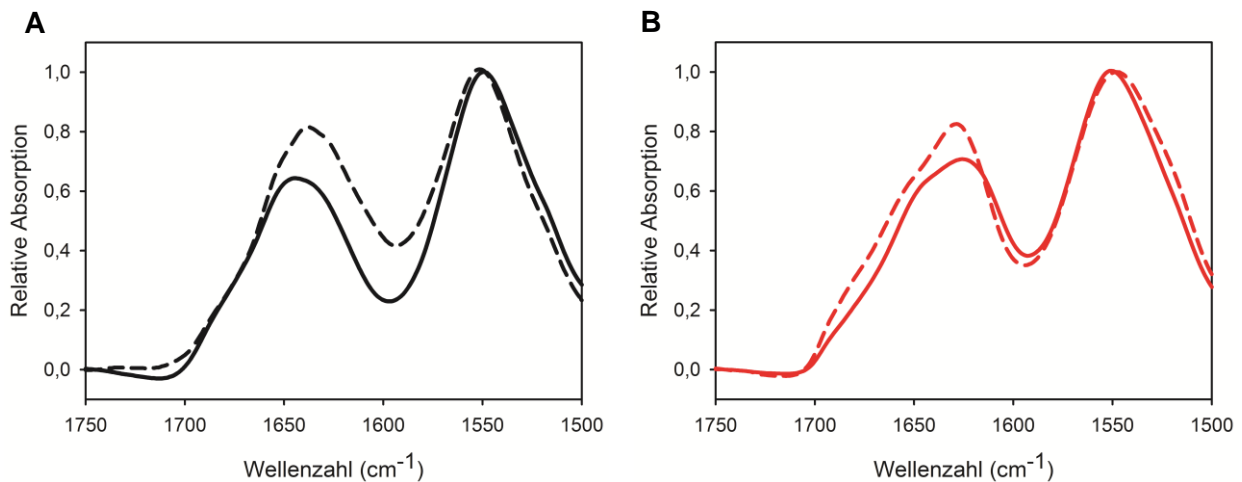


Abbildung 40. FTIR-Absorptionsspektren von Δ C49. (A) lösliche Proteine, (B) fibrilläre Proteine; WT- Δ C49 (durchgezogene Linien), (+7)Ala- Δ C49 (gestrichelte Linien). Die Messung erfolgte bei 20 °C in PF-Puffer.

Zur weiteren Charakterisierung wurden die unlöslichen Fraktionen auf ihre Sensitivität gegenüber GdmCl untersucht (Abbildung 41). Da sich eine Tendenz zu einer alanininduzierten Fibrillenbildung in den Kinetiken andeutete, wäre eine mit N-(+7)Ala und (+7)Ala-N147 vergleichbar geringe Sensitivität zu erwarten gewesen. Die Resultate der Solubilisierung waren jedoch mit denen des Gesamtlängen-PABPN1 vergleichbar.

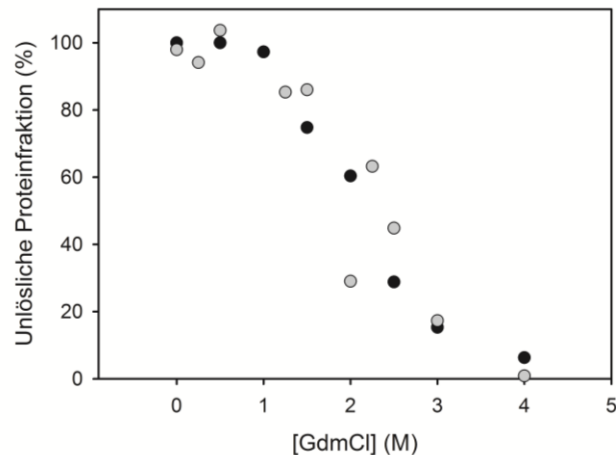


Abbildung 41. Solubilisierung der unlöslichen Δ C49-Varianten. WT- (●) und (+7)Ala- Δ C49 (●). Gezeigt ist die relative Proteinmenge der unlöslichen Fraktion nach einstündiger Inkubation in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen an GdmCl.

Eine vollständige Solubilisierung wurde durch Inkubation mit GdmCl oberhalb von 3 M festgestellt. Die Hälfte der unlöslichen Proteine war bei ca. 2 M GdmCl nach 1 h solubilisiert (Abbildung 41). Aufgrund der Heterogenität der Proben kann das Ergebnis der Solubilisierung nicht allein auf das Verhalten des fibrillären Proteins übertragen werden, da neben Fibrillen auch amorphe Aggregate in den Ansätzen vorlagen.

3.6 Fibrillenbildung unter leicht denaturierenden Bedingungen

Nachdem für die Δ C49-Varianten tendenziell eine alanininduzierte Fibrillierung beobachtet werden konnte, wurde nun versucht im Gesamtlängen-Protein eine alaninabhängige Fibrillenbildung zu induzieren. Um einen möglichen Einfluss der gefalteten RRM-Domäne und der C-terminalen Region auf die Umlagerung zur Fibrille zu unterdrücken, wurden Bedingungen gewählt, die zu einer partiellen Entfaltung des Proteins führten. Die Destabilisierung strukturierter Bereiche erfolgte durch 1 M Harnstoff, bzw. 1 M oder 2,5 M GdmCl. Bei einer Konzentration von 2,5 M GdmCl liegt näherungsweise der Übergangsmittelpunkt der Entfaltung der RRM-Domäne [134]. Ferner konnte die Hälfte der Fibrillen von Gesamtlängen-PABPN1 bei dieser Konzentration solubilisiert werden (Abbildung 22) und sollte somit die Bildung dieser fibrillären Strukturen unterbinden. Da die alanininduzierten Fibrillen eine weitaus geringere Sensitivität gegenüber GdmCl haben, sollte deren Bildung jedoch möglich sein.

3.6.1 Einfluss der Denaturierungsmittel auf den Faltungszustand des löslichen Proteins

Zunächst wurde der Einfluss der Denaturierungsmittel auf die Struktur der löslichen Proteine untersucht. Die Charakterisierung des Faltungszustandes erfolgte mittels CD- und Fluoreszenzspektroskopie (siehe 2.2.3.7 und 2.2.3.8). Nach Dialyse der Proteine über Nacht gegen Puffer mit der entsprechenden Konzentration an Harnstoff oder Guanidiniumchlorid wurden die Proben spektroskopisch analysiert.

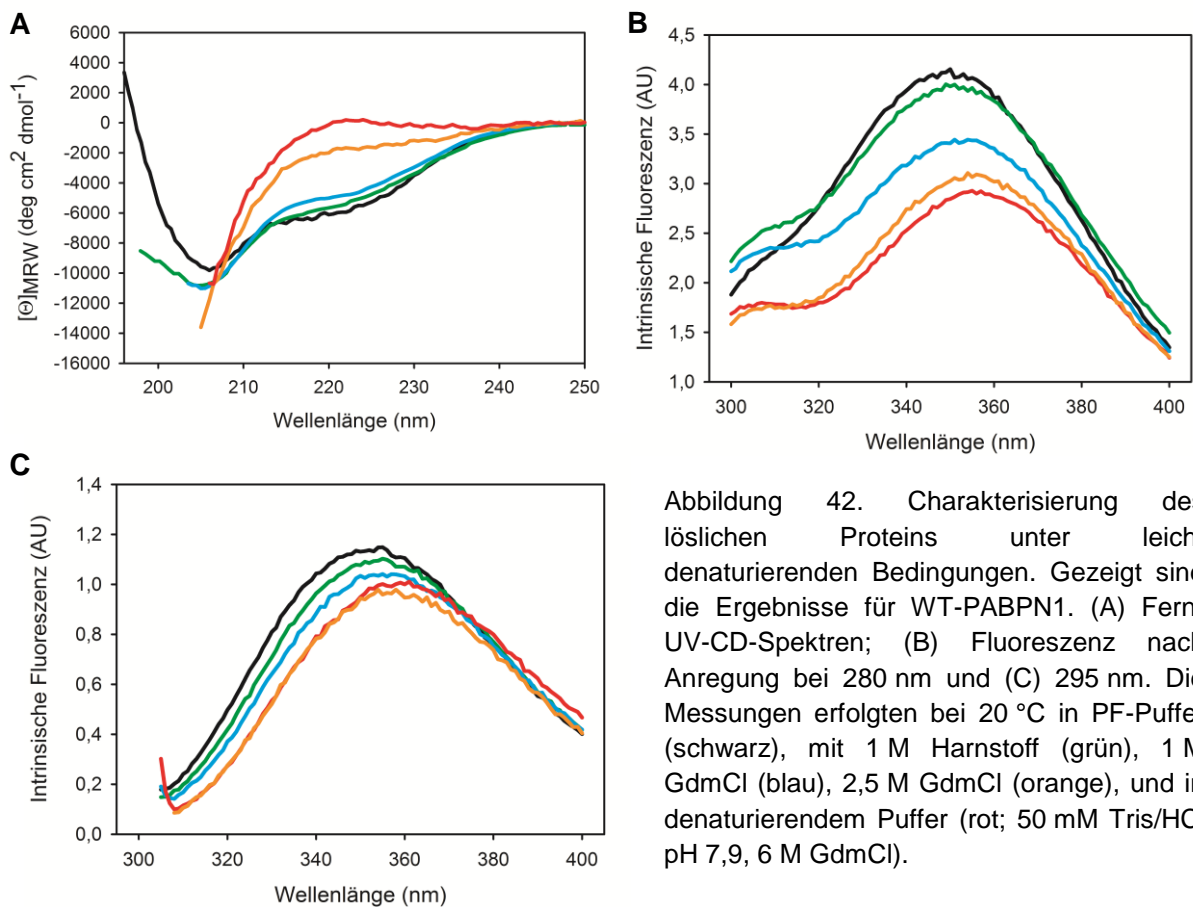


Abbildung 42. Charakterisierung des löslichen Proteins unter leicht denaturierenden Bedingungen. Gezeigt sind die Ergebnisse für WT-PABPN1. (A) Fern-UV-CD-Spektren; (B) Fluoreszenz nach Anregung bei 280 nm und (C) 295 nm. Die Messungen erfolgten bei 20 °C in PF-Puffer (schwarz), mit 1 M Harnstoff (grün), 1 M GdmCl (blau), 2,5 M GdmCl (orange), und in denaturierendem Puffer (rot; 50 mM Tris/HCl pH 7,9, 6 M GdmCl).

In Abbildung 42 sind die Ergebnisse für WT-PABPN1 dargestellt. Mit steigender Konzentration an Denaturierungsmittel wurde bei den Fern-UV-CD-Spektren eine Amplitudenabnahme oberhalb von 210 nm festgestellt. Diese Signaländerung entspricht dem Verlust an Sekundärstruktur. Bei 2,5 M GdmCl waren die Proteine nahezu vollständig entfaltet.

Die Fluoreszenzspektren des Proteins deuteten auf eine verstärkte Lösungsmittlexposition der aromatischen Aminosäuren mit steigender Konzentration an Denaturierungsmittel hin. Die Entfaltung des Proteins korrelierte mit einer bathochromen Verschiebung der Fluoreszenzmaxima und einer Intensitätsabnahme. Erneut zeigte sich, dass das Protein bei

2,5 M GdmCl nahezu vollständig entfaltet war. Die Spektren von Δ Ala-PABPN1 und (+7)Ala-PABPN1 sind mit denen von WT-PABPN1 vergleichbar (siehe 5.3).

3.6.2 Analyse der Fibrillenbildung

Nachdem bestätigt wurde, dass das Protein unter den leicht denaturierenden Bedingungen (1 M Harnstoff, bzw. GdmCl), teilweise bzw. mit 2,5 M GdmCl nahezu vollständig entfaltet vorlag, konnte nun die Fibrillenbildung unter diesen Bedingungen analysiert werden.

Die Ergebnisse der Fibrillierungen unter denaturierenden Bedingungen konnten nicht eindeutig reproduziert werden. Die Kinetiken der einzelnen Versuche unterschieden sich zum Teil stark voneinander. Der Unterschied könnte primär auf die amorphen Aggregationsprozesse während der Inkubation zurückzuführen sein, sodass je nachdem wie schnell das Protein aggregierte mehr oder weniger Protein für die Umlagerung zur Fibrille zur Verfügung stand. Es kann aber festgehalten werden, dass in Anwesenheit von 1 M Harnstoff oder 1 M GdmCl ein Anstieg der ThT-Fluoreszenzintensität für alle Proteine beobachtet wurde. Die Kinetiken waren annähernd vergleichbar mit denen, die ohne Denaturierungsmittel aufgenommen wurden (Abbildung 14). In Anwesenheit von 2,5 M GdmCl konnte eine *lag*-Phase von mehreren Tagen beobachtet werden, bevor die ThT-Fluoreszenzintensität anstieg. Ein Einfluss des Alaninsegmentes wurde nicht festgestellt.

Die Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchung der Proben nach Inkubation in 1 M GdmCl sind in Abbildung 43 dargestellt. Die Grids zeigten überwiegend amorph aggregiertes Protein. Lediglich bei (+7)Ala-PABPN1 konnten vereinzelt fibrillenartige Strukturen beobachtet werden. Sowohl bei Δ Ala- als auch WT-PABPN1 wurden ausschließlich Aggregate gefunden. Der Anstieg der ThT-Fluoreszenz während der Inkubation konnte in diesen Fällen nicht auf die Entstehung von Fibrillen zurückgeführt werden.

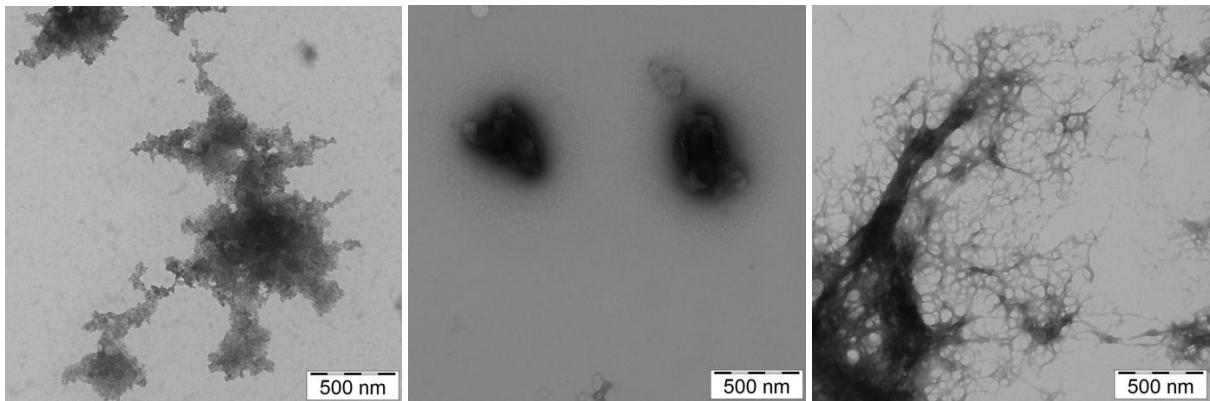


Abbildung 43. Elektronenmikroskopie der Fibrillierungsansätzen von Gesamtlängen-PABPN1 in Anwesenheit von 1 M GdmCl. WT- (links), Δ Ala- (mittig) und (+7)Ala-PABPN1 (rechts) nach 30 d Inkubationszeit bei 20 °C.

Ferner wurde die Fibrillenbildung der Δ C49-Varianten unter leicht denaturierenden Bedingungen untersucht. Weder in Anwesenheit von 1 M GdmCl noch 2,5 M GdmCl konnte eine Fibrillenbildung festgestellt werden. Vielmehr bildeten sich zahlreiche amorphe Aggregate.

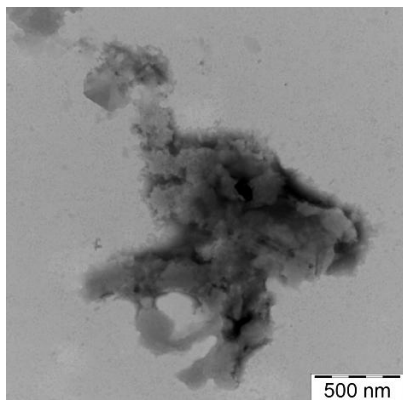


Abbildung 44. Amorphes Aggregat von Δ Ala- Δ C49 nach Inkubation in Anwesenheit von 1 M GdmCl nach 50 d Inkubation bei 20 °C.

