

In vitro-Analysen zur Polyalanin-induzierten Fibrillenbildung der N-terminalen Domäne des nukleären Poly(A)-bindenden Proteins PABPN1

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

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

> von Grit Lodderstedt geb. 22.08.1979 in Halle/Saale

urn:nbn:de:gbv:3-000013252 [http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013252]

Gutachter: Dr. Elisabeth Schwarz Prof. Dr. Thomas Scheibel Prof. Dr. F.-Ulrich Hartl

Verteidigt am 26.02.2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einlei	tung	1
	1.1 Fib	rilläre Strukturen bei degenerativen Krankheiten	2
	1.1.1	Morbus Alzheimer	2
	1.1.2	Morbus Parkinson	2
	1.2 Trin	nukleotidexpansionen als Ursache für amyloide Fibrillen	3
	1.2.1	Chorea Huntington	3
	1.2.2	OPMD (Okulopharyngeale Muskeldystrophie)	4
	1.3 Das	nukleäre Poly(A)-bindende Protein 1 (PABPN1)	5
	1.4 Am	yloide fibrilläre Strukturen	7
	1.4.1	Makromolekulare Strukturen von Fibrillen	7
	1.4.2	Atomare Struktur von Fibrillen	8
	1.4.3	Nachweis von Fibrillen	9
	1.4.4	Stabilität von Fibrillen	10
	1.4.5	Beeinflussung der Fibrillenbildung durch unterschiedliche Parameter	11
	1.4.6	Kinetik der Fibrillenbildung	12
	1.4.7	Einfluss von <i>seeds</i> auf die Fibrillierung	
	1.4.8	Modifizierung der Fibrillierungskinetik durch Proteine und niedermolekt	ulare
	Substa	nzen	15
	1.4.	8.1 Einfluss von Proteinen	15
	1.4.	8.2 Einfluss anorganischer Salze	
	1.4.	8.3 Einfluss organischer Substanzen	17
	1.5 Ziel	der Arbeit	17
2	Mater	ialien	
	2.1 Che	mikalien	19
	2.1.1	Chromatographiematerialien	
	2.1.2	Standards	21
	2.1.3	Proteine, Antikörper	21
	2.1.4	<i>E. coli</i> -Stamm	21
	2.1.5	Plasmide	

	2.1.6	Lösungen, Puffer und Medien	22
	2.1.7	sonstige Materialien	23
	2.2 Ger	äte	23
3	Metho	oden	25
	3.1 Kul	tivierung von Mikroorganismen	25
	3.1.1	Bioreaktorkultivierung	25
	3.2 Pro	teinreinigung	26
	3.2.1	Reinigung der Varianten der N-PABPN1	26
	3.2.2	Herstellung und Reinigung des (A) ₁₇ KYK-NH ₂ -Peptides	27
	3.2.3	Lyophilisation von Proteinlösungen	28
	3.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	28
	3.3 Pro	tein-Konzentrierung	28
	3.3.1	NaDOC-Fällung von Proteinen	28
	3.3.2	Konzentrierung mittels PEG	29
	3.3.3	Konzentrierung mit einer Amicon Ultrafiltration Cell	29
	3.4 Kor	nzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	29
	3.5 Circ	culardichroismus	30
	3.6 Ma	ssenspektrometrische Analysen	31
	3.7 N-te	erminale Sequenzanalyse	31
	3.8 Fib	rillierungsansätze	32
	3.9 Det	ektion amyloider Fibrillen	32
	3.9.1	Fluoreszenzmessung	32
	3.9.2	Elektronenmikroskopie	33
	3.9.3	Rasterkraftmikroskopie (atomic force microscopy - AFM)	33
	3.10 E	estimmung der löslichen Fraktion des Fibrillenansatzes mittels RP-HPLC	33
	3.11 P	räparation der <i>seeds</i>	34
	3.11.1	Bestimmung der seed-Konzentration	34
	3.12 C	hemische Stabilität der Fibrillen	35
	3.13 K	Lurvenanpassung der ANS-Fluoreszenz-Messwerte	36
	3.13.1	Fibrillierung in Gegenwart von seeds	36
	3.13.2	Fibrillierung ohne zugegebene <i>seeds</i>	37
	3.14 B	iotinylierung von Proteinen und Fibrillen	38
	3.15 V	Vesternblot	38

4	Ergeł	nisse	39
	4.1 Ein	fluss von seeds auf die Fibrillenbildung von N-PABPN1	39
	4.1.1	Einfluss von homologem <i>seeding</i>	40
	4.1.2	Einfluss der seed-Konzentration	41
	4.1.3	Einfluss von heterologem seeding	44
	4.1.4	Einfluss der Konzentration des löslichen Proteins	46
	4.2 Ein	fluss der Länge der Polyalaninsequenz auf die Fibrillenstruktur	47
	4.2.1	Beeinflusst die seed-Struktur die Fibrillenstruktur?	50
	4.3 Sta	bilität der Fibrillen	50
	4.3.1	Solubilisierung der Fibrillen mit Guanidiniumthiocyanat bei RT	50
	4.3.2	Solubilisierung der Fibrillen mit Guanidiniumthiocyanat bei 50°C	52
	4.3.3	Analyse der RP-HPLC-Chromatogramme	54
	4.3.4	Fibrillenstabilität über die Zeit und bei saurem pH	55
	4.3.5	Einfluss der GdmSCN-resistenten Fibrillenfragmente auf die Fibrillierung	58
	4.4 Un	tersuchung eines möglichen Gleichgewichts zwischen Fibrille und löslicher	
	Spezies		59
	4.5 Suc	he nach möglichen Intermediaten der Fibrillierung	60
	4.6 Mo	difizierung der Fibrillierungsreaktion von N-(+7)Ala	63
	4.6.1	Einfluss von Proteinen und Peptiden auf die Fibrillenbildung	63
	4.6	1.1 Effekt von der N-ΔAla-Variante	63
	4.6	1.2 Effekt von RCMLA (reduziertes, carboxymethyliertes α -Lactalbumin)	66
	4.6	1.3 Effekt von Lysozym	68
	4.6	1.4 Einfluss des Polyalaninpeptids A ₁₇ KYK-NH ₂	71
	4.6.2	Einfluss von Salzen auf die Fibrillenbildung	74
	4.6	2.1 Einfluss von Anionen	74
	4.6	2.2 Einfluss von Kationen	77
	4.6	2.3 Einfluss von Arginin	78
	4.6.3	Einfluss von niedermolekularen Substanzen auf die Fibrillenbildung	80
	4.6	3.1 Effekt von Trehalose	80
	4.6	3.2 Effekt von Doxycyclin	81
5	Disku	ssion	83
	5.1 Ein	fluss von <i>seeds</i> auf die Fibrillierung von N-PABPN1	84
	5.2 Ein	fluss der Länge der Polyalaninsequenz auf die Fibrillenstruktur	86

	5.3 Stabilität der Fibrillen	
	5.4 Untersuchung eines möglichen Gleichgewichts zwischen Fibrille und löslich	er
	Spezies	90
	5.5 Suche nach möglichen Intermediaten der Fibrillierung	91
	5.6 Modifizierung der Fibrillierungsreaktion von N-(+7)Ala	91
	5.6.1 Einfluss von Proteinen und Peptiden auf die Fibrillenbildung	91
	5.6.2 Einfluss von Salzen auf die Fibrillenbildung	94
	5.6.3 Einfluss von niedermolekularen Substanzen auf die Fibrillenbildung	97
6	Zusammenfassung	
7	Literaturverzeichnis	
An	ıhang	115

Abkürzungen

AFM	atomic force microscopy
ANS	8-Anilino-1-naphthalensulfonsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Biotin-7-NHS	D-biotinoyl-ɛ-aminocaprionsäure-hydroxy-succimidester
Boc	tert-Butyloxcarbonyl
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Circulardichroismus
CV	Säulenvolumen
d	Tag
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Elektronenmikroskop
ESI	Elektronenspray-Ionisation
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
GdnHC1	Guanidinhydrochlorid
GdmSCN	Guanidiniumthiocvanat
h	Stunde
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1vl)-1 1 3 3 tetramethylammonium
	hexafluorophosphat
His-tag	Histidin-tag
HOBt	Hydroxybenzotriazol
IPTG	Isopronyl-B-D-thiogalactonyranosid
1	Liter
lσ	dekatischer Logarithmus
LMW	low molecular weight
MALDI	matrix assisted laser desorption ionisation
min	Minute
(m)M	(milli)molar
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MW	Molekulargewicht
MWCO	molecular weight cut off
NMR	nuclear magnetic resonance
NaDOC	Natriumdesoxcholat
N-PABPN1	N-terminalen Domäne von PABPN1
N-AAla	N-terminalen Domäne von PABPN1-AAla
	N-terminalen Domäne von Wildtyn-PABPN1
$N_{-}(+7) \wedge l_{2}$	N-terminalen Domäne von PARPN1_(+7)Ala
NM	Nanometer
NTA	Nitrilotri Essigsäure
	Lightshorntion hai 600 nm
	akulonharungaala Muskaldustronhia
	wukloëres Doly(A) hindendes Drotein 1
	nukicales Poly(A)-bindendes Protein 1 Dalvaarvlamidaalalatteanharaaa
raue	rotyactytamidgetetektrophofese

PBS	phosphate buffered saline (Phosphat gepufferte Saline)
PEG	Polyethylenglykol
POD	Peroxidase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RCMLA	reduziertes carboxymethyliertes α -Lactalbumin
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
RP-HPLC	reversed phase-high performance liquid chromatography
rpm	Umdrehungen pro Minute
ŔŢ	Raumtemperatur
RRM	RNA recognition motif
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Triflouressigsäure
TFE	Trifluorethanol
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
w/v	Gewicht pro Volumen

Begriffserklärungen

Für die Beschreibung und Diskussion der Bildung fibrillärer Aggregate wurden folgende Begriffe verwendet:

Fibrillierung/ Fibrillenbildung	Übergang von Proteinmolekülen vom löslichen Zustand in den unlöslichen, fibrillierten Zustand
Fibrillenwachstum	Verlängerung von Fibrillen oder seeds durch die
/Fibrillenverlängerung	Anlagerung von weiteren Proteinmolekülen
Wachstumsrate	Fibrillenwachstum pro Zeiteinheit
Fibrillenmasse	Menge an gebildeten Fibrillen, welche proportional zur
	maximalen Fluoreszenzintensität ist
lag phase	Inkubationszeit für die Bildung des Nukleationskeimes
Nukleationskeim	erste stabile Oligomer bei der Fibrillenbildung
Fibrillenkeim (engl. seeds)	durch Ultraschall fragmentierte Fibrillen
homologes seeding	Die zur Fibrillierung eingesetzten seeds stammten von
	derselben Variante (N-WT oder N-(+7)Ala) wie die
	lösliche Spezies.
heterologes seeding	Die zur Fibrillierung eingesetzten seeds stammten nicht
/cross-seeding	von derselben Variante wie die lösliche Spezies.

1 Einleitung

Die Funktion eines Proteins wird durch seine dreidimensionale Struktur bestimmt, welche in der Aminosäuresequenz kodiert ist. Aminosäuren sind mit bedingt vorhersagbaren Frequenzen in bestimmten Sekundärstrukturen zu finden. Neben der Peptidsequenz entscheiden aber auch die umliegenden Aminosäuren über die Ausbildung von α-Helices oder β-Faltblättern. Durch Disulfidbrücken und nichtkovalente Wechselwirkungen zwischen den Sekundärstrukturelementen bildet sich eine komplexe Tertiärstruktur aus. Diese kompakte Struktur gewährleistet die spezifische Funktion des jeweiligen Proteins. Proteine besitzen ein breites Aufgabenspektrum, wie zum Beispiel enzymatische Katalyse, mechanische Stützfunktionen sowie Kontrolle von Signalübertragungsprozessen. Sie spielen Schlüsselrollen in nahezu allen biologischen Prozessen. Die Wirkung vieler Proteine beruht auf einer limitierten Flexibilität der nativen Struktur. Aufgrund dieser Flexibilität können Proteine eine begrenzte Stabilität besitzen. Schon geringe Temperatur- oder pH-Schwankungen können zu einer Konformationsänderung führen. Ein Protein kann auch durch die Oxidation oder Reduktion von SH-Gruppen denaturiert werden. Durch den Verlust der nativen Struktur verlieren die Proteine ihre Funktion. Nicht korrekt gefaltete Proteine werden dann in der Zelle abgebaut.

Seit mehreren Jahren ist bekannt, dass unter bestimmten Bedingungen einige Proteine amyloide Fibrillen bilden können. Eine Fibrille ist ein hochgeordnetes, unverzweigtes Polymer aus Proteinmolekülen, dessen Grundstruktur aus ß-Strängen besteht. Die Ursachen für eine solche Fibrillenbildung sind weitgehend ungeklärt. Durch diese Strukturänderung und Oligomerisierung zur Fibrille verlieren die Proteine ihre Funktion. Trotzdem werden diese Proteinfibrillen wahrscheinlich nicht abgebaut. Bei verschiedenen degenerativen Krankheiten wurden amyloide fibrilläre Ablagerungen außerhalb sowie innerhalb von Zellen oder Zellkernen beobachtet.

1

Es wird zurzeit diskutiert, ob diese fibrillären Strukturen die eigentliche Ursache für diese Krankheiten sind oder ob sie lediglich eine Folgeerscheinung der Erkrankung darstellen (Watson *et al.*, 2005; Bodner *et al.*, 2006, Finder & Glockshuber, 2007).

1.1 Fibrilläre Strukturen bei degenerativen Krankheiten

Es sind mehrere Krankheiten bekannt, welche mit amyloiden Ablagerungen oder fibrillären Strukturen in Verbindung gebracht werden. Am bekanntesten sind *Morbus Alzheimer* und *Morbus Parkinson*, auf welche nachfolgend kurz eingegangen wird.

1.1.1 Morbus Alzheimer

Die Alzheimer'sche Krankheit (*Morbus Alzheimer*) ist eine fortschreitende Demenz-Erkrankung des Gehirns, die vorwiegend im Alter auftritt. Die Krankheit beginnt mit geringer, anscheinend zufälliger Vergesslichkeit und endet mit einer vollständigen Demenz. Es kommt zur Degeneration von Neuronen und dadurch zu Störungen der normalen cerebralen Funktionen, was zu Einschränkungen in der Sprache, des Denkvermögens und des Gedächtnisses führt. Als Ablagerungen im Gehirn von Alzheimer-Patienten zeigen sich extrazellulär senile *Plaques* und fibrilläre Ablagerungen. Diese senilen *Plaques* bestehen im Wesentlichen aus dem Amyloid-β-Peptid (Aβ-Peptid), einem Fragment des *Amyloid Precursor Proteins* (APP). Dieses Vorläuferprotein, ein Typ I-Transmembranprotein, ist in der Zellmembran lokalisiert. Intrazellulär wurden ebenfalls Fibrillen beobachtet, die aus dem Tau-Protein bestehen. Das Tau-Protein fibrilliert aufgrund einer Hyperphosphorylierung (*reviews*: Grossman *et al.*, 2006; Finder & Glockshuber, 2007).