3.7 Zusammenfassung Kapitel II

In Kapitel II wurden Ergebnisse vorgestellt, mit denen versucht wurde die Diskrepanz zwischen der alanininduzierten Fibrillenbildung der N-terminalen Region von PABPN1 mit der alaninunabhängigen Fibrillenbildung von Gesamtlängen-PABPN1 zu klären. Folgende Erkenntnisse konnten erhalten werden:

1. Eine alaninabhängige Umlagerung von N-terminalen PABPN1-Fragmenten zu Fibrillen war in PF-Puffer möglich.

Die N-terminalen Fragmente N-(+7)Ala und (+7)Ala-N147 bildeten in PF-Puffer Fibrillen, wogegen N- Δ Ala und Δ Ala-N147 nicht zu Fibrillen umlagerten.

Die in PF-Puffer gebildete Fibrillen besaßen die gleichen biophysikalischen Eigenschaften wie die in NF-Puffer erzeugten: Fibrilläres N-(+7)Ala und (+7)Ala-N147 zeichneten sich durch eine geringe Sensitivität gegenüber der Solubilisierung mit GdmCl aus. Die FTIR-Absorptionsspektren deuteten auf eine deutliche Zunahme an β -Faltblattstrukturanteilen hin.

2. Bei erhöhter Proteinkonzentration und Temperatur, sowie unter Anwesenheit von heterologen seeds konnte tendenziell für die Δ C49-Varianten eine alaninabhängige Fibrillenbildung induziert werden.

Die Umlagerung von löslichem Δ C49 zu Fibrillen bei einer Proteinkonzentration von 0,5 mM und 37 °C ließ tendenziell eine Beteiligung der Oligoalaninsequenz erkennen. Die Anwesenheit von seeds führte zu einem schnelleren Anstieg der ThT-Fluoreszenz.

3. Für Gesamtlängen-PABPN1 konnte trotz partieller Entfaltung keine alanininduzierte Fibrillenbildung erreicht werden.

Ein Einfluss des Alaninsegmentes auf die Fibrillenbildung von leicht denaturiertem und damit destabilisiertem Gesamtlängen-PABPN1 konnte nicht beobachtet werden.

4 Diskussion

4.1 Einfluss der Alaninsequenz auf die Struktur der monomeren Proteine

Da derzeit noch keine publizierten Daten vorliegen, die die Thermodynamik der Faltung des Gesamtlängen-Proteins beschreiben, können die im Rahmen dieser Dissertation erarbeiteten Ergebnisse nur bedingt in einen Literaturkontext gestellt werden. Erschwert wurden die Untersuchungen zur Umlagerung von PABPN1 durch die hohe Aggregationsneigung des Proteins *in vitro*, die vermutlich auf eine Interaktion zwischen dem N- und C-terminalen Bereich zurückzuführen ist. Betrachtet man die ersten 150 Reste des Proteins, so besteht die Sequenz zu über 20% aus L-Glutaminsäureresten. Der hohe Anteil der sauren Aminosäure führt zu einem pI von ca. 4. Die Sequenz der C-terminal letzten 90 Aminosäuren besteht dagegen zu ca. 14% aus L-Argininresten und resultiert in einem pI von 11,5. Dieser zwitterionische Charakter von PABPN1 könnte zu ionischen Wechselwirkungen zwischen den terminalen Bereichen führen und somit eine Zusammenlagerung des Proteins bewirken, die in einer amorphen Aggregation resultiert. In vorangegangenen Arbeiten wurden Bedingungen gefunden, die Untersuchungen des Proteins im Konzentrationsbereich um 60 μM ermöglichen [134]. Die Verwendung von 1,5 M KCl diente der Unterdrückung ionischer Wechselwirkungen zwischen den terminalen Regionen. Zudem wurden 10% (v/v) Glycerin verwendet, welches der Abschwächung hydrophober Effekte diente.

Zunächst wurde das lösliche Protein in dem verwendeten Puffersystem charakterisiert. Um einen möglichen Einfluss der N-terminalen Alaninsequenz auf die Proteinstruktur und später auf die konformationelle Umlagerung zu untersuchen, wurden drei verschiedene PABPN1-Varianten analysiert, die sich in der Länge des Alaninsegmentes unterschieden: das Wildtypprotein mit zehn Alaninresten (WT-PABPN1), eine krankheitsassoziierte, expandierte Variante mit 17 Alaninen, ((+7)Ala-PABPN1) und eine Deletionsvariante ohne Alaninsequenz (Δ Ala-PABPN1).

Wie in der Dissertation von Till Scheuermann bereits angemerkt, konnte kein Einfluss der N-terminalen Alaninsequenz auf die Proteingesamtstruktur festgestellt werden [134]. Bei den biophysikalischen Untersuchungen zeigten alle Varianten vergleichbare spektroskopische Eigenschaften. Es wurde vermutet, dass die Expansion des Alaninsegmentes in einem zunehmenden α -helikalen Sekundärstrukturanteil resultiert, wie es bei Analysen der N-terminalen Region von PABPN1 mittels CD-Spektroskopie festgestellt werden konnte

[134]. Da sich die Strukturänderung wahrscheinlich nur auf das Alaninsegment selbst beschränkt, könnte die Änderung, die im Falle des Gesamtlängen-Proteins nur etwa 5% der Aminosäuresequenz umfasst, im CD-Spektrum von den Sekundärstruktursignalen des Restproteins maskiert worden sein.

Ein Einfluss der Alaninexpansion auf die RNA-Bindung konnte ebenfalls nicht festgestellt werden. Die unveränderte Bindungsaffinität erklärt sich damit, dass an der RNA-Bindung lediglich die RRM-Domäne und Teile der C-terminalen Region beteiligt sind [107]. Eine N-terminale Expansion bzw. Deletion des Alaninsegmentes wirkt sich somit nicht auf das Bindungsverhalten von PABPN1 aus. Da das α -helikale Segment der N-terminalen Region von PABPN1 mit der Poly(A)-Polymerase interagiert, hätte ein entsprechender Assay zur Stimulierung der Polymerase Informationen zum Einfluss der Alaninsequenz auf die Interaktion geben können [111]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf den Assay verzichtet, da bereits Analysen von expandierten PABPN1 aus Myoblasten belegten, dass die Expansion keinen Einfluss auf die Polyadenylierung hat [91].

4.2 Der fibrilläre Zustand von PABPN1

4.2.1 Untersuchung der Fibrillenbildung

Bei Untersuchungen zur Fibrillenbildung von Gesamtlängen-PABPN1 konnte festgestellt werden, dass das Alaninsegment keinen Einfluss auf die Fibrillierung hat. (+7)Ala-PABPN1 zeigte keine beschleunigte Fibrillenbildung gegenüber den anderen Varianten. Viel überraschender war jedoch, dass auch die Variante ohne Alaninsegment, Δ Ala-PABPN1 zu fibrillärem Protein umlagerte. Das Ergebnis stand im scheinbaren Widerspruch zu vorangegangenen Arbeiten der Gruppe, in der für die N-terminale Region von PABPN1 eine alaninabhängige Fibrillierung beobachtet wurde [110,133]. Für das Gesamtlängen-Protein wurde in anderen Arbeitsgruppen ein vergleichbares Verhalten beschrieben: Bei transienter Expression von PABPN1-GFP-Fusionen konnte auch in Abwesenheit des Alaninsegmentes in HeLa- oder myogenen C2-Zellen eine intranukleäre Aggregation festgestellt werden [95,113]. Unabhängig von der Länge der Alaninsequenz aggregierte das Protein in nukleären *speckles* [95]. Im Gegensatz dazu zeigten andere Arbeitsgruppen, ebenfalls in HeLa-Zellen, dass sich WT-PABPN1 im gesamten Zellkern verteilt, wogegen eine Akkumulation in *speckles* nur für die expandierte Variante beobachtet wurde [114]. Ein direkter Vergleich zwischen den *in vivo*-Studien und den Ergebnissen der *in vitro*-Analysen dieser Arbeit ist jedoch nur bedingt möglich.

Die Literatur hinsichtlich des Aggregationsverhaltens von PABPN1 ist sehr widersprüchlich. Zudem wurde bei vielen Studien auf die Untersuchung der Deletionsvariante verzichtet, sodass nur wenige Daten von Δ Ala-PABPN1 zur Verfügung stehen.

Die Fibrillierungskinetiken der Gesamtlängen-Proteine zeigten einen hyperbolen Verlauf. Im Allgemeinen wird jedoch für die Umlagerung zu amyloiden Strukturen ein sigmoider Verlauf angenommen, der einen nukleationsabhängigen Mechanismus widerspiegelt [151,152]. Die initiale *lag*-Phase beschreibt dabei die Zusammenlagerung von schwer detektierbaren Oligomeren, an denen in der darauffolgenden exponentiellen Phase das Fibrillenwachstum stattfindet. Die Entstehung von Fibrillen geht in eine Plateauphase über, wenn eine kritische Konzentration an noch löslichem Protein erreicht ist [151]. Grund für den hyperbolen Verlauf der Fibrillierungskinetik von PABPN1 könnte die Anwesenheit von bereits gebildeten Nukleationskeimen zu Beginn der Kinetik sein. Um die Anwesenheit von Nukleationskeimen auszuschließen, wurden alle Proben vor den Analysen ultrazentrifugiert. Zur Überprüfung, ob die Fibrillenbildung die Entstehung von Nukleationskeimen voraussetzt, wurden die Proben mit *seeds* versetzt. *Seeds* sind Fibrillenbruchstücke, die als heterologe Nukleationskeime in die Fibrillierungsreaktion gegeben werden können. Eine zuvor sigmoide Kinetik zeigt dabei in Anwesenheit von *seeds* meist einen hyperbolen Verlauf [151]. Ein Einfluss von heterologen *seeds* auf die Fibrillenbildung von Gesamtlängen-PABPN1 konnte nicht festgestellt werden. Berücksichtigt werden muss aber, dass die *seeds*, die von Fibrillen der N-terminalen Region von PABPN1 stammten [110] wahrscheinlich lediglich eine alaninabhängige Fibrillierung beschleunigen. Wie aber bereits die Kinetiken der PABPN1-Varianten zeigten, fibrillierte Gesamtlängen-PABPN1 alaninunabhängig.

Die zeitabhängige Analyse der Fibrillierungsansätze mittels Gelfiltration bestätigte, dass sich während der Umlagerung höhermolekulare Strukturen bildeten. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass diese Strukturen kurze Fibrillenstücke darstellen. Oligomere Vorstufen, wie Dimere, Tetramere,... wurden durch diese Methode nicht identifiziert. Auch konnten keine oligomeren Strukturen in der Elektronenmikroskopie beobachtet werden, wie es beispielsweise für das Morbus Alzheimer assoziierte $A\beta_{1-42}$ gezeigt wurde. Die $A\beta$ -Oligomere wiesen eine kugelartige Morphologie auf und zeigten Durchmesser von ca. 5 nm [142,143]. Bei PABPN1 wurden jedoch nach 15-minütiger Inkubation bereits kurze fibrilläre Strukturen beobachtet. Kugelartige Strukturen konnten zu keinem Zeitpunkt identifiziert werden.

Wie der hyperbole Verlauf der Fibrillierungskinetik bereits andeutete, scheint die Fibrillenbildung von PABPN1 ein „linearer Prozess“ zu sein, der durch Umlagerung und Assemblierung von monomerem Protein zu fibrillären Strukturen charakterisiert sein könnte. Die Oligomerbildung würde sich dann auf einen sehr frühen Zeitpunkt beschränken und nach 15 min bereits in kurzen Fibrillen resultieren.

4.2.2 Strukturelle Charakterisierung des fibrillären Zustandes des Gesamtlängen-Proteins

Um Hinweise zu erhalten, ob es sich bei den gebildeten Fibrillen um amyloide Aggregate handelte, wurde der fibrilläre Zustand der Proteine näher untersucht. Die Analyse der Proben mittels Elektronenmikroskopie belegte die Existenz von klar abgegrenzten, fibrillären Strukturen. Die Fibrillen waren in ihrer Morphologie mit amyloiden Fibrillen vergleichbar [110]. Ein Hinweis auf die amyloide Natur der Fibrillen wurde durch die Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes Thioflavin T erhalten. Dem gegenüber wurde Kongorot eher schlecht gebunden und führte nur zu einer geringfügigen Erhöhung der Kongorotabsorption, hinweisend auf einen nicht-amyloiden Charakter der Fibrillen (Daten nicht gezeigt). Dieses Verhalten wurde bereits in vorherigen Arbeiten der Gruppe beschrieben [134]. Beide Farbstoffe werden standardmäßig zur Detektion amyloider Fibrillen eingesetzt [55,153–155]. Thioflavin T interkaliert dabei in Furchen, die in der β -cross-Struktur amyloider Fibrillen durch die reiverschlussartige Zusammenlagerung der β -Faltblattstrukturen entstehen [156]. Kongorot wird bevorzugt zur Analyse von Aggregaten in Zellen oder Geweben eingesetzt. Amyloide Aggregate führen dabei zu einer grünen Lichtdoppelbrechung bei Bestrahlung mit polarisiertem Licht bzw. zu einer Erhöhung der Lichtabsorption bei ca. 500 nm durch den Farbstoff [157].

Die Analyse der Proteine mittels limitierter Proteolyse zeigte, dass PABPN1 einer Konformationsänderung während der Fibrillierung unterlag. Die Hydrolysemuster der monomeren Proteine unterschieden sich deutlich von denen der Fibrillen. Für fibrilläres Protein konnte eine erhöhte Resistenz gegenüber der Proteolyse festgestellt werden. Die geringere Sensitivität von Fibrillen gegenüber Proteasen wird in der Literatur für amyloide Aggregate beschrieben [54,158,159].

Einen weiteren Hinweis auf eine mögliche amyloide Struktur lieferten die Untersuchungen der Proteinaggregate mittels FTIR. Der Vergleich der Infrarotabsorptionsspektren von löslichem und fibrillärem Protein deutete auf einen zunehmenden β -Faltblattstrukturanteil im aggregierten Protein hin. Die Änderung des FTIR-Spektrums war dabei nicht so ausgeprägt, wie es beispielsweise bei der N-terminalen Region von PABPN1 beobachtet wurde [110]. Grund hierfür könnte sein, dass die Umlagerung zur Fibrille nur auf einen kleinen Teil des Proteins beschränkt ist. *Solid state*-NMR-Analysen von N-(+7)Ala zeigten, dass sich die Fibrillenkerndstruktur auf ca. 40 Reste beschränkt [150]. Da PABPN1 ein Multidomnenprotein von 306 Aminosäureresten ist, kann davon ausgegangen werden, dass ein Großteil des Proteins von der Umlagerung nicht beeinflusst wird und somit die Strukturänderung des Bereiches, der an der Ausbildung der Fibrillen beteiligt ist, keinen dominanten Einfluss auf

das Infrarotabsorptionsspektrum des Gesamtlängen-Proteins hat. Dass das fibrilläre Protein noch native Strukturanteile besitzt, bestätigten die RNA-Bindungsstudien. PABPN1-Fibrillen waren in der Lage Oligoadenylat-RNA zu binden, wenn auch mit einem zehnfach höheren K_D -Wert, verglichen mit dem löslichen Protein.

Die CD-Spektren der monomeren Proteine deuteten auf einen ausgeprägten α -helikalen Strukturanteil hin, der auch im fibrillären Protein beobachtet wurde, wenngleich auch mit geringeren Amplituden. Bereiche mit α -helikaler Konformation scheinen demnach nicht von der Umlagerung betroffen zu sein. Aus Strukturvorhersagen zu PABPN1 [134] und der Kristallstruktur der RRM-Domäne [108], könnten diese Bereiche die RRM-Domäne selbst oder die postulierte α -helikale Region sein. Es muss aber berücksichtigt werden, dass die CD-Spektroskopie eher wenig geeignet ist, um Proteinaggregate hinsichtlich ihrer Struktur zu charakterisieren. Zudem dominieren allgemein α -helikale Strukturen das CD-Spektrum, die FTIR-Absorptionsspektroskopie ist dagegen sensitiver gegenüber β -Faltblattstrukturen.

Um weitere Informationen hinsichtlich der Struktur der Fibrillen zu erhalten, wurde versucht Röntgenbeugungsmuster von den Fibrillen aufzunehmen. Röntgenbeugungsmuster von Peptiden mit ausgeprägter β -cross-Struktur zeigen zwei dominante Reflektionen bei ca. 4 und 10 Å, die den Abständen zwischen den einzelnen β -Strängen (4 Å) und den β -Faltblättern (10 Å) entsprechen [53,160]. Die Qualität der Beugungsmuster war jedoch zu schlecht, da die zuvor lyophilisierten Fibrillen noch zu viel Wasser beinhalteten. Aussagen hinsichtlich der Struktur konnten so nicht getroffen werden (Daten nicht gezeigt).

Vergleicht man die biochemischen Eigenschaften der Fibrillen von PABPN1 mit denen von N-(+7)Ala, so sind große Unterschiede hinsichtlich der Sensitivität gegenüber Proteasen und der Solubilisierung mit Denaturierungsmitteln festzustellen. Nur die Hälfte der amyloiden Fibrillen von N-(+7)Ala konnte durch Inkubation in 6 M GdmSCN über 6 h aufgelöst werden [133]. Dagegen wurden die Aggregate des Gesamtlängen-PABPN1 bereits mit 2 M GdmCl innerhalb 1 h zu 50% solubilisiert. Allgemein sind die amyloiden Eigenschaften bei fibrillärem PABPN1 schwächer ausgeprägt als bei N-(+7)Ala-Fibrillen.

Die Ergebnisse und die biochemischen Eigenschaften der Fibrillen deuten zwei unterschiedliche Prozesse der Umlagerung zur fibrillären Konformation an: (1) eine alaninabhängige Umlagerung der isolierten N-terminalen Region zu amyloiden Fibrillen und (2) eine alaninunabhängige Aggregation des Gesamtlängen-Proteins zu fibrillären Strukturen.

Ein ähnliches Verhalten konnte bei Untersuchungen des Prionenproteins Ure2p aus *Saccharomyces cerevisiae* beobachtet werden. Während die isolierte N-terminale Prionendomäne zu amyloiden Fibrillen umlagerte, konnte im Kontext des Gesamtlängen-Proteins eine Aggregation zu Fibrillen mit hohem α -helikalen Strukturanteil beobachtet werden. Die konformationelle Änderung der N-terminalen Domäne wurde demnach im Gesamtlängen-Ure2p vollständig unterdrückt. Ebenfalls konnte die Fibrillenbildung von Ure2p nicht durch Zugabe von *seeds* der Prionendomäne beschleunigt werden [161].

4.2.3 Einfluss der C-terminalen Region auf die Fibrillenbildung von Gesamtlängen-PABPN1

Es stellt sich die Frage, welche Bereiche im Gesamtlängen-PABPN1 an der Konformationsänderung beteiligt sind. Um diese Regionen zu identifizieren, wurde mit löslichem und fibrillärem Protein eine limitierte Proteolyse durchgeführt. Kombiniert wurden die Hydrolyseexperimente mit einer anschließenden Analyse der Proteolysefragmente mittels Massenspektrometrie. Für amyloide Aggregate wird im Allgemeinen angenommen, dass die Ausbildung der β -cross-Struktur zu proteolysegeschützten, rigiden Bereichen führt. Somit kann die limitierte Proteolyse zur Identifizierung der Fibrillenkerntstruktur beitragen [54,158,159]. Die Ergebnisse bestätigten, dass die N-terminale Alaninsequenz bei der Fibrillenbildung von Gesamtlängen-PABPN1 *in vitro* eine untergeordnete Rolle spielte, da ein rascher Abbau des Proteins vom N-Terminus her beobachtet werden konnte. Viel interessanter war jedoch, dass die Analysen stark auf eine Beteiligung der C-terminalen Region im Fibrillierungsprozess hindeuteten. Die Ergebnisse der Massenspektrometrie wurden durch Untersuchungen der Fluoreszenzeigenschaften des in der C-terminalen Region lokalisierten Tryptophanrestes (Trp302) bekräftigt. Im fibrillären Protein konnte eine hypsochrome Verschiebung des Fluoreszenzmaximums, verglichen mit dem löslichen Protein, festgestellt werden. Diese Verlagerung des Maximums korreliert mit einer verminderten Lösungsmittlexposition von Trp302 und könnte ein Hinweis auf eine kompaktere Struktur, und somit auf eine Umlagerung zur Fibrille sein.

Auch in der Literatur wurde der C-terminalen Region von PABPN1 eine entscheidende Rolle bei Aggregationsprozessen zugeschrieben. So konnte die Ablagerung von PABPN1 in nukleären *speckles* vollständig unterdrückt werden, wenn PABPN1 ohne die C-terminalen 49 Aminosäuren (Δ C49) in HeLa-Zellen exprimiert wurde [95]. Sogar lediglich die Deletion der C-terminal letzten sechs Aminosäuren unterdrückte die Aggregatbildung in COS-7-Zellen [112]. Berücksichtigt werden sollte aber, dass in dieser Region das Kernlokalisierungssignal vorhanden ist und somit die Verteilung von PABPN1 in den Zellen

gestört ist [103]. Auch *in vitro* zeigten PABPN1-Varianten ohne die C-terminale Region ein weitaus geringeres Potenzial zur Aggregation [117]. Während der Reinigung der Proteine konnte für die Δ C49-Varianten kaum eine amorphe Aggregation festgestellt werden, wogegen Gesamtlängen-PABPN1 eine hohe Tendenz zeigte. Der Versuch die C-terminalen 49 Aminosäuren isoliert zu reinigen scheiterte, da selbst im Kontext mit der Löslichkeitvermittelnden SUMO-Fusion das Protein nahezu vollständig amorph aggregierte (Daten nicht gezeigt).

Um den Einfluss der C-terminalen Region auf die Aggregation von PABPN1 bestätigen zu können, wurden Varianten untersucht, bei denen die letzten 49 Reste deletiert waren. Eine Umlagerung zu Fibrillen, bei den selben Bedingungen unter denen das Gesamtlängen-Protein analysiert wurde (60 μ M Proteinkonzentration, 20 °C), konnte nicht beobachtet werden. Demgegenüber wurde eine Fibrillenbildung einer N-terminalen Deletionsvariante, in der die ersten 114 Aminosäuren und damit ein Großteil der N-terminalen Region deletiert waren (SUMO- Δ N114), beobachtet. Fibrilläres SUMO- Δ N114 war in seinen Eigenschaften vergleichbar mit den Fibrillen des Gesamtlängen-Proteins. Die Ergebnisse belegten die Notwendigkeit der C-terminalen Region und die Redundanz der N-terminalen Region auf die Fibrillenbildung von Gesamtlängen-PABPN1. Unterstützt wurde das Ergebnis durch die Ko-Fibrillierungsexperimente der Δ C49-Varianten mit SUMO- Δ N114. Lediglich das Protein fibrillierte, in welchem die letzten 49 Aminosäuren vorhanden waren. „Gemischte Fibrillen“ aus Δ C49 und SUMO- Δ N114 wurden nicht identifiziert. Indirekt deutet das Resultat darauf hin, dass sich die Umlagerung auf die C-terminalen 49 Reste beschränkt. Die Ergebnisse der *in vitro* Experimente ergänzten und bekräftigten die zuvor publizierten *in vivo* Daten [95,112].

An dieser Stelle sollte berücksichtigt werden, dass unter veränderten Bedingungen, also erhöhter Proteinkonzentration (0,5 mM anstelle 60 μ M) und Temperatur (37 °C statt 20 °C) eine Fibrillenbildung der Δ C49-Varianten beobachtet wurde (siehe 4.4). Tendenziell konnte dabei eine alaninabhängige Umlagerung wiederhergestellt werden. Indirekt deuten somit die Ergebnisse der Fibrillenbildung des Gesamtlängen-Proteins und der Δ C49 auf zwei unterschiedliche Prozesse hin: einer alaninabhängigen Assemblierung und einer auf der C-terminalen Region basierenden Umlagerung.

4.2.4 Das „EISENBERG-Postulat“ – *in silico*-Analyse von PABPN1

2007 veröffentlichte DAVID EISENBERG ein neues Modell zur Fibrillenstruktur und postulierte, dass ein *steric zipper* bestehend aus 6–8 Aminosäuren die Fibrillenkerntstruktur bildet [67]. In den folgenden Jahren entwickelte die EISENBERG-Gruppe das Programm *ZipperDB* zur Identifizierung von Peptidsequenzen, die in der Lage sind einen *steric zipper* zu bilden [162]. Das Programm basiert auf der Sequenz NNQQNY des Prionenproteins Sup35 aus *Saccharomyces cerevisiae* und legt die Kristallstruktur dieses Peptides den Berechnungen zugrunde. Der Algorithmus passt konsekutiv Hexapeptide des zu analysierenden Proteins in die Kristallstruktur ein und berechnet den *energetic fit* („Energiegehalt des *alignment*“). Ein Schwellenwert von -23 kcal/mol wird dabei zugrunde gelegt. Energien unterhalb des Wertes deuten auf ein potenzielles Fibrillenbildungsvermögen hin [163]. Bisher wurden bereits über 20000 Proteinsequenzen analysiert und in einer Datenbank zusammengefasst (<http://services.mbi.ucla.edu/zipperdb/>).

PABPN1 wurde ebenfalls mithilfe der Methode analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 45 dargestellt. Sequenzen, die in das *steric zipper*-Modell von Sup35 passen, sind rot, Peptide die nicht in das Modell passen grün bzw. blau dargestellt. Basierend auf dem Programm *ZipperDB* ist nur die Oligoalaninsequenz von PABPN1 in der Lage eine amyloide Fibrillenstruktur aufzubauen. Die *in silico*-Analyse stimmt damit sehr gut mit den Ergebnissen zur Fibrillenbildung der N-terminalen Region von PABPN1 überein. Ferner zeigt die C-terminale Region ein sehr geringes Potenzial zur Fibrillenbildung nach dem *steric zipper*-Modell. Eine Fibrillenbildung unter Beteiligung der C-terminalen Region sollte jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden, allerdings deutet die Sequenzanalyse indirekt auf einen nicht-amyloiden Charakter der PABPN1-Fibrillen hin. Im folgenden Kapitel werden daher andere Möglichkeiten der Assemblierung von Proteinen zu fibrillären Strukturen diskutiert.

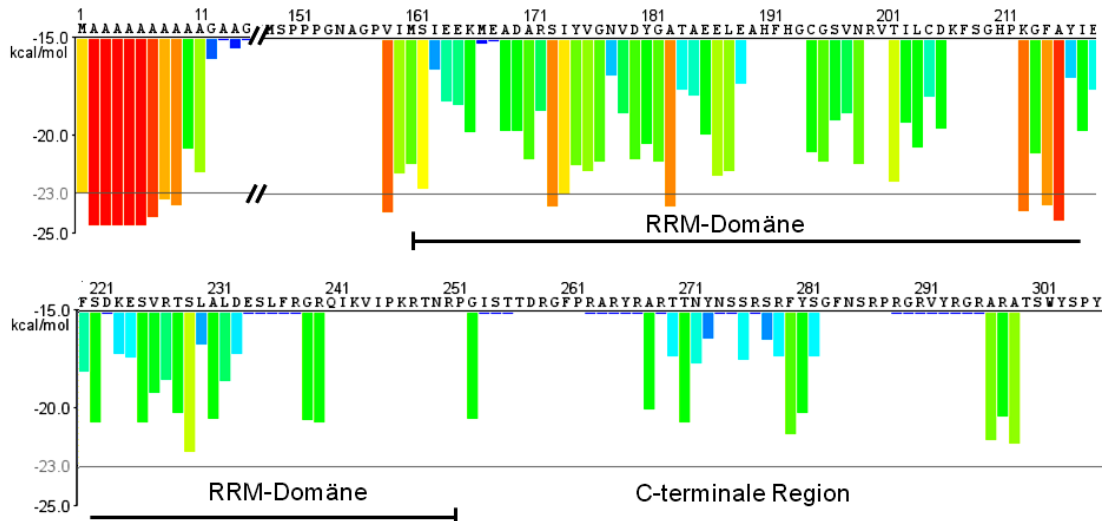


Abbildung 45. Ausschnitte aus der Sequenzanalyse von PABPN1 mit dem Programm *ZipperDB* (<http://services.mbi.ucla.edu/zipperdb/>). Die Balken repräsentieren den *energetic fit* („Energiegehalt des *alignment*“). Ein *energetic fit* oberhalb des gesetzten Schwellenwerts von -23 kcal/mol (rote Balken) deutet auf eine hohe Wahrscheinlichkeit der Fibrillenbildung nach dem Sup35-Hexapeptid-Modell hin. Blaue Balken markieren Regionen mit geringer Wahrscheinlichkeit zur Fibrillenbildung nach dem Modell.

4.3 Mögliche Ursachen der Assemblierung von PABPN1

In der Natur gibt es viele Proteine, die zu höhermolekularen Strukturen assemblieren, die nicht zwangsläufig amyloiden Charakters sind. Das Strukturprotein Aktin ist eines der bekanntesten Beispiele. Globuläre Aktinmoleküle assemblieren zu langen fibrillären Strukturen. Die Assemblierung von Aktin wurde 1990 mit dem Filamentmodell nach KENNETH HOLMES beschrieben [164]. Die Ausbildung der Fibrille basiert dabei auf einer Interaktion großer Oberflächenbereiche zwischen zwei Aktinmolekülen über eine sogenannte *long pitch helix*. Ferner arrangieren sich *loop*-Regionen zu antiparallelen β -Faltblattstrukturen [165].

Bei Kollagen ordnen sich Polypeptidketten mit repetitiven Sequenzen (L-prolin- und L-glycinreich) zu einer linksgängigen α -helikalen Kette an. Drei dieser Stränge ordnen sich wiederum zu einer rechtsgängigen Kollagentripelhelix an. Dabei können sowohl lineare, als auch verzweigte Strukturen ausgebildet werden [166,167].

Einer weiteren Gruppe von Faserproteinen, den Keratinen wurde bereits in den 1970er Jahren ebenfalls eine filamentöse Struktur zugeschrieben [168,169]. Aus dem Röntgenbeugungsmuster der Keratine wurden vorwiegend α -helikale Strukturanteile in den Filamenten identifiziert. Heute wird zwischen α - und β -Keratinen unterschieden, entsprechend ihres charakteristischen Sekundärstrukturgehaltes. Die α -Keratine sind ähnlich hierarchisch

aufgebaut wie Kollagene. Charakteristisch für Keratine ist ein hoher Anteil an L-Glycinresten und ein hoher Grad an disulfidverbrückten L-Cysteinen innerhalb der helikalen Filamente.

Eine weitere Möglichkeit der Oligomerisierung von Proteinen besteht im Austausch gleicher Domänen innerhalb zweier Proteinmoleküle. Der Tausch von einzelnen Sekundärstrukturelementen oder ganzen Domänen wird *domain swapping* genannt. 2001 beschrieben Janowski *et al.* eine Dimerisierung des amyloidogenen Proteins Cystatin C [170]. Das Protein besteht aus fünf antiparallelen β -Strängen und zwei α -Helices. Durch *domain swapping* werden ein β -Strang und eine α -Helix zwischen zwei Cystatin C-Molekülen ausgetauscht und das Protein dimerisiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass die amyloiden Fibrillen dieses Proteins aus dem *domain swapping* mehrerer Proteinmonomere resultierte [171,172].

Domain swapping kann auch bei der bovinen Ribonuklease A zu amyloiden Strukturen führen, wenn eine amyloide Sequenz in eine *loop*-Region des Proteins eingeführt wird. Die Insertion induziert dabei das *domain swapping*, wobei das inserierte amyloide Hexapeptid eine Fibrillenbildung einleitet. Die Ribonuklease A liegt innerhalb der Fibrillen nativ gefaltet vor [173,174]. In der Literatur finden sich weitere Beispiele (Prionenprotein [175], β_2 -Microglobulin [176]) die belegen, dass ein *domain swapping* Ursache der amyloiden Fibrillenbildung sein kann.

Welches der genannten Modelle die Fibrillenbildung von PABPN1 hervorruft, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Das Modell, welches der Kollagen- und Keratinassemblierung zugrunde liegt, kann aber weitgehend ausgeschlossen werden, da die Grundvoraussetzungen, nämlich repetitive α -Helix-induzierende Sequenzen in PABPN1 nicht vorhanden sind.