1.1.2 Morbus Parkinson

Die Parkinson-Krankheit ist ebenfalls eine langsam fortschreitende neurodegenerative Die Erkrankung. vier Hauptsymptome sind Muskelstarre, Muskelzittern und Bewegungsarmut, welche bis hin zu Bewegungslosigkeit führen kann, sowie Haltungsinstabilität. Die Erkrankung beginnt meist zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr. Es gibt heute noch keine Möglichkeit einer ursächlichen Behandlung des Parkinson-Syndroms,

die in einem Aufhalten der fortschreitenden Degeneration der Nerven bestünde. Neuere Forschungen legen den Schluss nahe, dass eine Überproduktion des Proteins α -Synuclein bei der Zerstörung von dopaminproduzierenden Zellen beteiligt ist. Das überschüssige α -Synuclein verhindert den Abbau von α -Synuclein-Molekülen und verklumpt zu sogenannten Lewy-Körperchen (engl. *Lewy-bodies*). Die Überproduktion von α -Synuclein wird durch einen Gendefekt verursacht, bei dem die DNA-Sequenz zur Produktion von α -Synuclein doppelt oder dreifach vorkommt (*review*: Liu, 2006).

1.2 Trinukleotidexpansionen als Ursache für amyloide Fibrillen

Die Proteine, die unter physiologischen Bedingungen im Organismus Fibrillen ausbilden, haben in ihrer nativen Form sehr unterschiedliche Strukturen. Es wurden auch keine Homologien innerhalb der Aminosäuresequenz festgestellt. Es gibt aber auch Proteine, die aufgrund einer expandierten Polyaminosäuresequenz beispielsweise von Glutaminen bzw. Alaninen Fibrillen bilden. Das bekannteste Beispiel dafür ist das Protein Huntingtin, welches aufgrund einer Polyglutaminexpansion *Chorea Huntington* verursacht.

1.2.1 Chorea Huntington

Chorea Huntington (älterer Name: Veitstanz) ist eine autosomal dominant vererbte, neurodegenerative Erkrankung. Die ersten Krankheitssymptome wie Bewegungsstörungen und psychische Symptome treten meist zwischen dem 30. und 60. Lebensjahr auf. Es ist eine der häufigsten erblich bedingten Hirnstörungen. Durch eine Mutation auf dem Chromosom 4 wird die Polyglutaminsequenz des Proteins Huntingtin, welche aus 9 bis 35 Glutaminen besteht, auf 36 bis 250 Glutamine verlängert. Dies wird vor allem durch ein *slippage* der DNA-Polymerase bei der Replikation verursacht. Je länger die Polyglutaminsequenz ist, desto früher tritt Chorea H. auf. Die juvenile Krankheit manifestiert sich bei über 60 Glutaminen. Es kommt zu amyloiden Ablagerungen von mutiertem Huntingtin. Neueste Untersuchungen zeigen, dass der Abbau der Aggregate des mutierten Proteins durch das Proteasom beeinträchtig ist (Díaz-Hernández *et al.*, 2006). Andererseits ist auch eine Toxizität des freien, mutierten Huntingtins denkbar, so dass die Huntingtinaggregate protektive Funktionen ausüben (Bodner *et al.*, 2006). Obwohl Huntingtin in allen kernhaltigen Zellen gebildet wird,

ist derzeit nur unbefriedigend erklärbar, warum die Toxizität nur in bestimmten Gehirnarealen nachweisbar ist. Eine Therapie, welche die Krankheit an sich heilt oder dauerhaft aufhält, ist nicht bekannt (*reviews*: Everett & Wood, 2004; Borrell-Pagès *et al.*, 2006).

Neben Glutaminexpansionen werden auch Polyalaninsequenzen mit einigen Krankheiten in Verbindung gebracht (Holmes *et al.*, 2001; Utsch *et al.*, 2002). Polyalaninsequenzen sind in der Natur weit verbreitet. Allerdings wurden im Gegensatz zu Polyglutaminsequenzen beim Menschen nur maximal 20 Alaninreste hintereinander gefunden (Amiel *et al.*, 2004). Auffallend ist der hohe Anteil an RNA- und DNA-bindenden Proteinen. Mehr als 50 % der humanen Proteine mit einer Polyalaninsequenzen dieser Proteine bei der Repression der Transkription beteiligt sind (Han & Manley, 1993; Galant & Carrol, 2002). Zurzeit sind neun Krankheiten bekannt, bei denen eine Polyalaninexpansion auftritt. Bei acht dieser neun Krankheiten sind Gene für Transkriptionsfaktoren betroffen. Die Symptome, wie Missbildungen oder geistige Behinderung, werden bereits im embryonalen Stadium verursacht. Die Ausnahme bildet die Krankheit Okulopharyngeale Muskeldystrophie (OPMD). Die Mutation liegt hier nicht auf einem Gen für einen Transkriptionsfaktor (Amiel *et al.*, 2004).

1.2.2 OPMD (Okulopharyngeale Muskeldystrophie)

Die progressive Krankheit OPMD wurde erstmals 1915 beschrieben (Tayler, 1915). OPMD tritt meistens ab dem 50. Lebensjahr auf und wird autosomal dominant vererbt. Die Krankheit wird hauptsächlich bei Kanadiern französischer Abstammung beobachtet und kann bis zu einer emigrierten Französin um 1634 zurückverfolgt werden (Creel *et al.*, 1998). Die ersten Symptome sind hängende Augenlider und Schluckbeschwerden, welche im Verlauf der Krankheit zu ernsthaften Ernährungsproblemen führen (Scacheri *et al.*, 1999). Im späteren Verlauf von OPMD wird eine Schwächung der Gesichtsmuskulatur und der Muskulatur der proximalen Extremitäten beobachtet (Tomé & Fardeau, 1994; Brais *et al.*, 1995).

Die Ursache für OPMD liegt in einer Trinukleotidexpansion im Gen für das nukleäre poly(A)bindende Protein (PABPN1), welches auf dem Chromosom 14q11.2-q13 lokalisiert ist (Brais *et al.*, 1995). In der Literatur wird diskutiert, dass diese Mutation durch ungleiches *crossingover* oder Ungenauigkeiten in der DNA-Replikation entsteht (Wells, 1996; Warren, 1997; Nakamoto *et al.*, 2002). Eine Vervielfältigung von kurzen (GCG)-Trinukleotiden wurde beobachtet, welche zu einer verlängerten Polyalaninsequenz führt (Brais *et al.*, 1998). Bei der dominanten Form ist die natürliche Alaninsequenz von 10 auf 12 bis maximal 17 Alaninen verlängert (Brais *et al.*, 1998). Eine Expansion um <u>ein</u> Alanin auf 11 Alanine verursacht bei 2 % der französisch-kanadischen Bevölkerung die autosomal rezessive Form (Fried *et al.*, 1975; Hill *et al.*, 2001). Bis jetzt konnte noch kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Länge der Alaninexpansion und der Schwere des Krankheitsverlaufes beobachtet werden (Hill *et al.*, 2001).

Als pathologisches Merkmal von OPMD wurden intranukleäre filamentöse Einschlüsse (INIs *engl. intranuclear inclusions*) in Muskelzellen beobachtet. Die Filamente besitzen einen Durchmesser von 8,5 nm und eine Länge von bis zu 0,25 µm (Tomé & Fardeau, 1980). Die amyloiden Ablagerungen enthalten hauptsächlich das poly(A)-bindende Protein (PABPN1), außerdem Ubiquitin, Komponenten des Proteasoms, poly(A)-RNA (Calado *et al.*, 2000; Brais, 2003) und die Hitzeschock-Proteine HSP40 und HSP70 (Bao *et al.*, 2002; Abu-Baker *et al.*, 2003). Durch Zellkulturstudien konnte allerdings gezeigt werden, dass bereits der Wildtyp (WT) von PABPN1 zur Aggregation neigt (Tavanez *et al.*, 2005). Die WT-Aggregate sind nicht so regelmäßig angeordnet und dadurch nicht so stabil, ebenso fehlen Ubiquitin und die Komponenten des Proteasoms im Vergleich zu den beobachteten Filamenten bei OPMD-Patienten (Tavanez *et al.*, 2005). Aufgrund solcher Daten wird auch diskutiert, dass das Ubiquitin-Proteasom-System eine Rolle bei der Okulopharyngealen Muskeldystrophy spielt (Tavanez *et al.*, 2005). Der genaue Mechanismus, welcher zum Ausbruch von OPMD führt, ist bisher aber nicht aufgeklärt.

1.3 Das nukleäre Poly(A)-bindende Protein 1 (PABPN1)

PABPN1 spielt eine wichtige Rolle bei der mRNA-Prozessierung. Das Protein wurde erstmals Anfang der neunziger Jahre des letzten Jahrhunderts beschrieben (Wahle, 1991). PABPN1 stimuliert die Synthese des poly(A)-Schwanzes von prä-mRNA durch Erhöhung der Prozessivität der Poly(A)-Polymerase (Wahle 1991; Bienroth *et al.*, 1993; Kühn & Wahle, 2004; Abu-Baker & Rouleau, 2006). Diese posttranskriptionale Modifizierung am 3'-Ende reguliert den Transport der mRNA vom Zellkern in das Zytosol, ist verantwortlich für den Beginn der Translation und reguliert den Abbau der mRNA (*reviews*: Nakielny & Dreyfuss, 1999; Wahle & Rügsegger, 1999; Mitchell & Tollervey, 2000; Sachs & Varani, 2000).

Das *PABPN1*-Gen wird zwar ubiquitär im Gewebe transkribiert, allerdings konnte eine erhöhte Expression in der Skelletmuskulatur beobachtet werden (Brais *et al.*, 1998). Das Protein befindet sich hauptsächlich im Zellkern (Krause *et al.*, 1994).

PABPN1 besteht aus 306 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 32,8 kDa. Direkt nach dem Startmethionin befindet sich eine Polyalanin-Sequenz von zehn Alaninen. Die N-terminale Domäne (N-PABPN1) mit 125 Aminosäuren und einen Molekulargewicht von ca. 12,15 kDa enthält einen hohen Anteil an Glutamat-Resten. Die Strukturanalyse mittels Circulardichroismus (CD) zeigte einen geringen Anteil an Sekundärstrukturelementen für N-PABPN1. Eine schematische Darstellung von PABPN1, wie sie durch Strukturvorhersage-Programme ermittelt wurde, ist in Abbildung 1.1 gezeigt. Bei thermisch und chemisch induzierter Entfaltung von N-PABPN1 konnte kein kooperativer Übergang gemessen werden. Deswegen wird angenommen, dass N-PAPBN1 wahrscheinlich keine tertiären Kontakte ausbildet und zu den sogenannten *natively unfolded proteins* gehört (Scheuermann *et al.*, 2003; Lodderstedt *et al.*, eingereicht bei *Biochemistry*).

Im mittleren Bereich der Aminosäuresequenz befindet sich die RNA-bindende Domäne oder auch RNA *recognition motif* (RRM) genannt. Innerhalb dieses Motivs befinden sich zwei hochkonservierte Aminosäuresequenzen, ein Oktapeptid (RNP-I) und ein Hexapeptid (RNP-II) (Nagai 1996). Anhand der Kristallstruktur der homologen RNA-Bindungsdomäne von U1A ist bekannt, dass die Sekundärstruktur des RRM's aus einem viersträngigen antiparallelen β -Faltblatt besteht, an welchem seitlich zwei α -Helices liegen (Nagai *et al.*, 1990). Die Abfolge der Sekundärstrukturelemente ist β - α - β - β - α - β . Die RNA bindet an die Oberfläche des β -Faltblattes. Eine hochaffine Bindung wird durch die Stapelung der Basen der RNA mit den aromatischen Seitenketten der konservierten RNP-I und RNP-II Motive erreicht (Kühn *et al.*, 2003).

Die C-terminale Domäne des Proteins, welche zusammen mit dem RRM-Motiv die Affinität des Proteins zur RNA steigert, enthält mehere Argininreste (Kühn *et al.*, 2003). Warhscheinlich aufgrund der entgegengesetzt geladenen N-terminalen und C-terminalen Domäne besitzt PABPN1 *in vitro* eine Tendenz zur amorphen Aggregation (Scheuermann *et al.*, 2003).

Eine Verlängerung der Polyalaninsequenz in der N-terminalen Domäne um maximal sieben Alanine verursacht die Okulopharyngeale Muskeldystrophie (OPMD) (siehe Abschnitt 1.2.2). Die Polyadenylierung der mRNA ist durch diese Mutation in der Alaninsequenz nicht beeinträchtigt (Calado *et al.*, 2000; Kühn & Wahle 2004). Die *in vitro*-Fibrillierung von N-PABPN1 wird durch eine verlängerte Alaninsequenz beschleunigt. Die Deletion der Alaninsequenz verhindert die Fibrillenbildung (Scheuermann *et al.*, 2003). Untersuchungen mit kurzen synthetischen Polyalaninpeptiden zeigten, dass die Länge der Alaninsequenzen für eine Fibrillierung entscheidend ist (Blondell *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 2001; Shinchuk *et al.*, 2005, Giri *et al.*, 2006). Bei Alaninsequenzen von weniger als acht Alaninen konnte keine Fibrillierung beobachtet werden (Shinchuk *et al.*, 2005).



Abb. 1.1: Schematische Darstellung von PABPN1. Sekundärstrukturelemente wurden mit dem Programm PredictProtein am EMBL-Server bestimmt (Rost, 1996). α -helikale Bereiche sind als rote Zylinder, β -Stränge als grüne Pfeile dargestellt. Die Nettoladungen der einzelnen Domänen sind mit + bzw. – gekennzeichnet. (Dissertation Till Scheuermann, 2003).

1.4 Amyloide fibrilläre Strukturen

Ursprünglich wurde der Begriff "amyloid" (= stärkehaltig) von Virchow 1854 zur Beschreibung von Ablagerungen in Gewebe oder Organen verwendet. Erst später wurde entdeckt, dass das Material überwiegend aus Proteinen bestand.

1.4.1 <u>Makromolekulare Strukturen von Fibrillen</u>

Amyloide Fibrillen können unter dem Elektronenmikroskop (EM) und auch mittels Rasterkraftmikroskop (AFM engl. *atomic force mircroscopy*) als filamentöse Strukturen mit einer durchschnittlichen Breite von ca. 10 nm und einer Länge von bis zu 1 µm beobachtet werden (Markin & Serpell, 2005) (Abb. 1.2A). Durch Cryo-Elektronenmikroskopie wurde gezeigt, dass die meisten Fibrillen aus mehreren Protofilamenten aufgebaut sind. Die Anzahl,

Größe und Anordnung der Protofilamente variiert bei den verschiedenen Fibrillentypen. Protofilamente sind fibrillenähnliche Substrukturen, die sich umeinander winden (Jiménez *et al.*, 1999; Champerlain *et al.*, 2000; Jiménez *et al.*, 2002). Diese Variabilität der verschiedenen Fibrillenstrukturen konnte auch bei Fibrillen identischer Proteinsequenz beobachtet werden (Jiménez *et al.*, 2002; Antzutkin, 2004). Unter dem Elektronen- und Rasterkraftmikroskop zeigen einige Fibrillentypen eine Ketten-ähnliche Struktur (Khurana *et al.*, 2001). Es wird allgemein angenommen, dass diese Morphologie durch die Eigendrehung der Fibrillen längs der Fibrillenachse zustande kommt (Goldsbury *et al.*, 1997; Antzutkin, 2004).