Eine nicht-kovalente Interaktion, wie sie bei Aktinmonomeren beobachtet wird, könnte demgegenüber eine Alternative darstellen. Ionische Wechselwirkungen, wie sie bei Aktin beobachtet wurden, sind aber unwahrscheinlich, da die Fibrillenbildung von PABPN1 bei hoher Ionenstärke stattfand. Dennoch könnten zwei Regionen im Protein miteinander interagieren und somit zur Assemblierung zur Fibrille führen. Beispielsweise wurde für die RRM-Domäne von PABPN1 eine mögliche Interaktion der β_2 -Stränge zweier Monomere und somit eine Dimerisierung dieser Domäne postuliert. Gestützt wird die Vermutung durch die NMR-Struktur der RRM-Domäne im homologen Protein des Krallenfrosches *Xenopus laevis*, die eine Dimerisierung der Domäne beschreibt [108]. Dass die Oligomerisierung der RRM-Domäne Grund für die Fibrillenbildung von PABPN1 ist, ist aber unwahrscheinlich, da in diesem Fall bei den Ko-Fibrillierungsexperimenten von $\Delta C49$ mit SUMO- $\Delta N114$ „gemischte Fibrillen“ zu erwarten wären. Es konnte in den Fibrillen jedoch lediglich SUMO- $\Delta N114$ identifiziert werden. Eine Oligomerisierung über die RRM-Domäne fand somit nicht statt.

Eine auf ionischen Wechselwirkungen basierende „Kopf zu Schwanz“-Assemblierung von PABPN1 [134], kann ebenfalls als Ursache der Fibrillenbildung ausgeschlossen werden, da für die Fibrillierung die N-terminale Region nicht notwendig war (SUMO- Δ N114 fibrilliert). Zudem sollte eine Salzkonzentration von 1,5 M KCl eine ionische Interaktion ausschließen.

Eine Interpretation der Daten fällt schwer und die Ergebnisse erlauben keine Aussagen über die molekularen Hintergründe der Umlagerung von PABPN1. Zudem hindert das Fehlen von Strukturdaten der C-terminalen Region von PABPN1 das Verständnis der Fibrillenbildung.

PABPN1 zeigt per se ein hohes Potenzial zur Aggregation. Diese Fähigkeit könnte auf die Funktion des Proteins, nämlich der Assemblierung auf der wachsenden Adenylatsequenz am 3'-Ende von mRNA, zurückzuführen sein. Bei Untersuchungen der Morphologie von PABPN1 in Anwesenheit von Oligoadenylat-RNA konnte eine Zusammenlagerung des Proteins zu kleinen fibrillären Strukturen und kompakten Oligomeren beobachtet werden [118]. Obwohl die Fibrillenbildung in Abwesenheit von RNA analysiert wurde, kann ein Prozess basierend auf der „funktionellen Assemblierung“ nicht ausgeschlossen werden. Zudem waren die Aggregate in der Lage Oligoadenylat-RNA zu binden. Die Fibrillenbildung in Anwesenheit von RNA wurde ebenfalls untersucht. Ein Effekt auf die Fibrillenbildung konnte jedoch nicht beobachtet werden. Grund hierfür war die hohe Salzkonzentration, die eine Wechselwirkung zwischen RNA und PABPN1 vollständig unterdrückte.

Für PABPN1 finden sich in der Literatur weitere Hinweise auf mögliche Ursachen der Fibrillenbildung. Zwei Oligomerisierungsregionen wurden für das Protein postuliert. Diese Bereiche wurden mithilfe des *yeast two hybrid*-Systems identifiziert und erstrecken sich über die Reste 155–294 und 264–306 [112]. Beide Regionen beinhalten Reste des C-terminalen Bereiches von PABPN1. In den Δ C49-Varianten sind diese Oligomerisierungssequenzen vollständig bzw. teilweise deletiert. Eine Assemblierung von PABPN1 basierend auf diesen Bereichen wäre damit nicht möglich und könnte erklären warum die Δ C49-Varianten, unter den Bedingungen des Gesamtlängen-Proteins (60 μ M Protein, 20 °C), nicht zur Fibrille umlagerten. Fan *et al.* zeigten, dass bereits die Deletion von 6–8 Aminosäuren in diesen Regionen die Akkumulation von PABPN1 in *speckles* von COS-7-Nuclei vollständig unterdrückte [112]. Die Untersuchungen wurden mit einer um sieben Alanine expandierten PABPN1-Variante durchgeführt. Für die Aggregation in *speckles* war nicht die expandierte Alaninsequenz entscheidend, sondern die intakten Oligomerisierungsregionen. Sind diese Bereiche vollständig im Protein vorhanden, wie es in der SUMO- Δ N114-Variante der Fall ist, so kann eine alaninunabhängige Assemblierung von PABPN1 stattfinden.

Ein Vergleich dieser Regionen mit dem Ergebnis des *ZipperDB*-Programmes zeigt, dass für beide Oligomerisierungsbereiche eine amyloide Fibrillenbildung basierend auf der 3D-Struktur

des Hexapeptids NNQQNY aus Sup35 nicht wahrscheinlich ist. Es finden sich nur wenige Reste, die in die Struktur des Hexapeptids passen (Abbildung 45). Wie jedoch bereits angemerkt, sollte eine Assemblierung von PABPN1 auf Grundlage der Oligomerisierungsregionen nicht ausgeschlossen werden, vielmehr sollte ein nicht-amyloider Charakter der Fibrillen in Betracht gezogen werden.

4.4 Wiederherstellung der alaninabhängigen Fibrillenbildung bei den Δ C49-Varianten

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, kann PABPN1 bei einer Proteinkonzentration von 60 μ M in Abwesenheit der C-terminalen 49 Aminosäuren nicht zur Fibrille umlagern. Überraschend war zunächst, dass eine alaninabhängige Fibrillenbildung, wie sie bei der isolierten N-terminalen Region beobachtet wurde, nicht festgestellt werden konnte. Grund hierfür könnte die Proteinkonzentration sein: Für die amyloide Fibrillenbildung ist eine kritische Proteinkonzentration notwendig, unterhalb welcher keine Fibrillenbildung stattfindet [151]. N-(+7)Ala wurde bei Konzentrationen oberhalb von 0,5 mM fibrilliert [134,135]. Die Fibrillierung der Δ C49-Varianten wurde deshalb bei erhöhter Proteinkonzentration und in Anwesenheit von N-(+7)Ala-seeds untersucht. Eine alaninabhängige Fibrillenbildung konnte tendenziell wiederhergestellt werden und stützt die Vorstellung von zwei endogenen Assemblierungsprozessen von PABPN1: eine alaninabhängige Umlagerung der N-terminalen Region zu amyloiden Fibrillen und eine alaninunabhängige Zusammenlagerung zu fibrillären Strukturen. Ferner wurde versucht, durch partielle Entfaltung des Gesamtlängen-Proteins mittels Guanidiniumchlorid die alaninabhängige Fibrillenbildung wiederherzustellen. Bei diesen Untersuchungen überwog jedoch die amorphe Aggregation. Zudem ist es unwahrscheinlich, dass bei 60 μ M eine alaninabhängige Umlagerung zu beobachten ist, da diese auch nicht bei den Δ C49-Varianten (bei 60 μ M) festgestellt werden konnte. Untersuchungen bei höheren Proteinkonzentrationen waren bei dem Gesamtlängen-Protein nicht möglich, da es unter diesen Bedingungen amorph aggregierte.

4.5 Die Rolle von PABPN1 bei der Pathogenese von OPMD

Abschließend soll die Frage diskutiert werden, welche Rolle die Alaninexpansion in PABPN1 bei der Pathogenese von OPMD spielt. Festzuhalten ist, dass nur Menschen mit einer Erweiterung des Alaninsegmentes die Muskeldystrophie ausbilden. Die Ursache für OPMD ist damit die Alaninexpansion. Verschiedene Arbeitsgruppen postulierten jedoch, dass die Erweiterung nur einen primären Effekt darstellen könnte und dass eher sekundäre Effekte die Krankheit hervorrufen. Chartier *et al.* stellten die Hypothese auf, dass die Alaninexpansion nicht toxisch ist, jedoch das Protein stabilisieren und somit zu einer sukzessiven Anreicherung des Proteins führen könnte [115]. Eine alaninunabhängige Aggregation des Proteins könnte sich anschließen und toxisch auf die Zellen wirken. Ein stabilisierender Effekt im Sinne einer Erhöhung der thermodynamischen Stabilität ist jedoch unwahrscheinlich. So wurde beispielsweise für Fusionen des Hitzeschockproteins CspB aus *Bacillus subtilis* gezeigt, dass die Alaninexpansion keinen Einfluss auf die thermodynamische Stabilität des Proteins hat [177].

Bei Untersuchungen von stabilen C2-Zelllinien, die WT-PABPN1 exprimierten, wurde gezeigt, dass die N-terminale Region von PABPN1 für die Aktivierung muskelspezifischer Gene, durch Regulierung myogener Faktoren, verantwortlich ist. Kim *et al.* postulierten eine potenziell muskelspezifische Funktion von PABPN1 als Ko-Transkriptionsfaktor [178]. Eine Alaninexpansion könnte zu Veränderungen in der Aktivierung myogener Gene und so zu den charakteristischen OPMD-Symptomen führen.

2011 veröffentlichten Anvar *et al.* Daten einer umfangreichen Transkriptomanalyse von OPMD-Patienten und -Tiermodellen. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Deregulation des Ubiquitin-Proteasom-Systems in allen betrachteten Spezies (Mensch, Maus, *Drosophila*). Ferner wurde festgestellt, dass die Deregulation mit der Zeit zunahm und somit den progressiven Verlauf der Krankheit widerspiegeln könnte. Unterhalb eines bestimmten Transkriptionsniveaus von Komponenten des Ubiquitin-Proteasom-Systems kann expandiertes PABPN1 nicht mehr abgebaut werden und akkumuliert im Zellkern [179]. Wie jedoch mutiertes PABPN1 zur Deregulation der Gene führen könnte, wurde nicht diskutiert.

4.6 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die *in vitro*-Fibrillenbildung von Gesamtlängen-PABPN1 und Fragmenten des Proteins untersucht. **Die Ergebnisse deuten auf zwei Prozesse hin, die eine Assemblierung von PABPN1 hervorrufen können:**

- (1) eine alanininduzierte Aggregation der isolierten N-terminalen Region zu amyloiden Fibrillen [110,134]**
- (2) eine alaninunabhängige Zusammenlagerung des Gesamtlängen-Proteins zu fibrillären Strukturen unter Beteiligung der C-terminalen Region.**

Wie einleitend erwähnt, bzw. in der Diskussion angeführt wurde, bestärken viele Publikationen, dass PABPN1 nicht nur alaninabhängig, sondern auch -unabhängig aggregieren kann. **Es konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob:**

- (1) die *in vitro* erzeugten PABPN1-Fibrillen amyloider Natur sind. Mehrere Daten deuten jedoch indirekt auf einen nicht-amyloiden Charakter hin.**
- (2) eine alaninabhängige Fibrillenbildung im Kontext des Gesamtlängen-Proteins möglich ist.**

Um einen Fortschritt im Verständnis der PABPN1-Aggregation in der Pathogenese von OPMD zu machen sollte folgender Punkt geklärt werden: Die in Patientenmaterial bzw. Zellkultur erzeugten krankheitsassoziierten PABPN1-Aggregate sollten biophysikalisch charakterisiert werden. Die Analyse würde zeigen, ob die Ablagerungen vergleichbar mit den Aggregaten der isolierten N-terminalen Region oder denen des Gesamtlängen-Proteins sind. Die Ergebnisse würden Aufschluss darüber geben, welcher Prozess zur krankheitsbedingten Aggregation des Proteins beiträgt.

5 Anhang

5.1 Fibrillenbildung in Anwesenheit von Oligoadenylat-RNA

An der Bindung von RNA sind sowohl die RRM-Domäne als auch Aminosäuren der C-terminalen Region von PABPN1 beteiligt [107]. Es wurde angenommen, dass in Anwesenheit von Oligoadenylat-RNA eine Umfaltung dieser, an der Bindung beteiligten Bereiche, hätte unterbunden und somit die C-terminale Fibrillenbildung unterdrückt werden können. Somit hätte ein weiterer Beleg für die Beteiligung der C-terminalen Region an der Fibrillenbildung erhalten werden können. Wie aus der Literatur bereits bekannt war, ist die Bindung von RNA an PABPN1 stark von der Ionenstärke des Puffersystems abhängig [118]. Deshalb wurde zunächst die Bindung von Oligoadenylat-RNA durch PABPN1 in PF-Puffer untersucht (Daten nicht gezeigt). Eine Interaktion zwischen Oligoadenylat-RNA und PABPN1 konnte in PF-Puffer nicht beobachtet werden. Ein Einfluss von gebundener RNA auf die Fibrillenbildung von PABPN1 konnte deshalb unter den gesetzten Bedingungen (PF-Puffer) nicht analysiert werden.

5.2 Spezifität der RNA-Bindung durch fibrilläres Gesamtlängen-PABPN1

PABPN1 interagiert nicht ausschließlich mit Oligoadenylat-RNA, sondern kann auch mit anderen Basen wechselwirken [107]. Für die Konkurrenz wurden deshalb verschiedene RNAs genutzt. Die Bindung von radioaktivem Oligoadenylat, bestehend aus 14 Adenylatresten (A_{14}) wurde durch die Zugabe entsprechender Mengen an ribosomaler RNA (rRNA) und *transfer* RNA (tRNA) kompetiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 46 zusammengefasst.

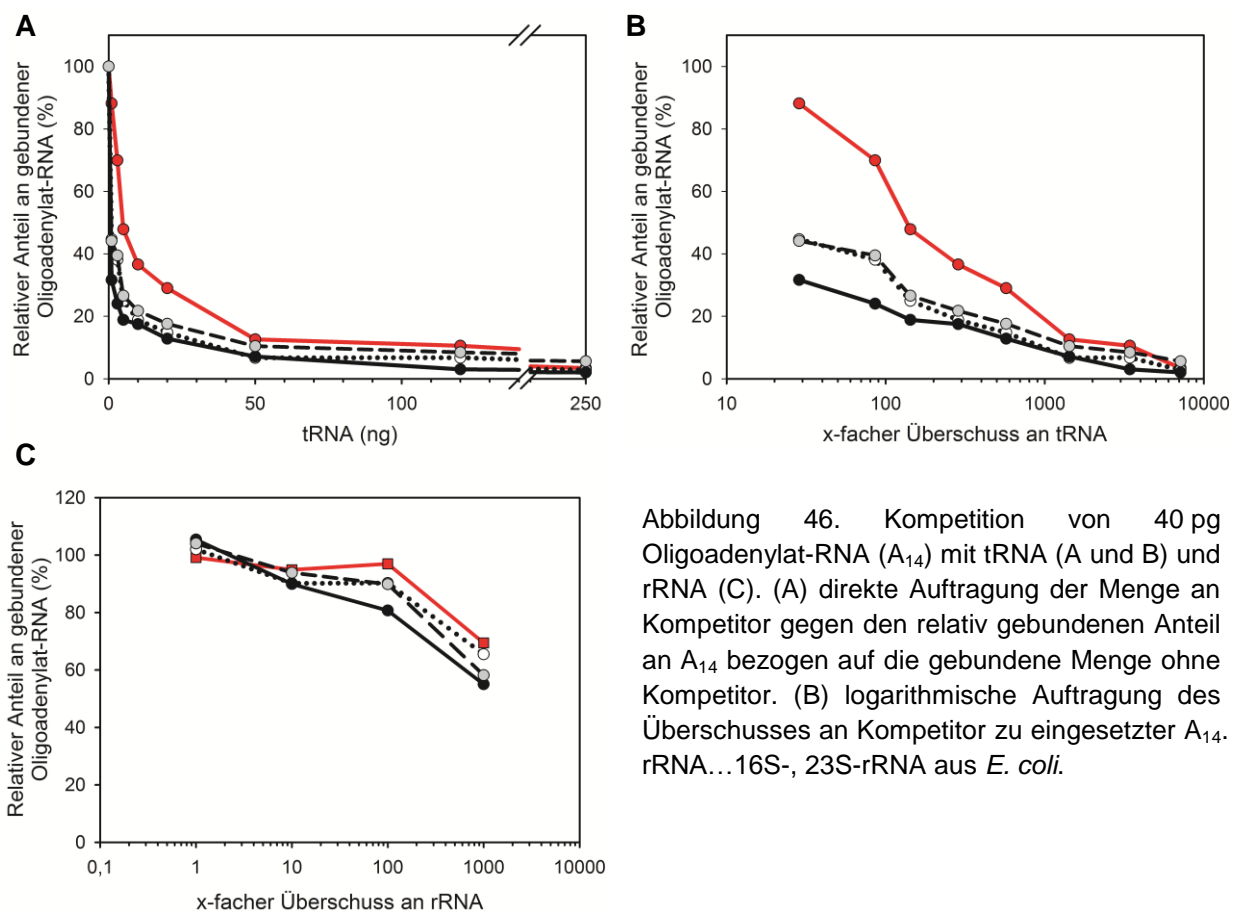


Abbildung 46. Konkurrenz von 40 pg Oligoadenylat-RNA (A_{14}) mit tRNA (A und B) und rRNA (C). (A) direkte Auftragung der Menge an Kompetitor gegen den relativ gebundenen Anteil an A_{14} bezogen auf die gebundene Menge ohne Kompetitor. (B) logarithmische Auftragung des Überschusses an Kompetitor zu eingesetzter A_{14} . rRNA...16S-, 23S-rRNA aus *E. coli*.