Bei Fibrillen der N-terminalen Domäne von PABPN1 mit 17 Alaninen konnte ebenfalls ein Durchmesser von ca. 12 nm beobachtet werden (Scheuermann *et al.*, 2003) (Abb. 1.2B). Die Breite der Fibrillen kurzer Polyalaninpeptide ist allerdings abhängig von der Peptidlänge und schwankt zwischen 2,5–7,5 nm (Shinchuk *et al.*, 2005). Durch elektronenmikroskopische bzw. AFM-Aufnahmen wurde bis jetzt weder bei Polyalaninpeptid- noch bei N-PABPN1-Fibrillen ein Hinweis auf Protofilamente gefunden.



Abb. 1.2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Fibrillen. A: Fibrillen von IAPP (*islet amyloid polypeptide*) mit einem Durchmesser von ca. 100 Å (Markin & Serpell, 2005). B: Fibrillen von N-PABPN1 mit 17 Alaninen. Der Durchmesser beträgt ca. 12 nm (Scheuermann *et al.*, 2003).

1.4.2 Atomare Struktur von Fibrillen

Röntgenkristallographische Untersuchungen von Fibrillen ergaben das charakteristische Beugungsmuster einer β -cross-Struktur (Markin & Serpell, 2005). Dabei handelt es sich um

eine regelmäßige Anordnung der Polypeptidketten, in der ein ß-Faltblatt parallel oder antiparallel und die einzelnen ß-Stränge senkrecht zur Fibrillenachse orientiert sind (Geddes *et al.*, 1968). Die charakteristischen Signale bei ca. 4.8 und 10 Å entsprechen dem Abstand zwischen den ß-Strängen bzw. zwischen übereinanderliegenden ß-Faltblättern (Sawaya *et al.*, 2007, Nelson *et al.*, 2005). Die Distanz der ß-Faltblätter variiert, je nachdem welche Seitenketten aus dem ß-Faltblatt herausragen (Fändrich & Dobson, 2002).

Für die Fibrillen von N-PABPN1 konnte ein antiparalleles β -Faltblatt durch *Fourier Transform* Infrarotspektroskopie (FTIR) und Circulardichroismus (CD) beobachtet werden (Scheuermann *et al.*, 2003). Die charakteristische β -cross-Struktur für amyloide Fibrillen wurde durch röntgenkristallographische Untersuchungen bestätigt (Dissertation Till Scheuermann, 2003).

Ein mittels Festkörper-NMR bestimmtes Strukturmodell von Fibrillen des Aß-Peptids zeigt, dass die ß-Stränge der Aminosäuren 12-24 und 30-40 mit benachbarten Molekülen zwei übereinanderliegende intermolekulare, parallele ß-Faltblätter bilden. Die Abstände der ß-Stränge und der ß-Faltblätter mit 4.8 und 9.5 Å entsprechen den Signalen aus dem Röntgenbeugungsmuster (Petkova *et al.*, 2002). Allerdings konnte auch bei Fibrillen des Aß-Peptids ein antiparalleles ß-Faltblätt beobachtet werden. Es ist nicht ausgeschlossen, dass beide Strukturen nebeneinander vorliegen (Perutz *et al.*, 2002). Vergleichbare amyloide, fibrilläre Strukturen des pflanzlichen Prionproteins HET, von β_2 -Microglobulin und α -Synuclein sowie Peptiden des Sup35 und dem humanen Prionprotein PrP konnten durch NMR oder Festkörper-NMR gezeigt werden (Kuwata *et al.*, 2003; Ritter *et al.*, 2005; Iwata *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007). Die Analyse von Polyalanin-induzierten Fibrillen mittels Festkörper-NMR steht noch aus.

1.4.3 <u>Nachweis von Fibrillen</u>

Einer der ersten Nachweise zur Bestimmung von Fibrillen war die Färbung mit Iodlösung, wodurch eine Blaufärbung der amyloiden Ablagerungen beobachtet wurde. Ein weiteres Merkmal für amyloide Fibrillen ist die Anfärbung mittels Kongorot. Dabei tritt unter linear polarisiertem Licht eine charakteristische gelb-grüne Färbung auf (Benhold, 1922; Puchtler & Sweat, 1961). Ebenso charakteristisch wie Kongorot ist die Anfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Thioflavin T (ThT) (Conway *et al.*, 2000). Die Anfärbung mit Thioflavin T ist die Standardmethode zur Detektion von Fibrillen (Naiki *et al.*, 1989). Durch

die Bindung an Fibrillen erhöht sich die Fluoreszenzintensität von ThT bei 482 nm nach einer Anregung bei 450 nm (LeVine, III, 1993).

Die Fibrillen von N-PABPN1 zeigen kaum die für amyloide Fibrillen charakteristische gelbgrüne Färbung mit Kongorot (Dissertation Till Scheuermann, 2003). Bei Polyalaninpeptiden bindet Kongorot nur an die Oberfläche der Fibrillen und nicht zwischen den ß-Faltblättern, deswegen ergibt sich nicht das charakteristische Färbungsmuster (Shinchuk et al., 2005). Die Polyalanin-induzierten Fibrillen können zwar ebenfalls mit dem Fluoreszenzfarbstoff Thioflavin T (ThT) detektiert werden. Es wurde aber eine empfindlichere Detektion der Polyalaninfibrillen mit dem Fluoreszenzfarbstoff ANS (8-Anilino-1-naphthalensulfonsäure) beobachtet (Dissertation Till Scheuermann, 2003). ANS bindet an hydrophobe Bereiche von Proteinen und wird gewöhnlich zur Bestimmung des molten globule state bei der Faltung von Proteinen verwendet (Engelhard & Evans, 1995). Durch die Bindung von ANS an hydrophobe Oberflächen von Proteinen verschiebt sich das Fluoreszenzmaximum zu niedrigeren Wellenlängen und die Fluoreszenzintensität erhöht sich (Semisotnov et al., 1991). Durch die β-Faltblattstruktur der Fibrillen, welche durch Polyalanine gebildet werden, entsteht eine sehr hydrophobe Oberfläche, an die ANS effizient binden kann (Scheuermann et al., 2003; Shinchuk et al., 2005). Deswegen können Fibrillen von Polyalaninpeptiden und N-PABPN1 mit ANS besser als mit ThT vermessen werden.

1.4.4 <u>Stabilität von Fibrillen</u>

Amyloide Fibrillen besitzen eine hohe Stabilität. Im Gegensatz zu den nativen Strukturen sind die Fibrillen resistent gegenüber dem Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) (Soreghan *et al.*, 1994; Scherzinger *et al.*, 1999; Busch *et al.*, 2003). Nur mit starken Denaturierungsmitteln, wie zum Beispiel Guanidinhydrochlorid, können die amyloiden Fibrillen zerstört werden (Naiki *et al.*, 1989; LeVine, III, 1993; Chiba *et al.*, 2003). Neben der chemischen Stabilität besitzen Fibrillen ebenfalls eine hohe Resistenz gegenüber Proteasen. Die kompakte Struktur der Fibrillen bietet einen Schutz gegen den Abbau durch Proteasen (Brown *et al.*, 1990; Safar *et al.*, 1993; Meyer *et al.*, 2000).

Unter den amyloiden Fibrillen wiederum zeigen die Polyalaninfibrillen wahrscheinlich die höchste Stabilität. Das bekannteste Beispiel für fibrilläre Strukturen von Polyalaninsequenzen in der Natur sind die Spinnenseiden (Xu & Lewis, 1990). Spinnenseiden besitzen aufgrund ihrer Struktur eine große Stabilität und Elastizität (Vollrath, 1992). Die Stabilität von Polyalaninfibrillen *in vitro* beruht möglicherweise auf der hydrophoben Struktur der Alanine und ihrer eng gepackten ß-Faltblätter. Durch diese spezielle Konformation wird eine hohe Resistenz gegenüber chemischen Reagenzien wie Guanidinhydrochlorid und SDS erreicht. Auch große Temperatur- oder pH-Schwankungen denaturieren die Fibrillenstruktur nicht. Die Polyalaninfibrillen zeigen ebenfalls eine hohe Resistenz gegenüber dem Abbau von Proteasen wie Proteinase K oder Trypsin (Forood *et al.*, 1995; Dissertation Till Scheuermann, 2003; Shinchuk *et al.*, 2005).

1.4.5 Beeinflussung der Fibrillenbildung durch unterschiedliche Parameter

Es gibt verschiedene Parameter, die einen Einfluss auf die Fibrillenbildung haben. Bei dem Aβ-Peptid sowie beim Huntingtin-Protein spielt die Peptidlänge bzw. die Länge der Polyglutaminsequenz eine entscheidende Rolle bei der Fibrillierung. *In vitro* existiert eine Konkurrenz zwischen der Bildung von amorphen Aggregaten und der Bildung von fibrillären Strukturen (Soreghan *et al.*, 1994; Scherzinger *et al.*, 1999; Khurana *et al.*, 2001). Je länger die Glutaminsequenz im Huntingtin ist, desto schneller kommt es zur Fibrillenbildung und desto mehr Fibrillen werden gebildet. Die Länge der Fibrillen wird ebenfalls durch Glutaminexpansionen im Protein beeinflusst (Scherzinger *et al.*, 1999; Busch *et al.*, 2003). Bei Polyalaninsequenzen wird, wie schon in Kapitel 1.3 erwähnt, ebenfalls eine Abhängigkeit zwischen der Anzahl der Alanine und der Geschwindigkeit der Fibrillenbildung beobachtet, je länger die Alaninsequenz, desto schneller die Fibrillierung (Shinchuk *et al.*, 2005).

Die Fibrillierungsgeschwindigkeit ist von der Proteinkonzentration und Inkubationstemperatur abhängig, wobei eine Erhöhung der Konzentration wie auch der Temperatur eine Beschleunigung der Fibrillierung hervorruft (Scheuermann *et al.*, 2003; Shinchuk *et al.*, 2005, Khurana *et al.*, 2001). Auch das Schütteln oder Rühren der Proteinlösung während der Inkubation beschleunigt die Fibrillenbildung (Souillac *et al.*, 2002; Pedersen *et al.*, 2006a).

Ob Proteine oder Peptide eine Fibrillenbildung zeigen, ist unabhängig von der nativen Struktur. Bei der Umwandlung nativer in fibrilläre Strukturen ist teilweise eine partielle Denaturierung nötig, damit ß-Faltblätter gebildet werden können (Kelly *et al.*, 1996). Durch eine pH-Veränderung oder durch die Zugabe von Denaturierungsmitteln kann die partielle Entfaltung erreicht werden. *In vitro* fördert beispielsweise ein niedriger pH-Wert oder geringe Konzentrationen von Harnstoff bei einer Immunoglobulindomäne oder dem ribosomalen Protein S6 die Fibrillenbildung (Khurana *et al.*, 2001; Souillac *et al.*, 2002; Hamada &

Dobson, 2002; Pedersen et al., 2004). Der pH-Wert wirkt ebenfalls auf die Ladung der Proteine, wodurch die Fibrillierungsreaktion beeinflusst wird (Wood *et al.*, 1996; Petkova *et al.*, 2004; Pedersen *et al.*, 2006a).

Die Aminosäuresequenzen der verschiedenen Proteine, die Fibrillenstrukturen ausbilden, weisen keine Homologien auf. Daraus lässt sich schließen, dass nicht nur die Sequenz bestimmt, ob ein Protein die Fähigkeit besitzt zu fibrillieren. Trotzdem führt der Austausch von einzelnen Aminosäuren zu Veränderungen der Fibrillierungseigenschaften bis zur vollständigen Unterdrückung der Fibrillenbildung (Hilbich *et al.*, 1992; Wood *et al.*, 1995; Esler *et al.*, 1996; Chiba *et al.*, 2003; Chiti *et al.*, 2003; Pedersen *et al.*, 2004).

1.4.6 Kinetik der Fibrillenbildung

Bis jetzt wurden vier Modelle zum Fibrillierungsprozess aufgestellt (Kelly, 2000). Bei allen Modellen wird zunächst ein Nukleationskeim gebildet, bevor die Fibrille entsteht. Die Art der Keimbildung sowie die Keime selbst können dabei sehr verschieden sein. Beim ersten Modell (templated assembly model) lagert sich die lösliche Form in random coil-Konformation an einen β-Faltblatt-reichen, vorgebildeten Keim. Bei diesem Weg ist die Strukturänderung der löslichen Form nach der Anlagerung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Beim zweiten Modell (monomer-directed conversion model) nimmt das lösliche Monomer die Struktur der Fibrillen an und bindet im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt an ein zweites Monomer. Durch die Bindung wird im zweiten Monomer eine Konformationsänderung induziert. Danach dissoziieren die Monomere wieder und lagern sich an die Fibrille an. Ein weiteres Modell (nucleated polymerization model) beschreibt die Bildung eines Nukleationskeims als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt. An den Keim lagern sich relativ schnell die Monomere an. Bei dem vierten Modell (nucleated-confermational conversion model) geht die Bildung eines kleinen amorphen Aggregates voraus, welches im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt den kritischen Kern bildet. Die Fibrille bildet sich durch schnelle Anlagerung von globulären Multimeren an das Fibrillenende (Nguyen & Hall, 2005).

Durch die Bildung eines Nukleationskeimes vor der eigentlichen Verlängerung der Fibrille ist immer eine *lag phase* zu beobachten (Harper & Lansbury, 1997; Dobson, 2004). Die Entstehung eines solchen Keimes ist Proteinkonzentrations-abhängig. Unterhalb einer kritischen Konzentration bildet sich kein Keim aus und damit erfolgt keine Fibrillierung (Harper & Lansbury, 1997). Für die Kinetik der Fibrillenbildung ist, wie in Abbildung 1.3 dargestellt, daher ein sigmoider Kurvenverlauf charakteristisch. Die Länge der *lag phase*, welche wenige Sekunden bis mehrere Wochen dauern kann, ist abhängig von dem jeweiligen Protein und von verschiedenen Parametern wie Temperatur oder Proteinkonzentration (siehe Abschnitt 1.4.5) (Harper & Lansbury, 1997; Scheuermann *et al.*, 2003; Pedersen *et al.*, 2004). Es wird von manchen Autoren diskutiert, dass die Menge an gebildeten Fibrillen von einem Gleichgewicht zwischen Monomer und Fibrille oder zwischen Intermediaten und Fibrille oder monomerer Spezies abhängig ist. Das Erreichen eines Plateaus in der Fibrillierungskinetik könnte das vermutete Gleichgewicht widerspiegeln (Jarret & Lansbury, 1992; Hasegawa *et al.*, 1999; Khurana *et al.*, 2001; Pedersen *et al.*, 2006a).