5.3 Ergänzung zu Kapitel 3.6.1

Die in Abschnitt 3.6.1 nicht gezeigten Fluoreszenz- und CD-Spektren werden aufgeführt.

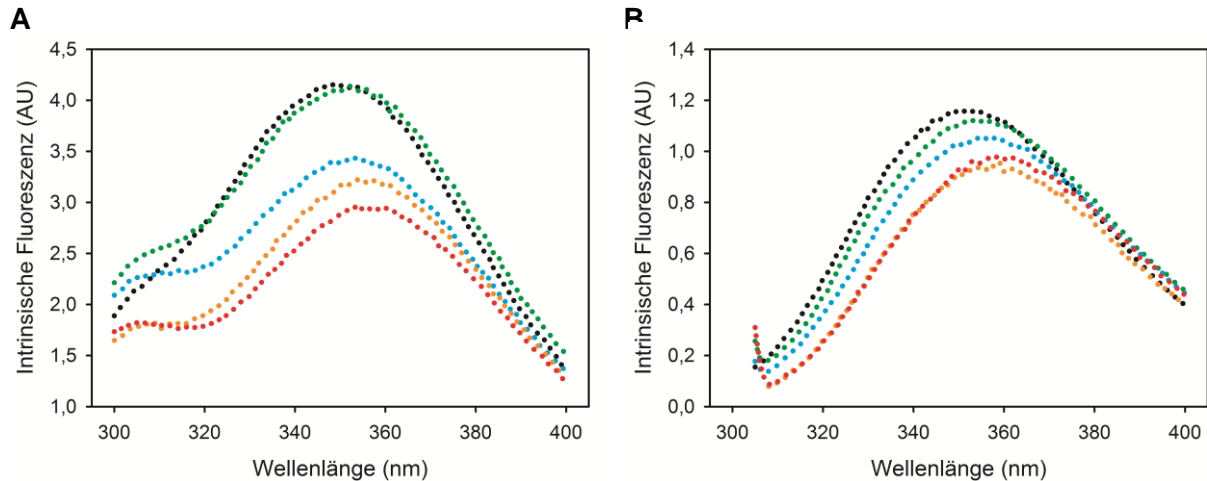


Abbildung 47. Fluoreszenzspektren von Δ Ala-PABPN1. Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 280 nm (A) und 295 nm (B). Die Messungen erfolgten bei 20 °C in PF-Puffer (schwarz), mit 1 M Harnstoff (grün), 1 M GdmCl (blau), 2,5 M GdmCl (orange), vollständig entfaltet (rot). Denaturierender Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,9, 6 M GdmCl.

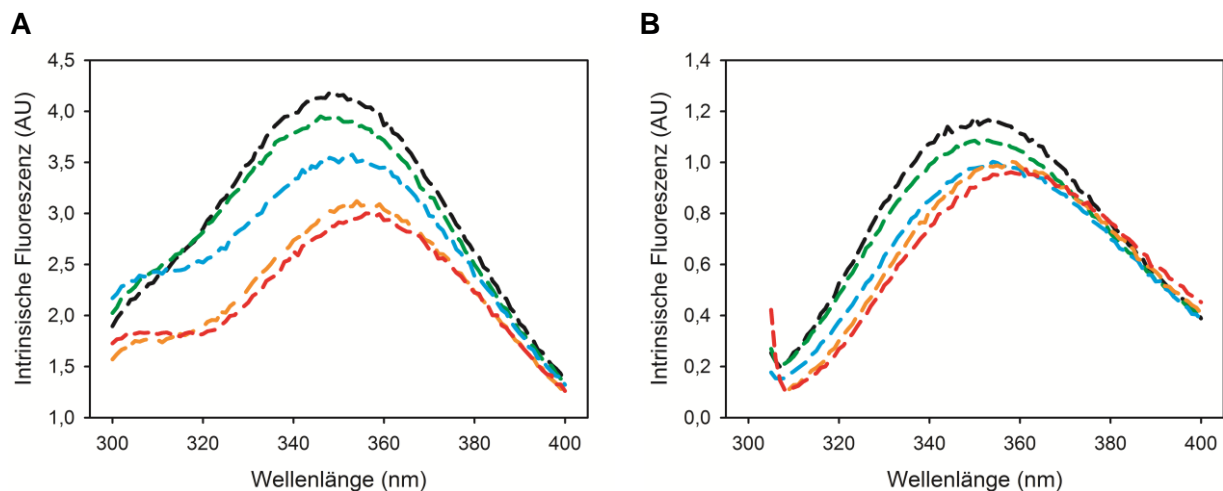


Abbildung 48. Fluoreszenzspektren von (+7)Ala-PABPN1. Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 280 nm (A) und 295 nm (B). Die Messungen erfolgten bei 20 °C in PF-Puffer (schwarz), mit 1 M Harnstoff (grün), 1 M GdmCl (blau), 2,5 M GdmCl (orange), vollständig entfaltet (rot). Denaturierender Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,9, 6 M GdmCl.

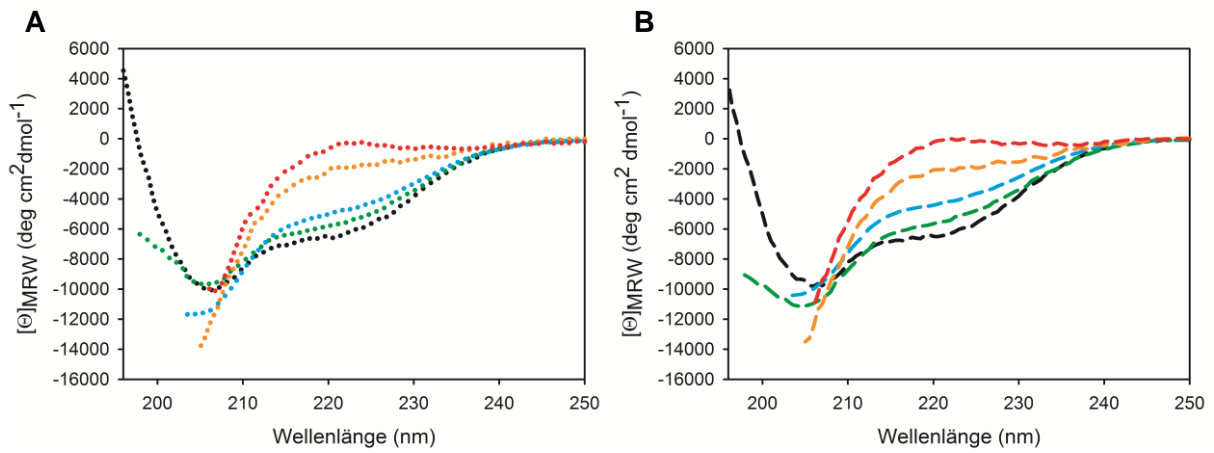


Abbildung 49. CD-Spektren zur Charakterisierung des löslichen Proteins unter leicht denaturierenden Bedingungen. (A) Δ Ala-PABPN1, (B) (+7)Ala-PABPN1. Die Messungen erfolgten bei 20 °C in PF-Puffer (schwarz), mit 1 M Harnstoff (grün), 1 M GdmCl (blau), 2,5 M GdmCl (orange), vollständig entfaltet (rot). Denaturierender Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,9, 6 M GdmCl.

5.4 Überprüfung der *Seed*-Präparationen

Die „Qualität“ der *seed*-Präparation wurde anhand Kontrollfibrillierungen mit N-(+7)Ala überprüft. Von N-(+7)Ala ist bekannt, dass eine rasche Fibrillenbildung in Anwesenheit von *seeds* erfolgt [110]. Ferner wurden die *seeds* elektronenmikroskopisch analysiert.

In Anwesenheit von *seeds* wurde für N-(+7)Ala eine schnelle Fibrillenbildung beobachtet. Dagegen befand sich N-(+7)Ala ohne *seeds* ca. 27 Tagen noch immer in der *lag*-Phase.

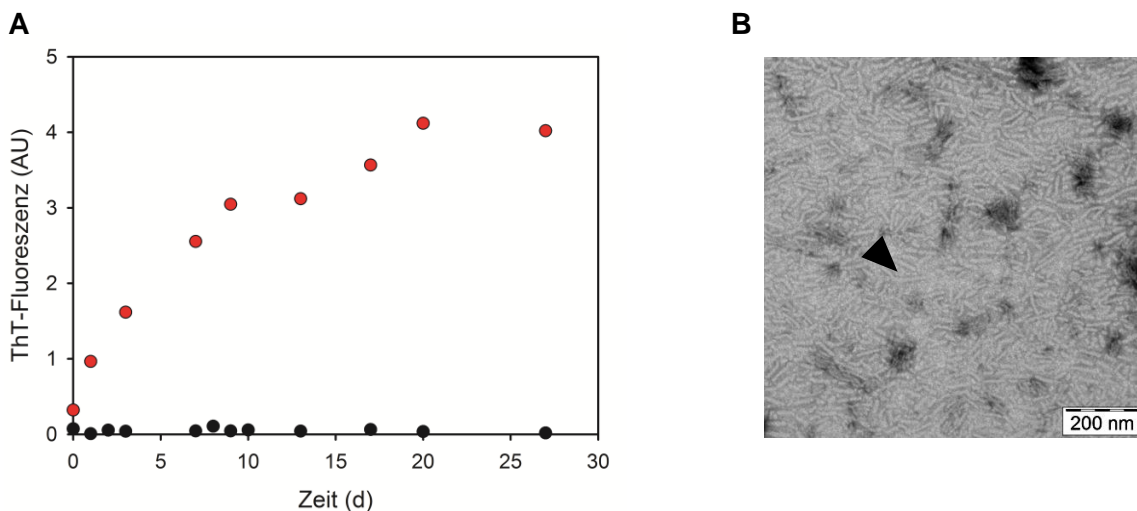


Abbildung 50. Überprüfung einer *seed*-Präparation. (A) Kontrollfibrillierung mit N-(+7)Ala in Anwesenheit von 1% (w/w) *seeds* (●) und ohne *seeds* (●). Die Fibrillenbildung fand bei 37 °C und einer Proteinkonzentration von 0,5 mM in PF-Puffer statt. (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme von *seeds*.

5.5 Reinigung und Charakterisierung der Δ C49-Varianten

Die Δ C49-Varianten wurden rekombinant als SUMO-Fusions-Konstrukt hergestellt (siehe 2.2.2.2) und gereinigt (siehe 2.2.4.3). Die Analyse der Proteine erfolgte in Abwesenheit der Affinitätsfusion.

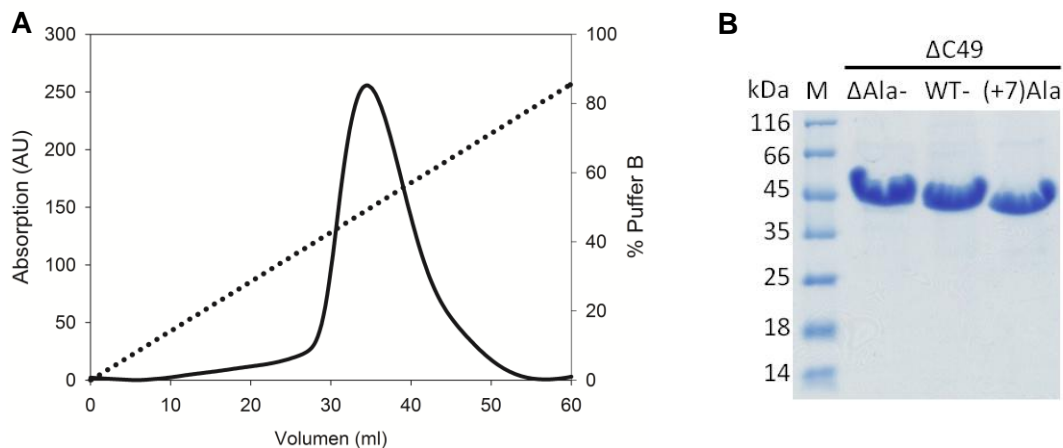


Abbildung 51. Zusammenfassung der Reinigung der Δ C49-Varianten. (A) Chromatogramm des letzten Reinigungsschrittes (Anionenaustausch-Chromatographie) von (+7)Ala- Δ C49. Absorption bei 280 nm (durchgezogene Linie), Anteil an Puffer B (gepunktete Linie). (B) SDS-PAGE-Gel der gereinigten Deletionsvarianten.

Die Deletionsvarianten eluierten als symmetrischer Peak während der Anionenaustausch-Chromatographie, was ein Hinweis auf eine homogene Proteinpraparation war. Durch SDS-PAGE-Analyse konnten nur geringe Kontaminationen mit Fremdprotein festgestellt werden. Anschließend wurden die C-terminalen Deletionsvarianten mittels CD-Spektroskopie charakterisiert (Abbildung 52). Analog zum Gesamtlängen-Protein wurde ein Spektrum gemessen, das auf einen dominierenden α -helikalen Strukturanteil hindeutete. Da die Analyse der Fibrillenbildung sowohl bei 20 $^{\circ}$ C als auch 37 $^{\circ}$ C erfolgte, wurden die Varianten auch bei diesen beiden Temperaturen strukturell charakterisiert. Der Vergleich der Fern-CD-Spektren zeigte einen geringfügigen Einfluss der Temperatur auf die Proteinsekundarstruktur. Kleine Amplitudenabnahmen konnten bei 195 nm und im Bereich 205–230 nm festgestellt werden. Diese Änderungen deuteten auf eine Abnahme von Sekundärstruktur durch die erhohnte Temperatur hin. Die Nah-UV-CD-Spektren der Δ C49-Varianten unterschieden sich, bedingt durch die Deletion der letzten 49 Aminosäuren (darunter ein Tryptophan- und sechs Tyrosinreste) von den Spektren der Gesamtlängen-Proteine.

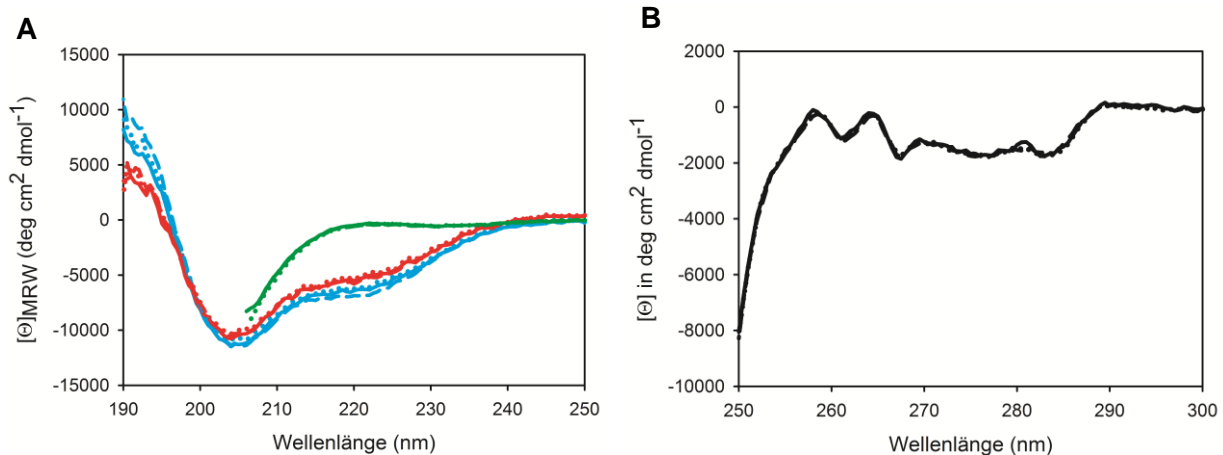


Abbildung 52. Charakterisierung der $\Delta C49$ -Varianten. (A) Fern-UV-CD-Spektrum in PF-Puffer bei 20 °C (blau) und 37 °C (rot), in denaturierendem Puffer (grün). (B) Nah-UV-CD-Spektren in PF-Puffer. WT- (durchgezogene Linie), ΔAla - (gepunktet) und (+7)Ala- $\Delta C49$ (gestrichelte Linie). Die Analyse erfolgte bei 20 °C. Denaturierender Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,9, 6 M GdmCl.

5.6 Reinigung und Charakterisierung von SUMO- $\Delta N114$

$\Delta N114$ wurde rekombinant als SUMO-Fusions-Konstrukt hergestellt (siehe 2.2.2.2) und gereinigt (siehe 2.2.4.3). Die Abspaltung der SUMO-Fusion resultierte in einer amorphen Aggregation von $\Delta N114$. Um trotzdem die Fibrillenbildung des Proteins bei Konzentrationen von 60 μM analysieren zu können, wurde auf die Abspaltung der löslichkeitsvermittelnden Fusion verzichtet. Alle Untersuchungen fanden deshalb in Anwesenheit des SUMO-Proteins statt (SUMO- $\Delta N114$). In Abbildung 53 sind der letzte Chromatographie-Schritt, ein SDS-PA-Gel des gereinigten Proteins und die Charakterisierung von Sekundärstrukturanteilen und der RNA-Bindungsaffinität dargestellt.

Die Analyse mittels SDS-PAGE zeigte keine Kontamination mit Fremdprotein. Das CD-Spektrum deutete auf ein gefaltetes Protein hin. Aussagen zur Struktur von $\Delta N114$ können an dieser Stelle nicht gemacht werden, da Daten zum Sekundärstrukturanteil (CD-Spektrum) des SUMO-Proteins nicht zur Verfügung standen. Ein Einfluss der SUMO-Fusion auf die Faltung der RRM-Domäne und der angrenzenden Aminosäuren konnte ausgeschlossen werden, da SUMO- $\Delta N114$ Oligo-(A)-RNA mit der gleichen Affinität ($K_D = 7 \text{ nM}$), wie WT-PABPN1 ($K_D = 6,6 \text{ nM}$) gebunden hatte.

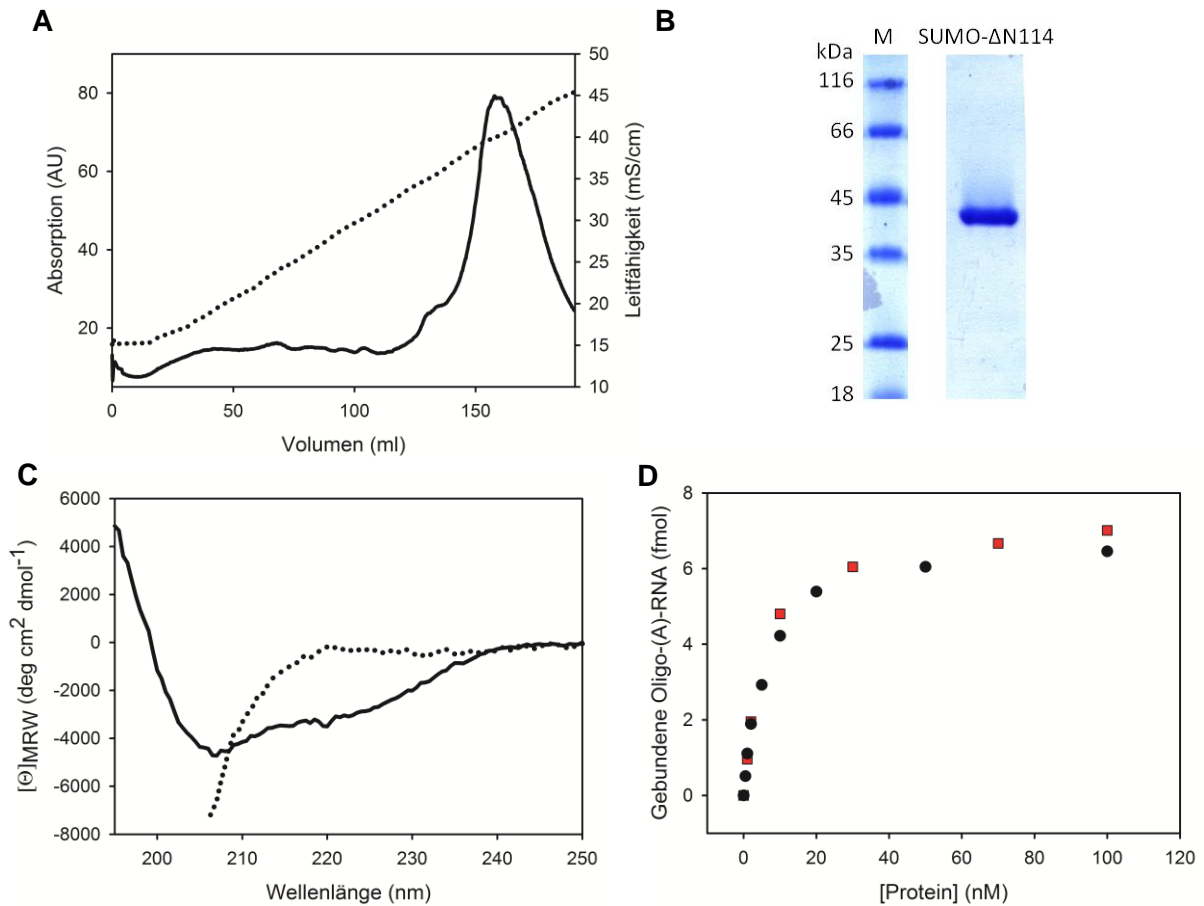


Abbildung 53. Reinigung und Charakterisierung von SUMO-ΔN114. (A) Chromatogramm der Kationenaustausch-Chromatographie; Absorption bei 280 nm (durchgezogene Linie), Leitfähigkeit (gepunktete Linie). (B) SDS-PA-Gel des gereinigten Proteins. (C) Fern-UV-CD-Spektrum in PF-Puffer (durchgezogene Linie), in denaturierendem Puffer (gepunktete Linie); bei 20 °C, denaturierender Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,9, 6 M GdmCl. (D) Filterbindungsassay; SUMO-ΔN114 (■) und WT-PABPN1 (●).

5.7 Reinigung und Charakterisierung der N147-Varianten

(+7)Ala-N147 und Δ Ala-N147 wurden ebenfalls rekombinant als SUMO-Fusionskonstrukt hergestellt (siehe 2.2.2.2) und anschließend gereinigt (siehe 2.2.4.3). Die Charakterisierung der löslichen Proteine und die Analyse der Fibrillenbildung fand nach Spaltung des Fusionsproteins statt.

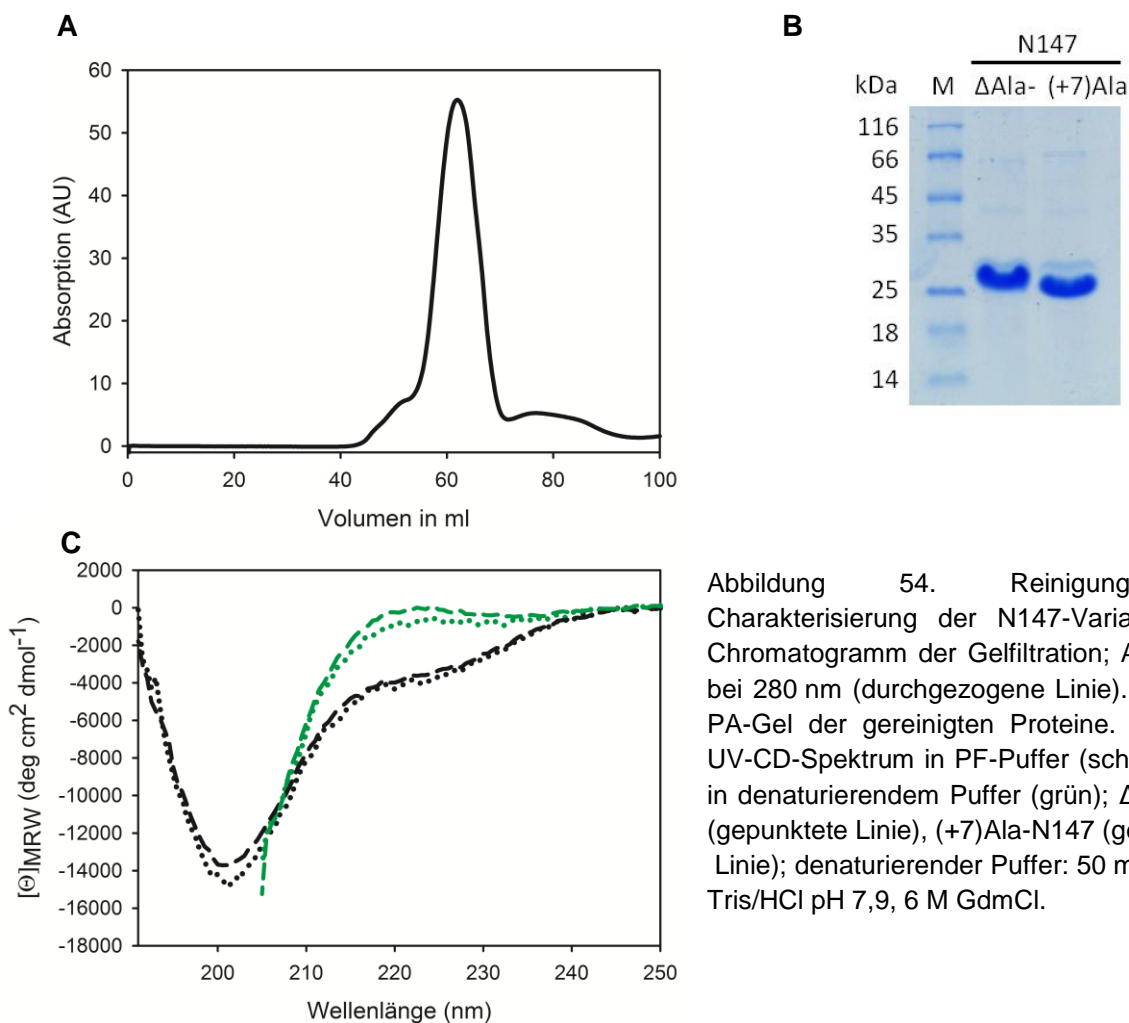


Abbildung 54. Reinigung und Charakterisierung der N147-Varianten. (A) Chromatogramm der Gelfiltration; Absorption bei 280 nm (durchgezogene Linie). (B) SDS-PA-Gel der gereinigten Proteine. (C) Fern-UV-CD-Spektrum in PF-Puffer (schwarz) und in denaturierendem Puffer (grün); Δ Ala-N147 (gepunktete Linie), (+7)Ala-N147 (gestrichelte Linie); denaturierender Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,9, 6 M GdmCl.

Das Chromatogramm der Gelfiltration zeigte einen symmetrischen Peak mit leichten Schultern. Lediglich die Fraktionen des Peaks wurden vereinigt und weiter charakterisiert. Das SDS-PA-Gel zeigte eine saubere Proteinpräparation, mit nur wenigen Verunreinigungen. Die Analyse der Sekundärstruktur mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie deutet auf ein überwiegend unstrukturiertes Protein hin mit nur geringen Anteilen an Sekundärstrukturelementen. Ein Einfluss der expandierten Alaninsequenz auf den Sekundärstrukturgehalt, ähnlich wie bei der N-terminalen Region (Aminosäuren 1–125), konnte nicht festgestellt werden [110].

6 Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption	MWCO	<i>Molecular weight cut off</i>
Å	Angström (1 Å = 0,1 nm)	NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
A β	Amyloid- β -Peptid	pdb	Proteindatenbank
ACN	Acetonitril	pI	Isoelektrischer Punkt
APS	Ammoniumperoxodisulfat	RT	Raumtemperatur
AU	<i>Arbitrary unit,</i> willkürliche Einheit	rpm	Umdrehungen pro Minute
bp	Basenpaare	SDS-PA-Gel	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamid-Gel
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser	SV	Säulenvolumen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyl- endiamin
GFP	grün-fluoreszierendes Protein	TFA	Trifluoressigsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazinyl)-ethansulfonsäure	Tris	Tris(hydroxyethyl)-minoethan
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	Vol.	Volumen
MALDI-TOF	<i>Matrix assisted laser desorption</i> <i>ionisation-time of flight</i>	WT	Wildtyp
		x g	x-fache der Erdbeschleunigung

7 Literaturverzeichnis

- [1] Kauzmann W (1959) Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Advances in protein chemistry* **14**, 1–63.
- [2] Levinthal C (1968) Are there pathways for protein folding? *Journal of Medical Physics* **65**, 44–45.
- [3] Anfinsen C, Haber E & White FH (1961) The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **47**, 1309–1314.
- [4] Anfinsen C (1973) Principles that Govern the Folding of Protein Chains. *Science* **181**, 223–230.
- [5] Fersht A (2008) From the first protein structures to our current knowledge of protein folding: delight and scepticisms. *Nature Reviews; Molecular Cell Biology* **9**, 650–654.
- [6] Ptitsyn O (1973) Stages in the mechanism of self-organization of protein molecules. *Doklady Akademii nauk SSSR* **210**, 1213–1215.
- [7] Kim P & Baldwin R (1982) Specific Intermediates in the Folding Reactions of small Proteins and the Mechanism of Protein Folding. *Annual review of biochemistry* **51**, 459–489.
- [8] Agashe V, Shastry M & Udgaonkar J (1995) Initial Hydrophobic Collapse in the Folding of Barstar. *Nature* **377**, 754–757.
- [9] Kuroda Y, Kidokoro S & Wada A (1992) Thermodynamic characterization of cytochrome c at low pH. Observation of the molten globule state and of the cold denaturation process. *Journal of molecular biology* **223**, 1139–1153.
- [10] Ohgushi M & Wada A (1983) “Molten-globule state”: a compact form of globular proteins with mobile side-chains. *FEBS letters* **164**, 21–24.
- [11] Ptitsyn O (1995) Molten globule and protein folding. *Advances in protein chemistry* **47**, 83–229.
- [12] Kuwajima K (1996) The molten state of alpha-lactalbumin. *The FASEB Journal* **10**, 102–109.
- [13] Vidugiris G, Markley J & Royer C (1995) Evidence for a Molten Globule-like Transition State in Protein Folding from Determination of Activation Volumes. *Biochemistry* **34**, 4909–4912.
- [14] Baldwin R (2005) *Protein Folding Handbook - Early Days of Studying the Mechanism of Protein Folding*.
- [15] Bryngelson JD & Wolynes PG (1987) Spin glasses and the statistical mechanics of protein folding. **84**, 7524–7528.
- [16] Dobson C (2000) The nature and significance of protein folding. *Mechanisms of Protein Folding; Oxford University Press* **2 nd Edition**.

- [17] Onuchic JN & Wolynes PG (2004) Theory of protein folding. *Current opinion in structural biology* **14**, 70–75.
- [18] Hardin C, Eastwood MP, Prentiss M & Wolynes PG (2002) Folding Funnels: The Key to Robust Protein Structure Prediction. *Journal of Computational Chemistry* **23**, 138–146.
- [19] Vabulas RM, Raychaudhuri S, Hayer-Hartl M & Hartl FU (2010) Protein folding in the cytoplasm and the heat shock response. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**, 1–18.
- [20] Chan H & Dill K (1998) Protein folding in the landscape perspective: chevron plots and non-Arrhenius kinetics. *Proteins* **30**, 2–33.
- [21] Baker D & Agard D (1994) Kinetics versus thermodynamics in protein folding. *Biochemistry* **33**, 7505–7509.
- [22] Hardesty B & Kramer G (2001) Folding of a nascent peptide on the ribosome. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* **66**, 41–66.
- [23] Dobson C (2003) Protein folding and misfolding. *Nature* **426**, 884–890.
- [24] Netzer W & Hartl F (1997) Recombination of protein domains facilitated by co-translational folding in eukaryotes. *Nature* **388**, 343–349.
- [25] Hammarström P, Wiseman R, Powers E & Kelly J (2003) Prevention of transthyretin amyloid disease by changing protein misfolding energetics. *Science (New York, N.Y.)* **299**, 713–716.
- [26] Honig B & Cohen F (1996) Adding backbone to protein folding: why proteins are polypeptides. *Folding & design* **1**, R17–R20.
- [27] Balbirnie M, Grothe R & Eisenberg D (2001) An amyloid-forming peptide from the yeast prion Sup35 reveals a dehydrated beta-sheet structure for amyloid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 2375–2380.
- [28] Sipe J & Baskakov I (2005) *Amyloid Proteins*.
- [29] Baskakov I, Legname G, Baldwin M, Prusiner S & Cohen F (2002) Pathway complexity of prion protein assembly into amyloid. *The Journal of biological chemistry* **277**, 21140–21148.
- [30] Chiti F, Bucciantini M, White P, Ramponi G & Dobson CM (2000) Mutational analysis of the propensity for amyloid formation by a globular protein. *EMBO Journal* **19**, 1441–1449.
- [31] Hartl FU, Bracher A & Hayer-Hartl M (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* **475**, 324–332.
- [32] Hartl FU & Hayer-Hartl M (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science (New York, N.Y.)* **295**, 1852–1858.
- [33] Bukau B & Horwich A (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**, 351–366.