Abb. 1.3: Eine idealisierte sigmoide Wachstumskurve der Fibrillierungsreaktion.

1.4.7 Einfluss von seeds auf die Fibrillierung

Wie im vorherigen Abschnitt näher erläutert wurde, entsteht die *lag phase* durch die Bildung eines Nukleationskeimes. Als Nukleationskeim werden im Folgenden jene Strukturen bezeichnet, die sich spontan durch Umlagerung eines oder mehrerer löslicher Monomere bilden. Die Anzahl sowie Struktur der Proteinmoleküle innerhalb des Nukleationskeimes sind je nach Proteintyp wahrscheinlich verschieden (siehe Abschnitt 1.4.6). Die Anlagerung weiterer Monomere an Nukleationskeime stellt dann das Fibrillenwachstum dar. Eine Eliminierung oder sehr starke Verringerung der *lag phase* konnte ebenfalls durch die Zugabe von Fibrillenkeimen (engl. *seeds*) in Form von Ultraschall fragmentierten Fibrillen beobachtet werden (Harper & Lansbury, 1997; Scheuermann et al., 2003). Die seeds sind nicht zu verwechseln mit den sich während der lag phase bildenden Nukleationskeimen, obwohl auf atomarer und mechanistischer Ebene die Anpolymerisierung an Nukleationskeime und seeds wahrscheinlich identisch ist. Bei den seeds ist ebenfalls eine direkte Anlagerung weiterer Proteinmoleküle und damit ein Fibrillenwachstum möglich. Da die Bildung eines Nukleationskeimes wahrscheinlich sehr viel langsamer erfolgt als die Anlagerung von die zugegebenen Fibrillenkeime, löslichen Monomeren an wird direkt eine Fibrillenverlängerung beobachtet.

Beim heterologen *seeding* oder *cross-seeding* wird der Einfluss von Fibrillenfragmenten anderer Peptide oder Proteine auf die Fibrillierung getestet. Es konnte festgestellt werde, dass der Erfolg eines solchen *seeding*-Experiments nicht auf der Sequenzhomologie der Peptide beruht, sondern auf den Strukturähnlichkeiten der gebildeten Fibrillen (Jarret & Lansbury, 1992). *Cross-seeding* im Vergleich zum homologen *seeding* ist bei der Fibrillenbildung des Aβ-Peptids beispielsweise weniger effizient (O'Nuallain *et al.*, 2004). Die Verkürzung der *lag phase* ist nicht so stark und auch die Menge an gebildeten Fibrillen ist wesentlich geringer als beim *seeding* mit homologen Keimen (Hasegawa *et al.*, 1999).

Wie in den vorausgegangenen Abschnitten erläutert wurde, unterscheiden sich die verschiedenen Fibrillen, trotz ihrer vielen Gemeinsamkeiten, in Struktur und Stabilität. Untersuchungen mit verschiedenen heterologen *seeds* liefern sich widersprechende Ergebnisse. Einige weisen daraufhin, dass die Keime nicht nur einen Einfluss auf die *lag phase*, sondern auch auf die Struktur und Stabilität der Fibrille haben. Der verwendete *seed* bestimmt die Struktur der entstehenden Fibrille und damit auch die Stabilität zum Beispiel bei Sup35, dem Aβ-Peptid und bei Glugacon (Chien & Weissman, 2001; O'Nuallain *et al.*, 2004; Pedersen *et al.*, 2006a). Im Gegensatz dazu findet man aber auch Arbeiten darüber, dass die monomere Spezies des Aβ-Peptids und nicht der *seed* die Morphologie der Fibrille diktiert (Hasegawa *et al.*, 1999).

Durch AFM-Aufnahmen und unter Verwendung von Fluoreszenzmarkern wurde ein bidirektionales Wachstum bei der *seed*-Verlängerung beobachtet. Allerdings wurde der Fibrillenkeim hauptsächlich einseitig verlängert bzw. war die Elongationsgeschwindigkeit an einem *seed*-Ende sehr viel langsamer (Goldsbury *et al.*, 1997; Goldsbury *et al.*, 1999; Inoue *et al.*, 2001; Ban *et al.*, 2003).

1.4.8 <u>Modifizierung der Fibrillierungskinetik durch Proteine und niedermolekulare</u> <u>Substanzen</u>

Der Mechanismus der Fibrillierung von Proteinen und die vermutlich dadurch hervorgerufenen Krankheiten werden trotz vieler Untersuchungen bis jetzt noch kaum verstanden. In Patientenproben werden neben den verantwortlich gemachten Proteinen auch noch viele andere Substanzen wie weitere Proteine, DNA oder RNA in den krankheitsbedingten, amyloiden Ablagerungen gefunden (siehe Abschnitt 1.2.2).

1.4.8.1 Einfluss von Proteinen

In den letzten Jahren wurde sehr intensiv der Einfluss verschiedener Proteine auf die Fibrillenbildung getestet. Die sogenannten Hitzeschockproteine (HSP) fungieren bei Stresssituationen als *chaperone*. Bei Hitzestress beispielsweise binden die HSPs an aggregationsanfällige Proteine und halten diese löslich bzw. faltungskompetent. Das ATP abhängige HSP60 induziert unter ATP-Verbrauch Konformationsänderungen (Ostermann *et al.*, 1989; *rewiev:* Martin & Hartl, 1997). Diese Eigenschaft der HSPs führt auch zu einer Inhibierung der Fibrillenbildung (Kudva *et al.*, 1997; Arora *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004; Bao *et al.*, 2004; Kong *et al.*, 2005). Teilweise konnte sogar eine Dissoziation von gebildeten Fibrillen durch HSPs *in vitro* beobachtet werden (Kong *et al.*, 2005). Der inhibierende Effekt von Hitzeschockproteinen auf die Fibrillenbildung von PABPN1 konnte auch in Zellkulturexperimenten beobachtet werden (Bao *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005).

Ein anderer Ansatz zur Verhinderung oder Verzögerung der Fibrillierung von A β -Peptiden ist beispielsweise der Einsatz von kleinen homologen Peptiden. Diese Peptide lagern sich an die Monomere an und verhindern dadurch die Bildung stabiler Fibrillen (Mason *et al.*, 2003; Kokkoni *et al.*, 2006).

1.4.8.2 Einfluss anorganischer Salze

Untersuchungen mit unterschiedlichen anorganischen Salzen zeigten, dass Anionen einen beschleunigenden Effekt auf die Fibrillierung haben. Die Effektivität der Anionen ist dabei abhängig von den jeweiligen Proteinen bzw. Fibrillen (Munishkina et al., 2004a; Raman et al., 2005; Pedersen et al., 2006b). Bei einigen Proteinen, beispielsweise α-Synuclein, wird in Abhängigkeit von der Anionenkonzentration eine Beschleunigung der Fibrillenbildung beobachtet (Munishkina et al., 2004a). Die Reihenfolge der Anionen in Bezug auf ihren beschleunigenden Effekt ist identisch mit der Position in der Hofmeisterserie (Hofmeister, 1888). Sulfationen bewirken den größten während beispielsweise Effekt. Hydrogencarbonationen die Fibrillenbildung viel weniger beeinflussen (Munishkina et al., 2004a). Die Anionen haben dabei einen Einfluss auf die Bildung des Nukleationskeimes sowie auf das Fibrillenwachstum. Die Salze bewirken eine Veränderung der Wasserstoffbrücken-Bindungen vom Protein zum Wasser, dadurch werden die Proteine ausgesalzt (Baldwin, 1996), gleichzeitig wird die Proteinstruktur stabilisiert. Bei geringen Salzkonzentrationen (ca. 10 mM) dominiert jedoch der elektrostatische Effekt der Salze auf die Fibrillenbildung von α -Synuclein (Munishkina *et al.*, 2004a). Bei anderen Fibrillenbildungen, wie beispielsweise vom Glucagon oder β₂-Microglobulin, konnten ebenfalls die Effekte der Anionen auf ihre Elektroselektivität zurückgeführt werden (Pedersen et al., 2006b; Raman et al., 2005). Als Elektroselektivität wird die Retentionszeit von Ionen bei einer Ionenaustausch-Chromatographie bezeichnet. Multivalente Analyten werden stärker retardiert als monovalente (Gjerde et al., 1980). Der Einfluss der Elektroselektivität von Salzen auf die Fibrillenbildung wurde mit direkten elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen positiven Ladungen der Proteine und den negativen Anionen erklärt (Goto et al., 1990; Pedersen et al., 2006b). Zweiwertige und leichter polarisierbare Ionen (zum Beispiel Sulfationen) haben dabei einen beschleunigenderen Einfluss auf die Fibrillenbildung als beispielsweise einwertige Chloridionen (Raman et al., 2005). Beim Aß-Peptid wird der Einfluss von Sulfationen auf die Bildung von amvloiden Ablagerungen nicht ausschließlich auf den polyanionischen Charakter zurückgeführt, sondern die Sulfationen als solche beeinflussen die Bildung von Makrofibrillen (Fraser et al., 1992).

Einen konzentrationsabhängigen und beschleunigenden Effekt auf die Fibrillierung besitzen auch die Kationen (Munishkina *et al.*, 2004a; Pedersen *et al.*, 2006b). Es wird angenommen, dass die Kationen die negativen Ladungen des Proteins abschwächen. Dadurch verringerte Abstoßungskräfte zwischen den einzelnen Proteinmolekülen erleichtern eine Fibrillenbildung (Munishkina *et al.*, 2004a).

Bei Glucagon- und β_2 -Microglobulinfibrillen wurde ein weiterer Effekt von Anionen auf die Fibrillenbildung beobachtet: Sulfationen beispielsweise beeinflussen auch die Struktur der Fibrillen und erhöhen damit die Fibrillenstabilität (Raman *et al.*, 2005; Pedersen *et al.*, 2006b).

1.4.8.3 Einfluss organischer Substanzen

In vitro-Studien mit verschiedenen Fibrillen-bildenden Proteinen zeigten einen antiamyloidogenen Effekt aromatischer Kohlenwasserstoffe wie zum Beispiel Tetracyclin oder Curcumin (Abb. 1.4) (Tagliavini *et al.*, 2000; Forloni *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2005; Ono & Yamada, 2006). In transgenen Mäusen konnte eine Verringerung der Symptome von OPMD und *Chorea Huntington* sowie eine Reduzierung der Aggregate durch Doxycyclin und Minocyclin beobachtet werden (Chen *et al.*, 2000; Davies *et al.*, 2005; Fan *et al.*, 2007). Ebenfalls konnte der proteolytischer Abbau amyloider Ablagerungen von Transthyretin in transgenen Mäusen durch Doxycyclin erhöht werden (Tavanez *et al.*, 2005) (Cardoso & Saraiva, 2006).

Auch Trehalose oder Polymere wie Polyethylenglycol (PEG) beeinflussen die Fibrillenbildung (Arora *et al.*, 2004; Munishkina *et al.*, 2004b; Lui *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 2005). Eine Verminderung der Krankheitssymptome bei transgenen Mäusen sowie eine Reduzierung der Ablagerungen wurden nach oraler Verabreichung von Trehalose bei *Chorea Huntington* und OPMD beschrieben (Tanaka *et al.*, 2004; Davies *et al.*, 2006).



Abb. 1.4: Struktur von A: Doxycyclin, B: Curcumin.

1.5 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, zu einem besseren Verständnis der polyalanin-induzierten Fibrillenbildung beizutragen. In der hier vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit N-PABPN1 gearbeitet, da das vollständige Protein zur amorphen Aggregation neigt. Es sollten die Fibrillen und deren Bildung des Wildtyps mit Fibrillen der Polyalaninmutante mit sieben zusätzlichen Alaninen (N-(+7)Ala) von N-PABPN1 verglichen werden (Abb. 1.5).

M <mark>AAAAAAAA</mark> GAAGGRGSG	N-WT - 10 Alanine
M <u>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA</u>	N-(+7)Ala - 17 Alanine
MGAAGGRGSG	$N-\Delta Ala$ - ohne Polyalaninsequenz

Abb. 1.5: Verwendete Varianten von N-PABPN1.

Dabei sollten folgende Teilprojekte bearbeitet werden:

Der Einfluss von homologem und heterologem *seeding* auf die Fibrillenbildung von N-WT und N-(+7)Ala sollte analysiert werden.

Die Stabilität der beiden Fibrillentypen gegenüber Solubilisierung mit Guanidiniumthiocyanat (GdmSCN) sollte näher charakterisiert und miteinander verglichen werden.

Die Morphologie der gebildeten Fibrillen sollte durch EM- und AFM-Analysen auf eventuelle Strukturunterschiede untersucht werden.

Die Rolle der Aminosäure außerhalb der Polyalaninsequenz für die Fibrillenbildung sollte durch Koinkubation der Deletionsmutante N-∆Ala sowie einem synthetischen Polyalaninpeptid bestimmt werden.

Zur besseren Charakterisierung der Fibrillierung von PABPN1 sollte der Einfluss von Modellproteinen, wie RCMLA und Lysozym, auf die Fibrillenbildung von N-(+7)Ala getestet werden.

Des Weiteren sollte die Fibrillenbildung in Gegenwart verschiedener anorganischer Salze untersucht werden, um den Effekt von ionischen und hydrophoben Wechselwirkungen auf die Fibrillierung zu ergründen.

Eine Verlangsamung oder Unterdrückung der Fibrillenbildung sollte durch Zugabe von Trehalose und Doxycyclin zur *in vitro*-Fibrillenbildung erreicht werden.

Mögliche Intermediate der Fibrillenbildung sollten identifiziert und nach Möglichkeit analysiert werden.