- [34] Sitia R & Braakman I (2003) Quality control in the endoplasmatic reticulum protein factory. *Nature* **426**, 891–894.
- [35] Goldberg AL (2003) Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* **426**, 895–899.
- [36] Saiki S, Sato S & Hattori N (2012) Molecular pathogenesis of Parkinson's disease: update. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* **83**, 430–436.
- [37] Alzheimer's Disease International (2010) *World Alzheimer Report 2010 - The Global Economic Impact of Dementia - Executive Summary*.
- [38] Masters CL & Selkoe DJ (2012) Biochemistry of Amyloid β -Protein and Amyloid Deposits in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **2**, 1–24.
- [39] Ebrahimi-Fakhari D, Wahlsteiner L & McLean P (2012) Molecular Chaperones in Parkinson's Disease - Present and Future. *NIH-PA* **1**, 299–320.
- [40] Spillantini M, Schmidt M, Lee V, Trojanowski J, Jakes R & Goedert M (1997) Alpha Synuclein in Lewy bodies. *Nature* **388**, 839–840.
- [41] Fändrich M (2007) On the structural definition of amyloid fibrils and other polypeptide aggregates. *Cellular and molecular life sciences* **64**, 2066–2078.
- [42] Häggqvist B, Näslund J, Sletten K, Westermark G, Mucchiano G, Tjernberg L, Nordstedt C, Engström U & Westermark P (1999) Medin: an integral fragment of aortic smooth muscle cell-produced lactadherin forms the most common human amyloid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 8669–8674.
- [43] Pepys MB (2006) Amyloidosis. *Annual review of medicine* **57**, 223–241.
- [44] Dobson C (2005) *Protein Folding Handbook-An Overview of Protein Misfolding Diseases*.
- [45] Chiti F & Dobson CM (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annual review of biochemistry* **75**, 333–366.
- [46] Caughey B & Lansbury PT (2003) Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annual review of neuroscience* **26**, 267–298.
- [47] Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ & Selkoe DJ (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* **416**, 535–539.
- [48] Cookson MR & van der Brug M (2008) Cell systems and the toxic mechanism(s) of alpha-synuclein. *Experimental neurology* **209**, 5–11.
- [49] Dobson CM (2004) Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Seminars in cell & developmental biology* **15**, 3–16.
- [50] Friedreich N & Kekulé A (1859) *Zur Amyloidfrage*.
- [51] Cohen A & Calkins E (1959) Elektron Microscopic Observations on a Fibrous Component in Amyloid of Diverse Origins. *Nature* **183**, 1202–1203.

- [52] Geddes A, Parker K, Atkins E & Beighton E (1968) "Cross-beta" conformation in proteins. *Journal of molecular biology* **32**, 343–358.
- [53] Sunde M, Serpell L, Bartlam M, Fraser P, Pepys M & Blake C (1997) Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *Journal of molecular biology* **273**, 729–739.
- [54] Frare E, Mossuto MF, Polverino de Laureto P, Dumoulin M, Dobson CM & Fontana A (2006) Identification of the core structure of lysozyme amyloid fibrils by proteolysis. *Journal of molecular biology* **361**, 551–561.
- [55] Levine H (1993) Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: Detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Science* **2**, 404–410.
- [56] Missmahl H & Hartwig M (1953) Polarisationsoptische Untersuchungen an der Amyloids substanz. *Virchows Archiv* **508**, 489–508.
- [57] Jiménez JL, Nettleton EJ, Bouchard M, Robinson CV, Dobson CM & Saibil HR (2002) The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 9196–9201.
- [58] Lührs T, Ritter C, Adrian M, Riek-Loher D, Bohrmann B, Döbeli H, Schubert D & Riek R (2005) 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils. *PNAS* **102**, 17342–17347.
- [59] Vilar M, Chou H-T, Lührs T, Maji SK, Riek-Loher D, Verel R, Manning G, Stahlberg H & Riek R (2008) The fold of alpha-synuclein fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 8637–8642.
- [60] Sachse C, Xu C, Wieligmann K, Diekmann S, Grigorieff N & Fändrich M (2006) Quaternary structure of a mature amyloid fibril from Alzheimer's Aβ(1-40) peptide. *Journal of molecular biology* **362**, 347–354.
- [61] Makin O & Serpell L (2005) X-ray diffraction studies of amyloid structure. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **299**, 67–80.
- [62] Wasmer C, Lange A, Van Melckebeke H, Siemer AB, Riek R & Meier BH (2008) Amyloid fibrils of the HET-s(218-289) prion form a beta solenoid with a triangular hydrophobic core. *Science* **319**, 1523–1526.
- [63] Makin OS & Serpell LC (2005) Structures for amyloid fibrils. *The FEBS journal* **272**, 5950–5961.
- [64] Meinhardt J, Sachse C, Hortschansky P, Grigorieff N & Fändrich M (2009) Aβ(1-40) fibril polymorphism implies diverse interaction patterns in amyloid fibrils. *Journal of molecular biology* **386**, 869–877.
- [65] Bertini I, Gonnelli L, Luchinat C, Mao J & Nesi A (2011) A new structural model of Aβ40 fibrils. *Journal of the American Chemical Society* **133**, 16013–16022.
- [66] Sawaya MR, Sambashivan S, Nelson R, Ivanova MI, Sievers S a, Apostol MI, Thompson MJ, Balbirnie M, Wiltzius JJW, McFarlane HT, Madsen AØ, Riek C & Eisenberg D (2007) Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers. *Nature* **447**, 453–457.

- [67] Nelson R, Sawaya MR, Balbirnie M, Madsen AØ, Riek C, Grothe R & Eisenberg D (2005) Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature* **435**, 773–778.
- [68] Eisenberg D & Jucker M (2012) The Amyloid State of Proteins in Human Diseases. *Cell* **148**, 1188–1203.
- [69] Cooper AA, Gitler AD, Cashikar A, Haynes CM, Hill KJ, Bhullar B, Liu K, Xu K, Strathearn KE, Liu F, Cao S, Caldwell K a, Caldwell G a, Marsischky G, Kolodner RD, Labaer J, Rochet J-C, Bonini NM & Lindquist S (2006) Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science* **313**, 324–328.
- [70] Obulesu M, Venu R & Somashekhar R (2011) Tau mediated neurodegeneration: an insight into Alzheimer's disease pathology. *Neurochemical research* **36**, 1329–35.
- [71] Orr HT & Zoghbi HY (2007) Trinucleotide repeat disorders. *Annual review of neuroscience* **30**, 575–621.
- [72] Messaed C & Rouleau G (2009) Molecular mechanisms underlying polyalanine diseases. *Neurobiology of disease* **34**, 397–405.
- [73] Bevivino A & Loll P (2001) An expanded glutamine repeat destabilizes native ataxin-3 structure and mediates formation of parallel beta-fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 11955–11960.
- [74] Chen S, Berthelie V, Hamilton JB, O'Nuallain B & Wetzel R (2002) Amyloid-like features of polyglutamine aggregates and their assembly kinetics. *Biochemistry* **41**, 7391–7399.
- [75] Uversky VN (2010) Mysterious oligomerization of the amyloidogenic proteins. *The FEBS journal* **277**, 2940–2953.
- [76] Fiumara F, Fioriti L, Kandel ER & Hendrickson WA (2010) Essential role of coiled coils for aggregation and activity of Q/N-rich prions and PolyQ proteins. *Cell* **143**, 1121–1135.
- [77] Matera I, Bachetti T, Puppo F, Di Duca M, Casiraghi G, Cilio M, Hennekam R, Hofstra R, Schöber J, Ravazzolo R, Ottonella G & Ceccherini I (2004) PHOX2B mutations and polyalanine expansions correlate with the severity of the respiratory phenotype and associated symptoms in both congenital and late onset Central Hypoventilation syndrome. *Journal of Medical Genetics* **41**, 373–380.
- [78] Blondelle S, Forood B, Houghten R & Pérez-Payá E (1997) Polyalanine-based peptides as models for self-associated beta-pleated-sheet complexes. *Biochemistry* **36**, 8393–8400.
- [79] Lazaro L, Dubourg C, Pasquier L, Le Duff F, Blayau M, Durou M-R, De la Pintièrre AT, Aguilera C, David V & Odent S (2004) Phenotypic and molecular variability of the holoprosencephalic spectrum. *American journal of medical genetics* **129A**, 21–24.

- [80] Beysen D, Raes J, Leroy B, Lucassen A, Yates J, Clayton-Smith J, Ilyina H, Sklower Brooks S, Christin-Maitre S, Fellous M, Fryns J, Kim J, Lapunzina P, Lemyre E, Meire F, Messiaen L, Oley C, Splitt M, Thomson J, Van de Peer Y, Veitia R a, De Paepe A & De Baere E (2005) Deletions involving long-range conserved nongenic sequences upstream and downstream of FOXL2 as a novel disease-causing mechanism in blepharophimosis syndrome. *American journal of human genetics* **77**, 205–218.
- [81] Goodman F, Mundlos S, Muragaki Y, Donnai D, Giovannucci-Uzielli M, Lapi E, Majewski F, McGaughrans J, McKeown C, Reardon W, Upton J, Winter R, Olsen B & Scambler P (1997) Synpolydactyly phenotypes correlate with size of expansions in HOXD13 polyalanine tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 7458–7463.
- [82] Taylor E (1915) Progressive Vagus-Glossopharyngeal Paralysis With Ptosis. A Contribution to the Group of Family, Diseases. *Journal of Nervous & Mental Disease* **42**, 129–139.
- [83] Brais B, Xie Y, Sanson M, Morgan K, Weissenbach J, Korczyn A, Biunen S, Fardeau M, Tome F, Bouchard J, Rouleau G, Victor M, Hayes R & Adams R (1995) The oculopharyngeal muscular dystrophy locus maps to the region of the cardiac alpha and beta myosin heavy chain genes on chromosome 14q11.2-q13. **4**, 429–434.
- [84] Brais B, Bouchard J, Xie Y, Rochefort D, Chrétien N, Tomé F, Korczyn A, Heutink P, Mathieu J, Duranceau A, Codère F, Fardeau M & Rouleau G (1998) Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nature genetics* **18**, 164–167.
- [85] Warren S (1997) Polyalanine Expansion in Synpolydactyly Might Result from Unequal Crossing-Over of HOXD13. *Science* **275**, 408–409.
- [86] Robinson DO, Hammans SR, Read SP & Sillibourne J (2005) Oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD): analysis of the PABPN1 gene expansion sequence in 86 patients reveals 13 different expansion types and further evidence for unequal recombination as the mutational mechanism. *Human genetics* **116**, 267–271.
- [87] Duranceau A, Beauchamp G, Jamieson G & Barbeau A (1983) Oropharyngeal dysphagia and oculopharyngeal muscular dystrophy. *The Surgical clinics of North America* **63**, 825–832.
- [88] Brais B, Rouleau G, Bouchard J, Fardeau M & Tomé F (1999) Oculopharyngeal Muscular Dystrophy. *Seminars in Neurology* **19**, 59–66.
- [89] Hill M, Creed G, McMullan T, Tyers A, Hilton-Jones D, Robinson D & Hammans S (2001) Oculopharyngeal muscular dystrophy: phenotypic and genotypic studies in a UK population. *Brain* **124**, 522–526.
- [90] Tomé FM & Fardeau M (1980) Nuclear inclusions in oculopharyngeal dystrophy. *Acta neuropathologica* **49**, 85–87.

- [91] Calado A, Tomé F, Brais B, Rouleau G, Kühn U, Wahle E & Carmo-Fonseca M (2000) Nuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy consist of poly(A) binding protein 2 aggregates which sequester poly(A) RNA. *Human molecular genetics* **9**, 2321–2328.
- [92] Brais B (2003) Oculopharyngeal muscular dystrophy: a late-onset polyalanine disease. *Cytogenetic and genome research* **100**, 252–260.
- [93] Bao YP, Cook LJ, O'Donovan D, Uyama E & Rubinsztein DC (2002) Mammalian, yeast, bacterial, and chemical chaperones reduce aggregate formation and death in a cell model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *The Journal of biological chemistry* **277**, 12263–12269.
- [94] Abu-Baker A, Messaed C, Laganieri J, Gaspar C, Brais B & Rouleau GA (2003) Involvement of the ubiquitin-proteasome pathway and molecular chaperones in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Human molecular genetics* **12**, 2609–2623.
- [95] Tavanez OP, Calado P & Carmo-Fonseca M (2005) In vivo aggregation properties of the nuclear poly(A)-binding protein PABPN1. *RNA* **11**, 752–762.
- [96] Wahle E (1991) A Novel Poly(A)-Binding Protein Acts As a Specificity Factor in the Second Phase of Messenger RNA Polyadenylation. *Cell* **66**, 759–768.
- [97] Bienroth S, Wahle E, Suter-Crazzolaro C & Keller W (1991) Purification of the cleavage and polyadenylation factor involved in the 3'-processing of messenger RNA precursors. *The Journal of biological chemistry* **266**, 19768–19776.
- [98] Wahle E & Keller W (1992) The Biochemistry of 3'-end cleavage and polyadenylation of messenger RNA precursors. *Annual review of biochemistry* **61**, 419–440.
- [99] Wahle E, Lustig A, Jenö P & Maurer P (1993) Mammalian Poly(A)-binding Protein II. *The Journal of biological chemistry* **268**, 2937–2945.
- [100] Colgan DF & Manley JL (1997) Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes & Development* **11**, 2755–2766.
- [101] Barabino SM & Keller W (1999) Last but not least: regulated poly(A) tail formation. *Cell* **99**, 9–11.
- [102] Chen Z, Li Y & Krug R (1999) Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *The EMBO journal* **18**, 2273–2283.
- [103] Calado A, Kutay U, Kühn U & Wahle E (2000) Deciphering the cellular pathway for transport of poly (A)-binding protein II . Deciphering the cellular pathway for transport of poly (A)-binding protein II. *Spring*, 245–256.
- [104] Lemay J, Lemieux C, St-André O & Bachand F (2010) Crossing the borders - Poly(A)-binding proteins working on both sides of the fence. *RNA Biology* **7**, 291–295.
- [105] Krause S, Fakan S, Weis K & Wahle E (1994) Immunodetection of Poly(A) Binding Protein II in the Cell Nucleus. *Experimental Cell Research* **214**, 75–82.

- [106] Bengoechea R, Tapia O, Casafont I, Berciano J, Lafarga M & Berciano MT (2012) Nuclear speckles are involved in nuclear aggregation of PABPN1 and in the pathophysiology of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neurobiology of disease* **46**, 118–129.
- [107] Kühn U, Nemeth A, Meyer S & Wahle E (2003) The RNA binding domains of the nuclear poly(A)-binding protein. *The Journal of biological chemistry* **278**, 16916–16925.
- [108] Ge H, Zhou D, Tong S, Gao Y, Teng M & Niu L (2008) Crystal structure and possible dimerization of the single RRM of human PABPN1. *Proteins* **71**, 1539–1545.
- [109] Fronz K, Güttinger S, Burkert K, Kühn U, Stöhr N, Schierhorn A & Wahle E (2011) Arginine methylation of the nuclear poly(a) binding protein weakens the interaction with its nuclear import receptor, transportin. *The Journal of biological chemistry* **286**, 32986–32994.
- [110] Scheuermann T, Schulz B, Blume A, Wahle E, Rudolph R & Schwarz E (2003) Trinucleotide expansions leading to an extended poly-L-alanine segment in the poly (A) binding protein PABPN1 cause fibril formation. *Amino Acids*, 2685–2692.
- [111] Kerwitz Y, Kühn U, Lilie H, Knoth A, Scheuermann T, Friedrich H, Schwarz E & Wahle E (2003) Stimulation of poly(A) polymerase through a direct interaction with the nuclear poly(A) binding protein allosterically regulated by RNA. *The EMBO journal* **22**, 3705–3714.
- [112] Fan X, Dion P, Laganier J, Brais B & Rouleau G (2001) Oligomerization of polyalanine expanded PABPN1 facilitates nuclear protein aggregation that is associated with cell death. *Human molecular genetics* **10**, 2341–2351.
- [113] Klein AF, Ebihara M, Alexander C, Dicaire M-J, Sasseville AM-J, Langelier Y, Rouleau GA & Brais B (2008) PABPN1 polyalanine tract deletion and long expansions modify its aggregation pattern and expression. *Experimental cell research* **314**, 1652–1666.
- [114] Fan X & Rouleau G (2003) Progress in understanding the pathogenesis of oculopharyngeal muscular dystrophy. *The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques* **30**, 8–14.
- [115] Chartier A, Benoit B & Simonelig M (2006) A Drosophila model of oculopharyngeal muscular dystrophy reveals intrinsic toxicity of PABPN1. *The EMBO journal* **25**, 2253–2262.
- [116] Catoire H, Pasco M, Abu-Baker A, Holbert S, Tourette C, Brais B, Rouleau G, Parker J & Néri C (2008) Sirtuin inhibition protects from the polyalanine muscular dystrophy protein PABPN1. *Human molecular genetics* **17**, 2108–2117.
- [117] Kühn U & Wahle E (2004) Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochimica et biophysica acta* **1678**, 67–84.
- [118] Keller RW, Kühn U, Aragón M, Bornikova L, Wahle E & Bear DG (2000) The nuclear poly(A) binding protein, PABP2, forms an oligomeric particle covering the length of the poly(A) tail. *Journal of molecular biology* **297**, 569–583.

- [119] Brinkmann U, Mattes RE & Buckel P (1989) High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the *dnaY* gene product. *Gene* **85**, 109–114.
- [120] Birnboim H & Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**, 1513–1523.
- [121] Shapiro D (1981) Quantitative Ethanol Precipitation of Nanogram Quantities of DNA and RNA. *Analytical Biochemistry* **110**, 229–231.
- [122] Saiki R, Scharf S, Faloona F, Mullis K, Horn G, Erlich H & Arnheim N (1985) Enzymatic Amplification of beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* **230**, 1350–1354.
- [123] Nishiyama K, Okamoto T, Watanabe I & Takanami M (1961) Fractionation of leucine-bound soluble ribonucleic acid by chromatography on DEAE-cellulose. *Biochimica et biophysica acta* **47**, 193–194.
- [124] Rowen L & Kornberg A (1978) Primase, the *dnaG* Protein of *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* **253**, 758–764.
- [125] Laemmli U (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- [126] Schägger 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. *Analytical biochemistry* **166**, 368–379.
- [127] Fairbanks G, Steck TL & Wallach DF (1971) Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10**, 2606–2617.
- [128] Gill S & Hippel P (1989) Calculation of Protein Extinction Coefficients from Amino Acid Sequence Data. *Analytical Biochemistry* **182**, 319–326.
- [129] Sachs A & Kornberg R (1985) Nuclear polyadenylate-binding protein. *Molecular and cellular biology* **5**, 1993–1996.
- [130] Harrick N (1960) Surface chemistry from spectral analysis of totally internally reflected radiation. *J Phys Chem* **64**, 1110–1114.
- [131] Fahrenfort J (1961) Attenuated total reflection. *Spectrochimica Acta* **17**, 698–709.
- [132] Mossesso E & Lima CD (2000) Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast. *Molecular Cell* **5**, 865–876.
- [133] Lodderstedt G, Hess S, Hause G, Scheuermann T, Scheibel T & Schwarz E (2007) Effect of oculopharyngeal muscular dystrophy-associated extension of seven alanines on the fibrillation properties of the N-terminal domain of PABPN1. *The FEBS journal* **274**, 346–355.
- [134] Scheuermann T (2003) *Untersuchungen zum Einfluss von Polyalaninsequenzen auf die Bildung amyloider Fibrillen von PABPN1.*
- [135] Lodderstedt G (2008) *In vitro-Analysen zur Polyalanin-induzierten Fibrillenbildung der N-terminalen Domäne des nukleären Poly(A)-bindenden Proteins PABPN1.*

- [136] Nemeth A, Krause S, Blank D, Jenny A, Jenö P, Lustig A & Wahle E (1995) Isolation of genomic and cDNA clones encoding bovine poly(A) binding protein II. *Nucleic acids research* **23**, 4034–4041.
- [137] Lodderstedt G, Sachs R, Faust J, Bordusa F, Kühn U, Golbik R, Kerth A, Wahle E, Balbach J & Schwarz E (2008) Hofmeister salts and Potenzial therapeutic compounds accelerate in vitro fibril formation of the N-terminal domain of PABPN1 containing a disease-causing alanine extension. *Biochemistry* **47**, 2181–2189.
- [138] Lineweaver H & Burk D (1934) The Determination of ENzyme Dissociation Constants. *Journal of the American Chemical Society* **56**, 658–666.
- [139] Chiti F & Dobson CM (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annual review of biochemistry* **75**, 333–66.
- [140] Naiki H, Hashimoto N, Suzuki S, Kimura H, Nakakuki K & Gejyo F (1997) Establishment of a kinetic model of dialysis-related amyloid fibril extension in vitro. *Amyloid* **4**, 223–232.
- [141] Harper JD & Lansbury PT (1997) Models of Amyloid Seeding in Alzheimer's Disease and Scrapie: Mechanistic Truths and Physiological Consequences of the Time-Dependent Solubility of Amyloid Proteins. *Annual review of biochemistry* **66**, 385–407.
- [142] Bitan G, Lomakin A & Teplow DB (2001) Amyloid beta-protein oligomerization: prenucleation interactions revealed by photo-induced cross-linking of unmodified proteins. *The Journal of biological chemistry* **276**, 35176–35184.
- [143] Bitan G, Kirkitadze MD, Lomakin A, Vollers SS, Benedek GB & Teplow DB (2003) Amyloid beta-protein (Abeta) assembly: Abeta40 and Abeta42 oligomerize through distinct pathways. *PNAS* **100**, 330–335.
- [144] Modler A, Gast K, Lutsch G & Damaschun G (2003) Assembly of Amyloid Protofibrils via Critical Oligomers—A Novel Pathway of Amyloid Formation. *Journal of Molecular Biology* **325**, 135–148.
- [145] Kong J & Yu S (2007) Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **39**, 549–559.
- [146] Scheibel T, Parthasarathy R, Sawicki G, Lin X-M, Jaeger H & Lindquist SL (2003) Conducting nanowires built by controlled self-assembly of amyloid fibers and selective metal deposition. *PNAS* **100**, 4527–4532.
- [147] Bocharova OV, Breydo L, Parfenov AS, Salnikov VV & Baskakov IV (2005) In vitro conversion of full-length mammalian prion protein produces amyloid form with physical properties of PrP(Sc). *Journal of molecular biology* **346**, 645–659.
- [148] Scherzinger E, Sittler A, Schweiger K, Heiser V, Lurz R, Hasenbank R, Bates G, Lehrbach H & Wanker E (1999) Self-assembly of polyglutamine-containing huntingtin fragments into amyloid-like fibrils: Implications for Huntington's disease pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 4604–4609.

- [149] Brown P, Liberski P, Wolff A & Gajdusek D (1990) Resistance of scrapie infectivity to steam autoclaving after formaldehyde fixation and limited survival after ashing at 360 degrees C: practical and theoretical implications. *The Journal of infectious diseases* **161**, 467–472.
- [150] Sackewitz M, Scheidt H a, Lodderstedt G, Schierhorn A, Schwarz E & Huster D (2008) Structural and dynamical characterization of fibrils from a disease-associated alanine expansion domain using proteolysis and solid-state NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **130**, 7172–7173.
- [151] Harper JD & Lansbury PT (1997) Models of Amyloid Seeding in Alzheimer's Disease and Scrapie: Mechanistic Truths and Physiological Consequences of the Time-Dependent Solubility of Amyloid Proteins. *Annual review of biochemistry* **66**, 385–407.
- [152] Kim Y-S, Randolph TW, Stevens FJ & Carpenter JF (2002) Kinetics and energetics of assembly, nucleation, and growth of aggregates and fibrils for an amyloidogenic protein. *The Journal of biological chemistry* **277**, 27240–27246.
- [153] LeVine H (1999) Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. *Methods in enzymology* **309**, 274–84.
- [154] Naiki H, Higuchi K, Hosokawa M & Takeda T (1989) Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Analytical biochemistry* **177**, 244–249.
- [155] Puchtler H & Sweat F (1966) A Review of Early Concepts of Amyloid in Context With Contemporary Chemical Literature From 1839 To 1859. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **14**, 123–134.
- [156] Krebs M, Bromley E & Donald A (2005) The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. *Journal of structural biology* **149**, 30–37.
- [157] Nilsson MR (2004) Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods* **34**, 151–160.
- [158] Yagi H, Sato A, Yoshida A, Hattori Y, Hara M, Shimamura J, Sakane I, Hongo K, Mizobata T & Kawata Y (2008) Fibril formation of hsp10 homologue proteins and determination of fibril core regions: differences in fibril core regions dependent on subtle differences in amino acid sequence. *Journal of molecular biology* **377**, 1593–1606.
- [159] Monti M, Amoresano a, Giorgetti S, Bellotti V & Pucci P (2005) Limited proteolysis in the investigation of beta2-microglobulin amyloidogenic and fibrillar states. *Biochimica et biophysica acta* **1753**, 44–50.
- [160] Serpell LC, Fraser PE & Sunde M (1999) X-ray fiber diffraction of amyloid fibrils. *Methods in enzymology* **309**, 526–536.
- [161] Bousset L, Bonnefoy J, Sourigues Y, Wien F & Melki R (2010) Structure and assembly properties of the N-terminal domain of the prion Ure2p in isolation and in its natural context. *PloSone* **5**, 1–8.

- [162] Goldschmidt L, Teng PK, Riek R & Eisenberg D (2010) Identifying the amyloids, proteins capable of forming amyloid-like fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 3487–3492.
- [163] Thompson MJ, Sievers SA, Karanicolas J, Ivanova MI, Baker D & Eisenberg D (2006) The 3D profile method for identifying fibril-forming segments of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 4074–4078.
- [164] Holmes K, Popp D, Gebhard W & Kabsch W (1990) Atomic model of the actin filament. *Nature* **347**, 44–49.
- [165] Kabsch W & Vandekerckhove J (1992) Structure and function of actin. *Annual review of biophysics and biomolecular structures* **21**, 49–76.
- [166] Trus B & Piez K (1980) Compressed microfibril models of the native collagen fibril. *Nature* **286**, 300–301.
- [167] Veis A, Anesey J & Mussell S (1967) A limiting microfibril model for the three-dimensional arrangement within collagen fibres. *Nature* **215**, 931–934.
- [168] Steinert P, Idler W & Zimmerman S (1976) Self-assembly of bovine epidermal keratin filaments in vitro. *Journal of molecular biology* **108**, 547–567.
- [169] Steinert P, Zimmerman S, Starger J & Goldman R (1978) Ten-nanometer filaments of hamster. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**, 6098–6101.
- [170] Janowski R, Kozak M, Jankowska E, Grzonka Z, Grubb A, Abrahamson M & Jaskolski M (2001) Human cystatin C, an amyloidogenic protein, dimerizes through three-dimensional domain swapping. *Nature structural biology* **8**, 316–320.
- [171] Staniforth R, Giannini S, Higgins L, Conroy M, Hounslow A, Jerala R, Craven C & Waltho J (2001) Three-dimensional domain swapping in the folded and molten-globule states of cystatins, an amyloid-forming structural superfamily. *The EMBO journal* **20**, 4774–4781.
- [172] Nilsson M, Wang X, Rodziejewicz-Motowidlo S, Janowski R, Lindström V, Onnerfjord P, Westermark G, Grzonka Z, Jaskolski M & Grubb A (2004) Prevention of domain swapping inhibits dimerization and amyloid fibril formation of cystatin C: use of engineered disulfide bridges, antibodies, and carboxymethylpapain to stabilize the monomeric form of cystatin C. *The Journal of biological chemistry* **279**, 24236–24245.
- [173] Sambashivan S, Liu Y, Sawaya MR, Gingery M & Eisenberg D (2005) Amyloid-like fibrils of ribonuclease A with three-dimensional domain-swapped and native-like structure. *Nature* **437**, 266–269.
- [174] Teng PK, Anderson NJ, Goldschmidt L, Sawaya MR, Sambashivan S & Eisenberg D (2012) Ribonuclease A suggests how proteins self-chaperone against amyloid fiber formation. *Protein Science* **21**, 26–37.
- [175] Knaus KJ, Morillas M, Swietnicki W, Malone M, Surewicz WK & Yee VC (2001) Crystal structure of the human prion protein reveals a mechanism for oligomerization. *Nature structural biology* **8**, 770–774.

- [176] Liu C, Sawaya MR & Eisenberg D (2011) Beta2-Microglobulin Forms Three-Dimensional Domain-Swapped Amyloid Fibrils With Disulfide Linkages. *Nature structural & molecular biology* **18**, 49–55.
- [177] Sackewitz M, von Einem S, Hause G, Wunderlich M, Schmid F & Schwarz E (2008) A folded and functional protein domain in an amyloid-like fibril. *Protein Science* **17**, 1044–1054.
- [178] Kim Y, Noguchi S, Hayashi Y, Tsukahara T, Shimizu T & Arahata K (2001) The product of an oculopharyngeal muscular dystrophy gene, poly(A)-binding protein 2, interacts with SKIP and stimulates muscle-specific gene expression. *Human molecular genetics* **10**, 1129–1139.
- [179] Anvar SY, 't Hoen PA, Venema A, van der Sluijs B, van Engelen B, Snoeck M, Vissing J, Trollet C, Dickson G, Chartier A, Simonelig M, van Ommen G-JB, van der Maarel SM & Raz V (2011) Deregulation of the ubiquitin-proteasome system is the predominant molecular pathology in OPMD animal models and patients. *Skeletal muscle* **1**, 1-14.

Erklärung an Eides statt

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Ferner erkläre ich, dass ich mich mit dieser Arbeit weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg noch an einer anderen Hochschule um die Erlangung eines akademischen Grades beworben habe.

Reno Winter

Lebenslauf

Zur Person

Name:	Winter	Vorname:	Reno
Geburtsdatum:	21. November 1983	Geburtsort:	Zittau
Familienstand:	ledig	Nationalität:	deutsch
Geschlecht:	männlich		

Bildungsweg

seit 10/2008	Promotion an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg am Institut für Biochemie/ Biotechnologie in der Arbeitsgruppe von Prof. E. Schwarz
7/2008	Studienabschluss als Diplom-Biochemiker
10/2003 - 7/2008	Studium der Biochemie an der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg
6/2002	Abitur
9/1995 - 6/2002	Schulbildung am Christian-Weise-Gymnasium Zittau

Publikationen, Präsentationen, Vorträge

Winter R, Kuehn U, Hause G, Schwarz E „Polyalanine-independent Conformational Conversion of Nuclear Poly(A)-binding Protein 1 (PABPN1).“ J Biol Chem. 2012 Jun 29;287(27):22662-71.

Buttstedt A, **Winter R**, Sackewitz M, Hause G, Schmid FX, Schwarz E. „Influence of the stability of a fused protein and its distance to the amyloidogenic segment on fibril formation.“ PLoS One. 2010 Nov 23;5(11):e15436.

Vortrag zu den 22. Faltertage in Regensburg: „Conformational Conversion of the Nuclear Poly(A) Binding Protein 1 (PABPN1)“; Oktober 2010

Posterpräsentation auf der FASEB Sommer Konferenz „Amyloid Fibril Formation and Protein Misfolding: Molecular Mechanisms and Cellular Effects“ in Snowmass (US), Juli 2009