2 Materialien

2.1 Chemikalien

Aceton Acetonitril Acrylamidstammlösung (30 % ig mit 0,8 % Bisacrylamid) Ammoniumchlorid Ammoniumnitrat Ammoniumsulfat Ampicillin ANS APS Bacitracin Bromcyan Coomassie brillant blau Doxycyclin hyclate **EDTA** Guanidinhydrochlorid Guanidiniumthiocyanat Hefeextrakt Imidazol IPTG Isopropanol Kaliumnitrat Kaliumdihydrogenphosphat Kanamycin

Roth (Karlsruhe) Sigma (St. Louis, USA) Fluka (Buchs, CH) Applichem (Darmstadt) Sigma (St. Louis, USA) Sigma (St. Louis, USA) Roth (Karlsruhe) Roche Diagnostics (Mannheim) Sigma (St. Louis, USA) Fluka (Buchs, CH) Fluka (Buchs, CH) Applichem (Darmstadt) NiGU Chemie (Waldkraiburg) Merck (Darmstadt) Roth (Karlsruhe) Merck (Darmstadt) Applichem (Darmstadt) Merck (Darmstadt) Merck (Darmstadt)

Merck (Darmstadt)

Roth (Karlsruhe)

Merck (Darmstadt)

L-Arginin (freie Base)	Fluka (Buchs, CH)
L-Argininhydrochlorid	Applichem (Darmstadt)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
2-Mercaptoethanol	Fluka (Buchs, CH)
MOPS	Applichem (Darmstadt)
NaDOC	VEB Berlin Chemie (Berlin)
Natriumnitrat	Fluka (Buchs, CH)
Natriumsulfat	Fluka (Buchs, CH)
PEG 35000	Fluka (Buchs, CH)
PEG 6000	Fluka (Buchs, CH)
PLURIOL [®] P2000	BASF (Ludwigshafen
PMSF	Sigma (St. Louis, USA)
SDS	Roth (Karlsruhe)
TCA	Roth (Karlsruhe)
TEMED	Roth (Karlsruhe)
D-(+)-Trehalose	Fluka (Buchs, CH)
Trifluoressigsäure	Roth (Karlsruhe)
Tris	Applichem (Darmstadt)
Trypton/Pepton	Roth (Karlsruhe)
Tween 20	Roth (Karlsruhe)
Uranylacetat	Plano (Wetzlar)

Alle nicht aufgeführten Chemikalien stammen von den Firmen Merck, Sigma, Applichem und hatten den Reinheitsgrad p.a. Zur Herstellung von Puffern und Lösungen wurde deionisiertes Wasser (*Pure Lab Plus*, *USF Seral* bzw. Milipore[®]) verwendet.

2.1.1 Chromatographiematerialien

Ni-NTA (His-Bond Resin) (50 ml)	Novagen (Bad Soden)
Superdex TM 75 <i>prep grade</i>	
Hi Load TM 16/60 (120 ml)	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Q-Sepharose fast flow (100 ml)	Roche Diagnostics (Mannheim)
EC125/4 Nucleosil 100-5 C18-Säule	Macherey-Nagel (Düren)
Nucleosil 5u C18 (125 x 4 mm 5 micron) Jupiter 5u C18 300A (250 x 4,6 mm) 2.1.2 <u>Standards</u>	Phenomenex (Aschaffenburg) Phenomenex (Aschaffenburg)

LMW Elektrophoresis Calibration KitAmershanPeqGold Protein MarkerPeQLab H

Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) PeQLab Biotechnologie (Erlangen)

2.1.3 Proteine, Antikörper

Lysozym	Applichem (Darmstadt)
RCMLA	Sigma (St. Louis, USA)
Streptavidin-POD-Konjugat	Roche (Mannheim)

2.1.4 <u>E. coli-Stamm</u>

E. coli BL21(DE3) Gold

Novagen (Bad Soden) Stratagene (Amsterdam)

2.1.5 <u>Plasmide</u>

pET15bNovagen (Bad Soden)pUBS520Dr. Ulrich Brinkmann (Epidauros
Biotechnology, Bernried)

2.1.6 Lösungen, Puffer und Medien

ANS-Stammlösung:	5 mM ANS, 5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,5, 0,15 M NaCl
ANS-Messlösung.	Stammlösung 1:100 verdünnt in Fibrillierungspuffer
Antibiotika-Stammlösungen:	100 mg/ml Ampicillin, 50 mg/ml Kanamycin
	(1:1000-Verdünnung im Medium)
APS-Stammlösung:	10 % (w/v) in H ₂ O
Fibrillierungspuffer:	5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,5, 0,15 M NaCl
LB-Medium (modifiziert):	10 g/l Trypton/ Pepton, 5 g/l Hefeextrakt,
	5 g/l NaCl, 750 µl 5M NaOH
LB- Platten (modifiziert):	10 g/l Trypton/ Pepton, 5 g/l Hefeextrakt,
	5 g/l NaCl, 750 µl 5M NaOH, 15 g/l Agar-Agar
PBS-Tween Lösung:	8 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ , 140 mM NaCl
	pH 7,6, 0,1 % Tween 20
SDS PAGE-Trenngelpuffer:	3 M Tris/HCl pH 8,85 , 4 g/l SDS
SDS PAGE-Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris/HCl pH 6,8 , 4 g/l SDS
SDS PAGE-Trenngel 14 % (4 x):	7 ml Acrylamidstammlösung, 4 ml Trenngelpuffer,
	4 ml H ₂ O, 50 μ l TEMED, 100 μ l APS-Stammlösung
SDS PAGE-Sammelgel (4 x):	1,2 ml Acrylamidstammlösung, 1,5 ml Sammel-
	gelpuffer, 3,3 ml H ₂ O, 30 μ l TEMED, 60 μ l APS-
	Stammlösung
SDS PAGE-Laufpuffer (10 x):	250 mM Tris/HCl pH 8,3 ,1 % (w/v) SDS, 1,87 M
	Glycerin
SDS PAGE-Färbelösung:	40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure,
	1 g/l Coomassie brillant blau
SDS PAGE-Entfärber:	40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure,
SDS PAGE-Proteinprobenpuffer (2 x):	100 mM Tris/HCl pH 8,0, 4 % SDS, 0,2 % Brom-
	phenolblau, 20 % Glycerin, 12,5 % 2-Mercapto-
	ethanol

Entwickler- & Fixierer-Lösung			
(Kodak [™] Processing chemicals):	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)		
Western Blot-Inkubationspuffer:	20 mM Tris/HCl, 150 mM Glycin, 0,05 % SDS,		
	20 % MeOH		

2.1.7 sonstige Materialien

Dialyseschläuche MWCO 3000

Dialyseschläuche MWCO 6-8000

Spectrum-Laboratories (Rancho Dominguez, US & Kanada) Spectrum-Laboratories (Rancho Dominguez, US & Kanada)

Dialyse Slide-A-Lyzer [®] Mini Dialysis	
Units 3,5 MWCO	Pierce (Rockford, USA)
kohlebeschichtetes Kupfergrid	Plano (Wetzlar)
Siliconnitrit-Cantilevern Typ NCH-50	Nanosensors (Neuchatel, Schweiz)
Ultrafiltration Membran 3000	Millipore (Bedford, USA)
PVDF-Membran	BioRad (München)
Biotin Labeling Kit	Roche (Mannheim)
Nitrocellulose <i>Blotting</i> Membran (0,45 µm)	PeQLab Biotechnologie (Erlangen)
ZipTip C18	Millipore (Bedford, USA)
ECL TM -Western <i>Blotting Detection Reagents</i>	Amersham Biosciences (Piscataway, NJ USA)

2.2 Geräte

Amicon *Ultrafiltration Cell* ÄKTA *Explorer* 100 Millipore (Bedford, USA) Amersham Pharamcia Biotech (Freiburg) Zentrifugen Avanti J-20, J-25, J30I (und Zubehör) Brutschrank BM 200 Brutschrank WST3010 Elektronenmikroskop EM 900 Fermentor *Biostat* ED 10 1 Spektrofluorimeter Fluoromax2

Gaulin Homogenisator Typ Lab60/60-10TBS Gefriertrockungsanlage BETA 1-16 HPLC-Anlage: Gina 50 *Multimode* SPM Mikroskop optimaTM TLX Ultrazentrifuge (und Zubehör) Programmierer GP-250Plus & *Pump* P-50 & *SuperFrac* Quarzglas-Küvetten SDS-PAGE-Apparatur: (und Zubehör) Semi-Phor (WesternBlot-Apparatur)

Spectropolarimeter J-810 SpeedVac RC10.10 mit Kühlfalle RCT 60 Thermomixer comfort UP200S Ultraschallprozessor (+Mikrospitze S2) Wyatt Qels (Quasi elastic light scattering) Beckmann (München) Memmert (Schwabach) MLW (Kent, UK) Zeiss (Jena) Braun (Melsungen) SPEX Instruments S.A., Inc. (Edision, NJ, USA) APV (Lübeck) Christ (Osterode am Harz) Gynkotec (Idstein) Veeco (Santa Babara,CA,USA)

Beckmann (München) Amersham Pharamcia Biotech (Freiburg) Hellma (Mühlheim) Amersham Pharamcia Biotech (Freiburg) Hoefer Scientific Instruments (San Francisco, USA) Jasco[®] (Easton, USA) Jouan (Femwald) Eppendorf (Hamburg) Dr. Hielscher (Teltow) Wyatt Technology Corporation (Santa Barbara, USA)

Außerdem wurden Geräte der Standardlaborausstattung verwendet.

3 Methoden

3.1 Kultivierung von Mikroorganismen

Zur rekombinanten Überexpression wurde der *E. coli* Stamm BL21(DE3) mit dem jeweiligen Expressionskonstrukt und dem Plasmid pUBS520 transformiert. Dieses Plasmid enthält das Gen für eine tRNA der in *E. coli* seltenen Argininkodons AGG und AGA (Brinkmann *et al.*, 1989). Durch die Coexpression dieser tRNA konnte die Ausbeute des rekombinaten Proteins erhöht werden. Für die Anzucht wurden generell Einzelkolonien einer Transformation verwendet, die nicht älter als 16 h waren. Die Anzucht erfolgte in einem modifizierten LB-Medium. Aufgrund der verwendeten Plasmide (pET15b und pUBS520) konnte auf Ampicillin- und Kanamycinresistenz selektiert werden.

3.1.1 Bioreaktorkultivierung

Die Fermentation wurde in einem Biostat ED-Fermentor (Braun, Melsungen) mit 10 1 Arbeitsvolumen und einem digitalen Mess- und Regelsystem durchgeführt. Es wurden 7,5 l einer Hefeextraktlösung (Roth) (50 g/l) mit 700 µl Antischaummittel im Bioreaktor 60 min bei 121 °C autoklaviert. Als Antischaummittel wurde eine 50 %ige Polypropylenglykollösung (PLURIOL® P2000, BASF, Ludwigshafen) verwendet. Anschließend wurde das Medium unter sterilen Bedingungen mit 5 g/l Glucose, 0,5 g/l MgSO₄ x 7 H₂O, 0,1 g/l Thiamin sowie mit 0,1 g/l Ampicillin und 0,05 g/l Kanamycin versetzt und mit Wasser bis zu einem Endvolumen von 8 l aufgefüllt. Wenn nötig, wurde der pH-Wert mit K₂HPO₄ auf pH 7,4 eingestellt. Die Vorkultur von 200 ml wurde mit ca. drei Einzelkolonien angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde das Fermentationsmedium mit 200 ml der Vorkultur inokuliert. Die Kultivierung wurde bei 37°C durchgeführt. Die Regulierung des pH-Wertes erfolgte mit einer 15 %igen Ammoniaklösung und 25 %iger Phosphorsäure, wobei der pH-Wert erst nach dem Abfallen auf pH 7 konstant gehalten wurde. Ab einer optischen Dichte von $OD_{600} = 10$ wurden kontinuierlich 1-2 g/min einer Hefeextraktlösung (Roth) (385 g/l) zugegeben. Bei Erreichen von OD₆₀₀ = 10, 20, 30, etc., wurden jeweils 16 ml einer 1 M MgSO4 x 7 H2O-Lösung zum Medium gegeben. Die

Induktion der Expression wurde bei $OD_{600} = 25$ mit 1 mM IPTG eingeleitet. Die Proteinproduktion erfolgte bei 37°C für drei Stunden. Anschließend wurden die *E. coli*-Zellen 20 min bei 4000 g zentrifugiert und bei -80°C gelagert.

3.2 Proteinreinigung

3.2.1 Reinigung der Varianten der N-PABPN1

Alle drei Varianten der N-terminalen-Domäne von PABPN1 wurden nach demselben Protokoll gereinigt. Zur besseren Expression und Aufreinigung besitzen die Proteine alle einen N-terminalen His-*Tag*. In Tab. 3.1 sind die jeweiligen Molekulargewichte der Varianten aufgelistet.

 Tab. 3.1: Molekulargewichte (MW) der untersuchten Varianten inklusive His-Tag

Protein	MW (kDa)
N-WT	14,19
N-(+7)Ala	14,69
N-ΔAla	13,48

Pro Reinigung wurden 100 g Zellen in 1 l Aufschlußpuffer (50 mM Tris/HCl, 5 mM EDTA pH 8) mit 1 mM PMSF resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Hochdruckdispersion bei 700-1000 bar in einem Homogenisator. Nach dem Aufschluss wurde das Zelllysat 15 min bei 20000 rpm (Beckmann-Rotor JA30.50) zentrifugiert. Die lösliche Proteinfraktion wurde 6 min bei 80°C in einem Wasserbad inkubiert und anschließend erneut 15 min bei 20000 rpm (Beckmann-Rotor JA30.50) zentrifugiert. Der Überstand der Hitzefällung wurde 1:1 mit Isopropanol vermischt und ca. 5-10 min unter Rühren inkubiert. Die lösliche Fraktion der Isopropanolfällung wurde 1:1 mit Aufschlußpuffer gemischt. Anschließend wurden die Proteindomänen mittels der unten aufgeführten Chromatographiemethoden weiter aufgereinigt.

Im Folgenden sind die verschiedenen Chromatographieschritte für N-WT, N-(+7)Ala und N-ΔAla detailliert beschrieben. Falls nicht anders erwähnt, wurde das Gelmaterial vor dem

Probenauftrag mit dem jeweiligen Auftragspuffer äquilibriert, die Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE kontrolliert und anschließend die entsprechenden Fraktionen vereinigt. Wenn nötig, wurden die Proteinlösungen zwischen den Chromatographieschritten mittels einer Amicon-Rührzelle oder PEG 35000 aufkonzentriert.

Im ersten Reinigungsschritt wurden die Proteine auf eine Q-Sepharose-Säule (100 ml) aufgetragen. Nach den Waschschritten (acht Säulenvolumen (CV) Auftragspuffer und 9 CV 50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl pH 8) wurden die Proteine mit 300 mM NaCl bei einer Flussrate von 3-5 ml/min über 8 CV eluiert.

Durch das verwendete Expressionsplasmid pET15b wurden die Proteine mit einem N-terminalen His-*tag* exprimiert, welcher eine Reinigung mittels Affinitätschromatographie (Ni-NTA) als zweiten Reinigungsschritt möglich machte. Die Affinitätschromatographie wurde unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Dafür wurden die Proteinlösungen 1:1 mit einer 8 M GdnHCl-Lösung gemischt. Der pH-Wert wurde auf pH 8 eingestellt und anschließend wurde die Poteinlösung auf eine Ni-NTA-Säule (50 ml) mit 1-2 ml/min aufgetragen. Nach dem Waschschritt (5 CV 20 mM Imidazol, 25 mM Tris/HCl pH 8, 4 M GdnHCl) wurden die Proteine durch einen Imidazolgradienten eluiert, in 5 CV auf 135 mM und anschließend in 2 CV auf 250 mM.

Nach Dialyse gegen 50 mM Tris/HCl, 5 mM EDTA pH 8 wurden die Domänen mittels Gelfiltration (Superdex 75 *prep grade*) (120 ml) bis zur Homogenität gereinigt.

3.2.2 Herstellung und Reinigung des (A)₁₇KYK-NH₂-Peptides

Das Peptid (A)₁₇KYK-NH₂ wurde von Herrn Dr. Faust (MLU Halle-Wittenberg) durch Festphasensynthese im vollautomatischen Peptidsynthesizer (Applied Biosystems 431 I A, Foster City, CA, U.S.A.) synthetisiert. Die Peptid-Synthese erfolgte nach der Fmoc-Strategie (je Aminosäure 1 mmol) mit einer HBTU/HOBt-Aktivierung. Als polares Lösungsmittel wurde NMP (N-Methylpyrrolidin) verwendet. Zur Synthese wurde 0,1 mmol eines Tentagel S RAM-Lys(Boc) Fmoc verwendet (Rapp Polymere GmbH, Tübingen, Kapazität 0,22 mmol g⁻¹). Die Abspaltung der säurelabilen Seitenkette-Schutzgruppen wurde durch Trifluoressigsäure erreicht und das dadurch entstandene Produkt mit trockenem Diethylether ausgefällt.
Das Rohprodukt der Peptidherstellung wurde in 20 % Acetonitril (ACN) mit 0,1 % TFA gelöst. Anschließend wurde die Peptidlösung auf eine *Jupiter 5u C18 300A* (250 x 4,6 mm) – Säule (Phenomenex) mit 4,15 ml CV aufgetragen. Das Peptid wurde mit einem Gradienten von 20 % bis 52 % ACN eluiert. Die gereinigten Peptide wurden massenspektrometrisch untersucht und nach Entfernung des ACN mittels *SpeedVac* RC10.10 (Jouan) lyophilisiert.

3.2.3 Lyophilisation von Proteinlösungen

Vor der Lagerung wurden die gereinigten Proteine zunächst gegen Wasser dialysiert. Die Proteinlösung wurde bei -80°C eingefroren und anschließend in der Gefriertrocknungsanlage bei 20°C lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert

3.2.4 <u>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</u>

Die Proteine wurden in Proteinprobenpuffer aufgenommen und durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Zur Auftrennung wurde ein 14 % SDS-PAGE-Trenngel verwendet. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mit Coomassie Brilliantblau-Lösung im Gel angefärbt.

3.3 Protein-Konzentrierung

3.3.1 NaDOC-Fällung von Proteinen

Die Natriumdesoxychelat-Fällung wurde zur Aufkonzentrierung der Proteine sowie zur Entfernung von Salzen vor einer SDS-PAGE durchgeführt. Zur Fällung aus einer Guanidinhydrochloridlösung wurden maximal 100 μ l Probe eingesetzt, welche mit Wasser auf 1 ml verdünnt wurde. Zur Aufkonzentrierung wurde die Proteinlösung mit ¹/₁₀ Volumen 1 % NaDOC und ¹/₅ Volumen 50 % TCA versetzt. Der Ansatz wurde mit einem Vortexer gemischt (Scientific Industries) und dann 15 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml Aceton gewaschen.

3.3.2 Konzentrierung mittels PEG

Verdünnte Proteinlösungen wurden zur Konzentrierung in Dialyseschläuche MWCO 3,500 der Firma Spectrum-Laboraties (Rancho Domingues, USA) überführt. Die Dialyseschläuche wurden bei 10°C in PEG 35000 gelegt und das Volumen um den gewünschten Faktor reduziert.

3.3.3 Konzentrierung mit einer Amicon Ultrafiltration Cell

Verdünnte Proteinlösungen wurden auch mit einer Amicon *Ultrafiltration Cell* und einer 3 kDa-Membran (Millipore, Bedford, USA) aufkonzentriert. Die Proteinlösung wurde mit Hilfe von Druck (maximal 3 bar) durch Stickstoffzufuhr über die Membran gedrückt. Dabei wurden alle Moleküle, die größer als 3 kDa waren, durch die Membran zurückgehalten und somit aufkonzentriert. Während der gesamten Aufkonzentrierung wurde die Lösung gerührt, um eine Assoziation der Proteine an der Membran zu verhindern. Die Apparatur wurde durch Eis gekühlt, um einen Abbau durch Proteasen zu vermeiden.

3.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde mit einem DU-7400 Spektophotometer (Beckmann, München) ein UV-Spektrum gemessen. Die Konzentration der Proteinlösungen wurde nach dem Lambert-Beerschen Gesetz (Gl. 1) berechnet. Die Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine wurde nach Gill und von Hippel (1989) kalkuliert. Der Extinktionskoeffizient des Peptides wurde nach Pace *et al.* (1995) ermittelt. In Tab. 3.2 sind die Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine bzw. des Peptids aufgelistet.

 $A_{280} = \varepsilon_{280} \ge c \ge d$

mit

I_E Intensität des emittierten Lichts

I _A	Intensität des eingestrahlten Lichts
A ₂₈₀	Absorption der Proteinlösung bei 280 nm
ε ₂₈₀	molarer dekadischer Extinktionskoeffizient bei 280 nm in $M^{-1} x cm^{-1}$
c	Proteinkonzentration in M
d	Schichtdicke der Küvette in cm

Tab. 3.2: Extinktionskoeffizienten der untersuchten Varianten

$\epsilon_{280} (M^{-1} x cm^{-1})$
1280
1280
1280
1490

3.5 Circulardichroismus

Fern-UV-CD-Spektren wurden an einem Spektropolarimeter J-810 (Jasco[®]) in Quarzglasküvetten mit einer Schichtdicke von 0,01 cm aufgenommen. Die Spektren wurden 10 x bei einer Integrationszeit von 1 s und 1 nm Bandbreite akkumuliert. Alle Spektren wurden bei 20°C aufgenommen. Die gemessene Elliptizität Θ wurde anhand Gl. 2 in die mittlere residuelle Elliptizität [Θ]_{MRW} umgerechnet.

$$\left[\Theta\right]_{MRW} = \frac{\Theta \times 100 \times M_{r}}{c \times d \times N_{A}}$$
Gl. 2

mit

Θ	gemessene Elliptizität in Grad	
$[\Theta]_{MRW}$	mittlere residuelle Elliptizität	
M _r	Molekularmasse in Dalton	
c	Proteinkonzentration in mg/ml	
d	Schichtdicke der Küvette in cm	
N _A	Anzahl der Aminosäuren im Proteinmolekül	

3.6 Massenspektrometrische Analysen

Die Molekulargewichtsbestimmung mittels Massenspektrometrie wurde freundlicherweise von Frau Dr. A. Schierhorn (Forschungsstelle "Enzymologie der Proteinfaltung" der Max-Planck-Gesellschaft, Halle) durchgeführt. Die mittels RP-HPLC oder *ZipTip* (Millipore) entsalzten Proben wurden durch MALDI-TOF Massenspektrometrie an einem REFLEX Spektrometer (Bruker-Franzen Analytik, Bremen) oder durch ESI-TOF Massenspektrometrie an einem *Esquire*-LC-Ionenfallen-Massenspektrometer analysiert.

Für Molekulargewichtsbestimmungen möglicher Fibrillierungsintermediate wurden die zu analysierenden Proben durch SDS-PAGE aufgetrennt und die mit Coomassie-gefärbten Banden ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden in ca. 1 mm² große Würfel zerkleinert und mit 100 µl Wasser gewaschen. Danach wurden die Proben zweimal mit 100 µl 50 % ACN 10 min und einmal mit 100 % ACN für 5 min auf dem Schüttler inkubiert. Das ACN wurde anschließend vollständig entfernt und verworfen. Die Proben wurden danach 5 min mit 80 µl 100 mM NH₄HCO₃ inkubiert, anschließend mit 50 µl ACN (100 %) versetzt und für weitere 10 min inkubiert. Die gesamte Flüssigkeit wurde anschließend entfernt und verworfen. Nach dem Trocknen in der SpeedVac wurden die Gelstücke in 20 µl 50 mM NH₄HCO₃ mit 0.25 µg Trypsin für 10 min inkubiert und nochmals mit 50 mM NH₄HCO₃ überschichtet. Nach einer Inkubation von 16 h bei 37°C wurde die Reaktion mit Hilfe von 50 µl ACN/H₂O/TFA (47,5 %/47,5 %/5 %) gestoppt. Nach zweimaligem Waschen mit ACN/H₂O/TFA unter Schütteln für 10 min wurden die Proben mit flüssigem Stickstoff eingefroren und mit der SpeedVac eingeengt. Nach Entsalzung mittels eines ZipTips wurden die Proben durch MALDI-TOF- und ESI-TOF-Massenspektrometrie von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Andrea Sinz (Universität Halle-Wittenberg, Fachbereich Pharmazie) vermessen.

3.7 N-terminale Sequenzanalyse

Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend durch Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran geblottet (ca. 1,5 h mit 1 mA pro cm² Membran). Die zu untersuchenden Coomassie-gefärbten Banden wurden ausgeschnitten und die ersten fünf bis sieben Aminosäuren an einem *Applied Biosystems* 476A Gasphasen Sequenzer (Applied Biosystems, Foster City, U.S.A) bestimmt. Die Sequenzanalyse wurde freundlicherweise von Herrn Dr. K. P. Rücknagel (Forschungsstelle "Enzymologie der Proteinfaltung" der Max-Planck-Gesellschaft, Halle) durchgeführt.

3.8 Fibrillierungsansätze

Zur Fibrillenbildung wurde lyophilisiertes Protein in 5 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, 0,1 % Na-Azid pH 7,4 gelöst. Die Proteine wurden in einer Konzentration von 1–2 mM (14,5–29 mg/ml) bei 37°C bzw. 60°C in einem Brutschrank inkubiert. Bei Fibrillierungen in Gegenwart verschiedener anderer Proteine bzw. niedermolekularer Substanzen wurde unter den gleichen Puffer- und Inkubationsbedingungen gearbeitet. Zur Kontrolle der Fibrillenbildung wurden nach verschiedenen Zeiten Proben entnommen und durch Fluoreszenzmessungen und Elektronenmikroskopie analysiert.

3.9 Detektion amyloider Fibrillen

3.9.1 Fluoreszenzmessung

Die Detektion der Fibrillenbildung wurde durch Fluoreszenzmessungen am Fluoromax 2 Spektrofluorimeter (SPEX Instruments S.A., Inc., Edison, NJ, USA) mit dem Farbstoff ANS durchgeführt. Durch die Bindung von ANS an hydrophobe Oberflächen von Proteinen verschiebt sich das Fluoreszenzmaximum zu niedrigeren Wellenlängen und die Fluoreszenzintensität erhöht sich (Semisotnov *et al.*, 1991). Die Messungen erfolgten in Küvetten einer Schichtdicke von 1 cm. Das Emissionsspektrum wurde im Bereich von 400-600 nm nach einer Anregung bei 370 nm gemessen. Zur Auswertung der Fibrillierungskinetiken wurde die Fluoreszenzintensität bei 480 nm analysiert. Von den Fibrillierungsansätzen wurde jeweils 4-8 μ l zu 800 μ l 10 μ M ANS in 5 mM KH₂PO₄ pH 7,5, 150 mM NaCl pipettiert, so dass eine Proteinendkonzentration von 5 μ M in der Küvette vorlag.

3.9.2 Elektronenmikroskopie

Für Bestätigung amyloider Fibrillen wurden die Proben außerdem eine elektronenmikroskopisch (EM 900, Zeiss) untersucht. Dazu wurde die Proteinprobe auf einem kohlebeschichteten Kupfergrid (Plano, Wetzlar) adsorbiert, welcher vorher 1 min mit Bacitracin-Lösung (0,1 mg/ml) behandelt worden war. Anschließend wurde die Proteinprobe (0,5 - 1 mg/ml) 3 min auf dem Grid inkubiert. Der Grid wurde getrocknet, mit Wasser gewaschen und wieder getrocknet. Als Kontrastmittel wurde eine 1 % Uranyl-Acetatlösung verwendet, welche für 15 sec auf dem Grid inkubiert wurde. Die Aufnahmen wurden von Herrn Dr. Gerd Hause (Biozentrum, Halle) angefertigt.

3.9.3 <u>Rasterkraftmikroskopie (atomic force microscopy - AFM)</u>

Die Vorbereitung und AFM-Aufnahmen der Proben wurden von Simone Hess (TU München) durchgeführt. Die Messungen von N-WT und N-(+7)Ala wurden mit einem Multimode SPM Mikroskop (Veeco) im *Tapping Mode* durchgeführt. Für die Probenpräparationen wurden 10 μ l Probe auf frisch gespaltene Glimmerplättchen, die auf AFM-Probenplättchen (Ø 15 mm, Ted Pella) aufgeklebt waren, aufgetragen und für 3 min inkubiert. Nach Entfernen der Flüssigkeit wurde die Probe dreimal mit je 100 μ l Millipore-gefiltertem Wasser gewaschen und luftgetrocknet. Die AFM-Aufnahmen wurden an der Luft mit Siliconnitrid-Cantilevern (NCH-50, Nanosensors; Spitzenradius ~7 nm) und einer Aufnahme-geschwindigkeit von 1,5 Hz durchgeführt. Die Fibrillenhöhe und –breite wurde mittels NANOSCOPE *analysis software* bestimmt.

3.10 Bestimmung der löslichen Fraktion des Fibrillenansatzes mittels RP-HPLC

Für die Bestimmung des Anteils an nicht fibrilliertem Protein wurde den Fibrillierungsansätzen nach bestimmten Inkubationszeiten Aliquots entnommen und mit sterilem Wasser auf 0,5 mg/ml verdünnt. Die so verdünnten Proben wurden dann, zur Abtrennung der gebildeten Fibrillen, für 1 h bei 260.000 g (optimaTM TLX Ultrazentrifuge) zentrifugiert. Es wurden jeweils 100 μ l vom Überstand auf eine (EC125/4 Nucleosil 00-5 C18)-Säule (Machery-Nagel) oder eine Nucleosil 5u C18 (125 x 4 mm) (Phenomenex)

geladen. Die Proteine eluierten durch einen aufsteigenden ACN-Gradienten (von 0 auf 100 % in 90 min). Die monomere Spezies wurde bei ca. 32-33 % ACN eluiert. Die Fläche der erhaltenen Peaks entsprach der aufgetragenen Proteinmenge. Dadurch konnten die aufgetragenen Proteinmengen mittels einer Eichgerade bestimmt werden. Für die Erstellung der Eichgerade wurden Proteinmengen von 0,005 mg bis 0,2 mg auf die Säule aufgetragen und den Peakflächen zugeordnet.

3.11 Präparation der seeds

Um eine Fibrillierung mit *seeds* zu induzieren, wurden die verschiedenen Proteine, wie in Abschnitt 3.8 beschrieben, inkubiert. Nach Erreichen des Plateaus der ANS-Fluoreszenz (siehe Abschnitt 3.9.1) wurden die Fibrillen bei 260.000 g (optimaTM TLX Ultrazentrifuge) für 1 h bei 10°C abzentrifugiert. Die Inkubationszeit variierte dabei je nach Protein und auch je nach Proteinreinigungscharge. Das gelartige Pellet wurde über Nacht bei 6°C mit Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach erneutem Waschen wurden die Fibrillen in ca. 300 µl Phosphat-Puffer aufgenommen und 5x (3x 20 sec) mit einem UP200S Ultraschallprozessor (Dr. Hielscher, Stuttgart) bei einer Amplitude und einem Pulsbereich von jeweils 50 % behandelt. Zwischen den Ultraschallbehandlungen wurde die Fibrillenlösung auf Eis gekühlt und leicht abzentrifugiert. Die *seeds* wurden erneut für 1 h bei 260000 g (optimaTM TLX Ultrazentrifuge) abzentrifugiert und in 30 µl Fibrillierungspuffer resuspendiert.

3.11.1 Bestimmung der seed-Konzentration

Die eingesetzte Proteinmenge vor der Fibrillierung wurde mittels UV-Absorption gemessen. Nach der Fibrillenbildung wurde die Proteinmenge der löslichen, nicht fibrillierten Fraktion durch UV-Absorption und RP-HPLC analysiert. Während der Fibrillierung wurden Aliquots für ANS-Fluoreszenz-Messungen entnommen (siehe Abschnitt 3.8). Zur Bestimmung der *seed*-Konzentration wurde die Menge an eingesetztem Protein durch die Probenentnahmen und den Anteil an löslichem Protein korrigiert (Abb. 3.1). Die so erhaltene Proteinmenge wurde zu *seeds* verarbeitet (siehe Abschnitt 3.11). Eventuelle Verluste, welche durch Pipettieren oder durch Adsorption des Proteins an Gefäßwänden entstanden waren, wurden bei dieser Berechnung nicht berücksichtigt. Das *seed*-Pellet wurde in 5 mM KH₂PO₄ pH 7,5, 150 mM NaCl aufgenommen und, wie im Text oder den Legenden angegeben, zum Fibrillierungsansatz pipettiert.



Abb. 3.1: Exakte Bestimmung der seed-Konzentration

3.12 Chemische Stabilität der Fibrillen

Fibrillen besitzen eine sehr große Stabilität gegenüber Temperaturschwankungen sowie proteolytischem Abbau. Um die chemische Stabilität der Fibrillen zu bestimmen, wurden die Fibrillen mit GdmSCN solubilisiert. Nach Inkubation bei 37°C wurden die Fibrillenansätze 1 h bei 260.000 g (optimaTM TLX Ultrazentrifuge) zentrifugiert. Das Fibrillenpellet wurde in 100 μ l einer 4 M Guanidinhydrochloridlösung resuspendiert und in sieben Aliquots aufgeteilt. Nach erneuter Zentrifugation der Proben wurde das Pellet mit ca. 30 μ l Fibrillierungspuffer (5 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl pH 7,5) mit 0, 1, 2, 3, 4, 5 bzw. 6 M Guanidiniumthiocyanat inkubiert. Die Proben wurden bei 50°C unter Schütteln (600 rpm) für 16 Stunden oder bei Raumtemperatur für sechs Stunden in einem Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde der solubilisierte Anteil durch erneute Zentrifugation von den nicht solubilisierten Fibrillen getrennt und durch RP-HPLC quantitativ untersucht.

Es konnten nicht alle Fibrillen solubilisiert werden. Durch eine zweite Solubilisierung der beim ersten Ansatz nicht aufgelösten Fibrillen sollte geklärt werden, ob während der Inkubation mit GdmSCN ein Gleichgewicht zwischen solubilisierten und nicht solubilisierten Fibrillen entsteht. Dazu wurden die verbliebenen Fibrillen erneut mit 20-30 µl 6 M Guanidiniumthiocyanat bei 50 °C und unter Schütteln (600 rpm) über Nacht inkubiert. Die lösliche Fraktion nach einer Zentrifugation wurde mittels RP-HPLC quantitativ analysiert. Es sollte auch die Menge an solubilisierten Fibrillen in Abhängigkeit von der Zeit untersucht werden. Für die kinetischen Studien wurde das Fibrillenpellet in 6 M Guanidiniumthiocyanat bei 50 °C unter Schütteln (600 rpm) inkubiert. Die Proben wurden nach verschiedenen Zeitpunkten entnommen (ca. 15 μ l) und 1 h bei 260000 g (optimaTM TLX Ultrazentrifuge) zentrifugiert. Die Analyse der löslichen Fraktion erfolgte ebenfalls mittels RP-HPLC.

3.13 Kurvenanpassung der ANS-Fluoreszenz-Messwerte

Für eine quantitative Analyse der Fibrillierungskinetiken wurden verschiedene Funktionen mit Hilfe des Programms *SigmaPlot* an die Messwerte der ANS-Fluoreszenz angepasst. Zurzeit ist der Mechanismus der Fibrillenbildung noch weitestgehend unverstanden, deswegen erfassen die hier verwendeten Funktionen komplexe Abläufe einer Fibrillierung wahrscheinlich nicht vollständig. Auch lassen sich mit den kinetischen Konstanten, die aus den Modellen abgeleitet werden, keine tatsächlich ablaufenden molekularen Mechanismen beschreiben. Dennoch können mit den kinetischen Konstanten die verschiedenen Einflüsse auf die Fibrillenbildung quantifiziert werden.

3.13.1 Fibrillierung in Gegenwart von seeds

Bei der Fibrillenbildung kann man vereinfacht die Fibrillierungsreaktion durch die Umwandlung des gelösten Proteins (Zustand A) in fibrilliertes Protein (Zustand B) beschreiben. In Gegenwart von seeds hängt die Reaktionsgeschwindigkeit von der Menge an eingesetzten seeds ab. Die Bildung von neuen Fibrillierungskeimen aus nicht fibrilliertem Protein wird bei dieser Betrachtung vernachlässigt, da diese Reaktion sehr viel langsamer abläuft als die Verlängerung der zugegebenen seeds. Durch die Annahme, dass die gemessene ANS-Fluoreszenzintensitäten proportional der Masse an fibrilliertem Protein ist, wurden die Fibrillierungskinetiken mit Hilfe der Gleichung 3 ausgewertet. Die Kinetiken wurden durch die Bestimmung der 1. Ableitung von Gleichung 3 über die initialen Fibrillierungsgeschwindigkeiten (Gleichung 4) verglichen.

$$c = c_0 + g(1 - e^{-ft})$$
 Gl. 3

$$dc/dt = gfe^{-ft}$$
 Gl. 4

mit c	ANS-Fluoreszenzsignal: proportional zur Fibrillenmasse	
c ₀	Ausgangs-ANS-Fluoreszenzsignal: proportional zur eingesetzten Fibrillenmass	
	(seed-Menge)	
t	Zeit	
g	Konstante: proportional zur eingesetzten Menge an gelöstem Protein und zur	
	gebildeten Fibrillenmasse	
f	Konstante: proportional zur eingesetzten seed-Menge	
gf	initiale Fibrillierungsgeschwindigkeit	

3.13.2 Fibrillierung ohne zugegebene seeds

Bei der Fibrillierung ohne die Zugabe von *seeds* hängt die Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration des gelösten Proteins ab, da erst Fibrillierungskeime gebildet werden müssen. Durch die Bildung dieser Keime kann am Anfang der Fibrillierungskinetik eine *lag phase* beobachtet werden. Für eine vergleichbare Aussage der gemessenen Fibrillierungskinetiken wurde die logistische Funktion, wie in Gleichung 5 beschrieben, verwendet.

$$c = \frac{a}{1 + e^{-\left(\frac{1 \times a_0}{b}\right)}}$$
Gl. 5

mit

c	ANS-Fluoreszenzsignal: proportional zur Fibrillenmasse
a	max. ANS-Fluorezenzsignal: proportional zur eingesetzten Proteinmenge
t	Zeit
b	Konstante: indirekt proportional zur Fibrillierungsgeschwindigkeit
X ₀	Konstante zur Berechnung des sigmoiden Kurvenverlaufes

3.14 Biotinylierung von Proteinen und Fibrillen

Zur Biotinylierung von Protein, *seeds* und Fibrillen wurde das *Biotin Labeling Kit* (Roche) verwendet. Dazu wurde Biotin-7-NHS in DMSO bis zu einer Endkonzentration von 20 mg/ml gelöst. Lyophilisiertes Protein (1 mM entspricht 1,8 mg/120 µl) wurde wie zur Fibrillierung in 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl pH 7,4 aufgenommen und mit 8 µl der Biotin-DMSO-Lösung versetzt. Die Proteinlösung wurde 2-3 h bei Raumtemperatur und unter leichtem Schütteln (300 rpm) inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz gegen 200 ml Phosphat-Puffer über Nacht dialysiert. Der Dialysepuffer wurde einmal gewechselt. Zur Fibrillierung wurde das biotinylierte Protein, wie in 3.8 beschrieben, inkubiert. Zur Kontrolle der Biotinylierung wurde ein Western Blot durchgeführt.

3.15 Westernblot

Nach SDS-PAGE wurden die Proteine durch Elektrotransfer auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet (ca. 1,5 h, 1 mA pro cm² Membran). Nach dem Elektrotransfer wurde die Membran in einer 2 % Ponceau-Lösung für 2 min inkubiert. Die Proteinbanden wurden durch mehrmaliges Waschen mit bidestilliertem Wasser sichtbar. Die Membran wurde mit einer PBS-Tween-Lösung mit 5 % Milchpulver ca. zwei Stunden bei Raumtemperatur abgesättigt. Anschließend wurde die Membran 2 h bei Raumtemperatur mit der Streptavidin-POD-Lösung (Roche) (1:4000 verdünnt) in PBS-Tween mit 2,5 % Milchpulver inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen (4 x 5-10 min) mit PBS-Tween-Lösung wurde die Membran mit Hilfe eines ECLTM-Western *Blotting Detection Reagents* (Amersham Biosciences) behandelt und danach der Western Blot entwickelt

4 Ergebnisse

In der hier vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit der N-terminalen Domäne des poly-(A)-bindenden Proteins (PABPN1) gearbeitet, da das gesamte Protein eine erhöhte Tendenz zur amorphen Aggregation besitzt (Dissertation Till Scheuermann, 2003). Zur Reinigung der rekombinant hergestellten Proteine wurde ein N-terminal gelegener Histidin-*Tag* verwendet, welcher die Fibrillenbildung nachweislich nicht beeinflusst (Scheuermann *et al.*, 2003). Die N-terminale Domäne (N-WT) besteht mit dem His-*tag* aus 144 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 14,2 kDa. Die Polyalaninsequenz mit zehn Alaninen befindet sich direkt nach dem Startmethionin. Die N-(+7)Ala-Variante, bei welcher die Alaninsequenz um sieben auf 17 Alanine verlängert ist, hat ein Molekulargewicht von 14,7 kDa. CD-Analysen deuteten auf einen geringen Anteil an Sekundärstrukturelementen in der N-terminalen Domäne hin. Die N-(+7)Ala-Variante besitzt jedoch gegenüber dem Wildtyp einen höheren Anteil an α -helicalen Strukturelementen (Scheuermann *et al.*, 2003).

4.1 Einfluss von seeds auf die Fibrillenbildung von N-PABPN1

Die Fibrillenbildung wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes ANS (8-Anilino-1naphthalensulfonsäure) analysiert. Durch die Bindung von ANS an die Fibrillen verschiebt sich das Fluoreszenzmaximum von 520 nm auf 480 nm, gleichzeitig erhöht sich die Fluoreszenzintensität (Scheuermann *et al.*, 2003). Vom Fibrillierungsansatz mit einer Proteinkonzentration von 1 bis 2 mM wurden nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten bei 37°C Proben entnommen und mit ANS versetzt. Die Fluoreszenz wurde bei 480 nm nach einer Anregung bei 370 nm gemessen. Als Fibrillenkeime (*seeds*) wurden durch Ultraschall zerkleinerte Fibrillen verwendet.

Die in den nächsten Abschnitten beschriebenen *seed*-Mengen wurden immer in Gewichtsprozent (w/v) eingesetzt. Zur Vereinfachung werden sie in den folgenden Kapiteln in "%" angegeben.

4.1.1 Einfluss von homologem seeding

In früheren Arbeiten wurde beobachtet, dass *seeds* die Fibrillierung von N-(+7)Ala beschleunigen (Scheuermann *et al.*, 2003). Ein homologes *seeding* führt zur Eliminierung der *lag phase* (Abb. 4.1A). Der Begriff "homolog" bedeutet, dass für die Fibrillierung von N-WT-Protein ausschließlich N-WT-*seeds* und für N-(+7)Ala ausschließlich N-(+7)Ala-*seeds* eingesetzt wurden.

Die Fibrillierungen von N-WT- und N-(+7)Ala zeigten nach Zugabe von Fibrillenkeimen Unterschiede in den Kinetiken (Abb. 4.1A-B). Die N-WT-Fibrillierung verlief sehr viel langsamer als die N-(+7)Ala-Fibrillierung. Während die Fibrillenbildung von N-(+7)Ala bereits nach wenigen Tagen das Plateau erreichte, konnte bei N-WT selbst nach 100 Tagen Inkubation kein Plateau beobachtet werden.

Zur Bestätigung der ANS-Messungen wurde parallel dazu der Anteil an löslichem Protein durch RP-HPLC bestimmt (Abb. 4.1C-D). Die Abnahme an löslichem Protein während der Fibrillierung war proportional zur Zunahme der ANS-Fluoreszenz. Die Analyse des löslichen Proteinanteils im Fibrillierungsansatz bestätigte die Daten der ANS-Messungen, dass N-WT-Protein langsamer fibrillierte als N-(+7)Ala. In Abbildung 4.1C ist zu sehen, dass 80 % des eingesetzten, löslichen N-(+7)Ala-Proteins in die Fibrillen eingebaut wurde. Dagegen bildeten beim N-WT innerhalb von 50 Tagen nur 40 % des Proteins Fibrillen aus (Abb. 4.1D).

Die Experimente zeigten, dass die Verlängerung der Polyalaninsequenz nicht nur einen Effekt auf die Bildung von Nukleationskeimen hat. Die Anzahl der Alanine beeinflusst ebenfalls die Anlagerung der Monomere an die Fibrillen. Eine Möglichkeit wäre auch, dass die verlängerte Polyalaninsequenz eine veränderte Fibrillenstruktur verursacht. N-(+7)Ala-*seeds* könnten dadurch reaktiver sein als die Fibrillenkeime des N-WT.



Abb. 4.1: Fibrillierungskinetiken in Gegenwart von *seeds* von N-(+7)Ala (A, C) und N-WT (B, D) A-B: Fibrillierungskinetiken gemessen durch ANS-Fluoreszenzintensität bei 480 nm in Gegenwart von *seeds* (schwarz) und ohne *seeds* (blau). C-D: Abnahme von löslichem Monomer (grün) im Vergleich zum Anstieg der ANS-Fluoreszenz (schwarz) in Gegenwart von *seeds*. Die Monomerkonzentration vor der Inkubation wurde auf 100 % gesetzt. Es wurde jeweils 1 mM Protein mit 0,1 % *seeds* bei 37°C inkubiert.

4.1.2 Einfluss der seed-Konzentration

Um den Einfluss von *seeds* auf die Fibrillenbildung genauer zu charakterisieren, wurden verschiedene Mengen an *seeds* mit löslichem N-(+7)Ala-Protein inkubiert. Dabei konnte eine Abhängigkeit der initialen Fibrillierungsgeschwindigkeit von der eingesetzten *seed*-Menge beobachtet werden (Abb. 4.2). Durch die Verdoppelung der eingesetzten *seed*-Menge erhöhte sich die initiale Fibrillierungsgeschwindigkeit ebenfalls um den Faktor 2 (Abb. 4.2B). Die gebildete Fibrillenmasse, welche proportional zur maximalen Fluoreszenzintensität war, wurde aber durch die eingesetzten Fibrillenkeime nicht beeinflußt (Abb 4.2A).



Abb. 4.2: Einfluss der *seed*-Konzentration auf die Fibrillierung von N-(+7)Ala. 1 mM Protein bei 37°C inkubiert mit 0,1 % (schwarz), 0,2 % (blau) und 0,4 % (grün) N-(+7)Ala-*seeds*. A: ANS-Fluoreszenzmessungen, B: initiale Fibrillierungsgeschwindigkeit (pro Tag) bestimmt aus der ANS-Fluoreszenz (siehe Abschnitt 3.13.1).

Zur Kontrolle der Fluoreszenzdaten wurden die inkubierten Proteinproben unter dem Elektronenmikroskop (EM) analysiert. N-(+7)Ala-Fibrillen, welche im EM keine Unterschiede zu N-WT-Fibrillen aufwiesen, hatten einen Durchmesser von ca. 6-8 nm und eine Länge von bis zu 2 μ m (Abb. 4.3A). Die durch Ultraschall zerkleinerten *seeds* waren ca. 20–70 nm lang (Abb. 4.3B). Eine Verlängerung der Fibrillenkeime durch die Anlagerung von löslichem Protein wurde nach Inkubation mittels Elektronenmikroskop beobachtet. Die so entstandenen Fibrillen besaßen ebenfalls einen Durchmesser von 6-8 nm.

Abbildung 4.3 (B-E) zeigt, dass die *seed*-Verlängerung von der Menge an eingesetzten *seeds* abhängig war. Bei einer Koinkubation von 0,1 % *seeds* mit 1 mM N-(+7)Ala-Protein wurde eine deutlichere Verlängerung der Fibrillenkeime beobachtet. Die Fibrillen, die aus den zugegebenen *seeds* resultieren, erreichten eine Länge von ca. 300 nm. Bei 0,2 % und 0,4 % *seeds* wurden die eingesetzten *seeds* auf ca. 150 nm bzw. 100 nm verlängert. Bei Inkubation der N-WT-Domäne mit N-WT-*seeds* konnte ebenfalls eine Verlängerung der *seeds* in Abhängigkeit von der *seed*-Menge beobachtet werden. Die Verlängerung der Fibrillenkeime war aber geringer als bei der N-(+7)Ala-Variante.



Abb. 4.3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Fibrillen bzw. seeds. A: 1 mM N-(+7)Ala-Protein ohne seeds inkubiert, Fibrillen nach 30 Tagen bei 37°C. B: N-(+7)Ala-seeds vor der Inkubation mit löslichem Protein. C: 0,1 % N-(+7)Ala-seeds inkubiert mit 1 mM N-(+7)Ala-Protein nach 20 Tagen bei 37°C. D: 0,2 % N-(+7)Ala-seeds inkubiert mit 1 mM N-(+7)Ala-Protein nach 20 Tagen bei 37°C. E: 0,4 % N-(+7)Ala-seeds inkubiert mit 1 mM N-(+7)Ala-Protein nach 20 Tagen bei 37°C. F: 0,4 % N-(+7)Ala-seeds inkubiert mit 0,4 % N-(+7)Ala-seeds. Nach Erreichen eines Plateaus des ANS-Signals wurden die entstandenen Fibrillen (verlängerte seeds) erneut mit 1 mM N-(+7)Ala-Protein 20 Tage bei 37°C inkubiert. Die Balken entsprechen 250 nm.

Die verlängerten *seeds* waren wesentlich kürzer als Fibrillen aus ungeseedeten Ansätzen. Daraus lässt sich vermuten, dass die Fibrillenlänge neben der *seed*-Menge auch durch die Proteinkonzentration beeinflusst wird.

In einem ungeseedeten Fibrillenansatz bildet sich wahrscheinlich eine sehr viel kleinere Anzahl an Fibrillenkeimen, als bei Fibrillierungen mit zusätzlichen *seeds* vorhanden sind. Es liegen daher weniger aktive Enden zum Anlagern vor und die Monomere können so längere Fibrillenstrukturen bilden. Bei gleicher Proteinkonzentration bestimmt also die Anzahl der Keime die Länge der Fibrillen.

Zur Bestätigung, dass das Längenwachstum der *seeds* abhängig von der eingesetzten Proteinmenge war, wurde zu einem Fibrillierungsansatz mit 0,4 % *seeds* nach Erreichen des Plateaus in der Fibrillierungskinetik erneut 1 mM lösliches Protein dazu gegeben (Abb. 4.3F). Die vorhandenen Fibrillenkeime konnten so durch Anlagerung des löslichen Proteins eine Länge von mehr als 1 µm erreichen, analog zu den Fibrillen in Abwesenheit von *seeds*.

4.1.3 <u>Einfluss von heterologem seeding</u>

Neben einem homologen *seeding* sollte auch der Einfluss von heterologem *seeding* auf die Fibrillierung untersucht werden. Der Begriff "heterolog" bedeutet, dass N-WT-*seeds* für die Fibrillierung von N-(+7)Ala-Protein eingesetzt wurden. Die Versuche mit heterologem *seeding* wurden nur mit der N-(+7)Ala-Variante durchgeführt, da N-WT schon beim homologen *seeding* sehr viel langsamer fibrillierte als N-(+7)Ala (siehe Abschnitt 4.1.1).

In Abbildung 4.4A ist zu sehen, dass die N-(+7)Ala-Fibrillierung auch mit Fibrillenkeimen von N-WT induziert werden konnte. Beim *cross-seeding* wurde die Fibrillenbildung genauso wie beim *seeding* in Abhängigkeit von der eingesetzten *seed*-Menge beeinflusst. Die Menge an gebildeten Fibrillen war analog zum homologen *seeding* unabhängig von der verwendeten Anzahl der Fibrillenkeime. Unter dem Elektronenmikroskop war kein Unterschied zwischen den verlängerten Fibrillen, die aus heterologem oder homologem *seeding* hervorgegangen waren, erkennbar (Abb. 4.4B). Die Fibrillen von den *cross-seeding* Experimenten hatten einen Durchmesser von 6-8 nm. Die Länge war ebenfalls von der eingesetzten *seed*-Menge und der eingesetzten Proteinkonzentration abhängig.



Abb. 4.4: Einfluss der *seeds*-Konzentration beim *cross-seeding* auf die Fibrillierung von N-(+7)Ala. A: ANS-Fluoreszenz von 1 mM Protein, welches bei 37°C mit 0,1 % (schwarz), 0,2 % (blau) und 0,4 % (grün) N-WT-*seeds* inkubiert wurde. B: Elektronenmikroskopische Aufnahme nach einer 20-tägigen Inkubation von N-(+7)Ala mit 0,2 % N-WT-*seeds*. Der Balken entspricht 100 nm.

In Abbildung 4.5 ist erkennbar, dass sich die initiale Geschwindigkeit der Fibrillierung unabhängig von der Art der Fibrillenkeime proportional zur Menge der eingesetzten *seeds* erhöhte. Im direkten Vergleich war die homologe Fibrillierung von N-(+7)Ala aber ungefähr doppelt so schnell wie die Fibrillenbildung nach Zugabe von N-WT-*seeds* (Abb. 4.5 & Tab. 4.1). Dies deutet daraufhin, dass N-WT und N-(+7)Ala unterschiedliche Fibrillenstrukturen ausbilden. Bei identischen Strukturen der *seeds* von N-WT und N-(+7)Ala wäre die initiale Fibrillierungsgeschwindigkeit unabhängig von der Art der verwendeten *seeds* gewesen.



Abb. 4.5: Vergleich der initialen Fibrillierungsgeschwindigkeiten (pro Tag) von 1 mM N-(+7)Ala-Domäne nach Zugabe verschiedener Mengen an N-(+7)Ala-seeds (homologes seeding) (schwarz) bzw. N-WT-seeds (cross-seeding) (weiß).

Die relativ großen Fehlerbalken bzw. Standardabweichungen in Abbildung 4.5 und in Tabelle 4.1 ergaben sich durch die verschiedenen *seed*-Präparationen. Die kleinen Fibrillenkeime wurden mittels Ultraschall mechanisch aus langen Fibrillen gewonnen. Verschiedene Präparationen können sich dabei hinsichtlich ihrer Aktivität bzw. Anzahl der aktiven Enden unterscheiden. Die gleiche Massenkonzentration an *seeds* kann so, abhängig von der Präparation, eine unterschiedliche Anzahl an aktiven Enden besitzen. Der Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen an *seeds* auf die Fibrillierung wurde deshalb stets mit der gleichen *seed*-Präparation gemessen, so dass ein Vergleich zwischen den unterschiedlichen *seed*-Mengen möglich war.

 Tabelle 4.1: Vergleich der initialen Fibrillierungsgeschwindigkeiten von 1 mM N-(+7)Ala-Protein nach Zugabe

 unterschiedlicher Mengen an homologen bzw. heterologen seeds.

seed-Konzentration	initiale Fibrillierungsgeschwindigkeit (pro Tag)		
in Gewichtsprozent	homologes <i>seeding</i>	heterologes seeding	
0,1	6,0 (± 2,6)	2,9 (± 0,4)	
0,2	11,1 (± 3,7)	5,8 (± 0,6)	
0,4	19,6	10,1 (± 2,1)	

4.1.4 Einfluss der Konzentration des löslichen Proteins

In Arbeiten von Till Scheuermann wurde bereits beobachtet, dass eine Erhöhung der Proteinkonzentration die lag phase der Fibrillierung verkürzt (Scheuermann et al., 2003). Deshalb sollte der Effekt der Proteinkonzentration auf die Fibrillenbildung nach Zugabe von Fibrillenkeimen untersucht werden. Die maximale Fluoreszenzintensität, welche proportional zur gebildeten Fibrillenmenge war, wurde durch die Proteinkonzentration beeinflusst (Abb. 4.6A). Eine Steigerung der Konzentration an löslichem Protein um das Doppelte führte zu einer Verdoppelung der maximalen Fluoreszenzintensität. Die initiale Fibrillierungsgeschwindigkeit war direkt abhängig von der gebildeten Fibrillenmasse, welche proportional eingesetzte maximalen Fluoreszenzintensität ist. Dadurch beeinflusst die zur Proteinkonzentration auch die hier berechnete initiale Fibrillierungsgeschwindigkeit (Abb. 4.6B).



Abb. 4.6: Einfluss der Proteinkonzentration auf die Fibrillierung von N-(+7)Ala: 0,5 mM Protein (schwarz) und 1 mM Protein (rot) bei 37°C mit 0,1 % N-(+7)Ala-*seeds* inkubiert. **A:** maximale Fluoreszenzintensitäten (proportional zur gebildeten Fibrillenmenge) **B:** initiale Fibrillierungsgeschwindigkeiten (pro Tag).

4.2 Einfluss der Länge der Polyalaninsequenz auf die Fibrillenstruktur

Die Fibrillierungskinetiken von N-WT und N-(+7)Ala wiesen, wie in dem vorherigen Abschnitt erläutert, Unterschiede auf. Die Experimente durch homologes und heterologes *seeding* lieferten ebenfalls einen Hinweis darauf, dass die *seeds* von N-WT und N-(+7)Ala unterschiedliche Strukturen besitzen. Bei der Analyse mittels Elektronenmikroskopie konnten zwischen N-WT- und N-(+7)Ala-Fibrillen allerdings keine strukturellen Unterschiede beobachtet werden (Abb. 4.7A-D).

Zur genaueren Strukturbestimmung wurden die Fibrillen durch ein Rasterkraftmikroskop (AFM) analysiert (Abb. 4.7E-F). Aufgrund der Arbeitsweise des Rasterkraftmikroskops wird die Darstellung der horizontalen Ebene verbreitert (Wong *et al.*, 1998). Die vertikalen Abstände sind davon nicht beeinflusst, so dass der Durchmesser der Fibrillen mit 6-8 nm bestätigt werden konnte. Bei der Analyse konnten unterschiedliche Strukturen der N-(+7)Ala-Fibrillen gegenüber den N-WT-Fibrillen festgestellt werden. Die N-WT-Fibrillen besaßen eine Perlenschnur-artige Oberfläche, welche eventuell durch Drehungen um die eigene Achse entstand (Abb. 4.7E). Die Struktur der N-(+7)Ala-Fibrillen zeigten dagegen eine glatte Oberfläche (Abb. 4.7F).



Abb. 4.7: Elektronenmikroskopische und AFM-Aufnahmen von Fibrillen von N-WT (A, C, E) und N-(+7)Ala (B, D, F). A-D: EM-Aufnahmen der Fibrillen. Die Balken entsprechen 200 nm (A, B) bzw. 50 nm (C, D). E-F: AFM-Aufnahmen der Fibrillen. Die Balken entsprechen 250 nm.

Eine genauere Untersuchung der Struktur der Fibrillenoberflächen bestätigte die Vermutung, dass N-WT und N-(+7)Ala unterschiedliche Fibrillen ausbilden. In Abbildung 4.8 ist entlang der eingezeichneten Linie die Oberfläche einer N-WT- bzw. N-(+7)Ala-Fibrille gezeigt. Bei N-(+7)Ala variierte die Höhe innerhalb einer Fibrille kaum. Die Fibrillenoberfläche erschien gleichmäßiger. Die Oberfläche der N-WT-Fibrillen war dagegen durch Peaks charakterisiert. Aufgrund der Gleichmäßigkeit und ähnlichen Breite der Peaks könnte sie durch eine Drehung der Fibrillen um die eigene Achse entstanden sein. Aufgrund der einheitlichen Abstände werden die Peaks im Folgenden als Segmente bezeichnet.



Abb. 4.8: Oberflächenstrukturanalyse der Fibrillen A: N-WT- und **B:** N-(+7)Ala-Oberflächenstruktur entlang der weißen Linie im jeweiligen Bild von links nach rechts aufgezeichnet. Horizontale Balken entsprechen 50 nm. Vertikale Balken entsprechen 1 nm und geben damit die Höhe bzw. den Durchmesser der Fibrillen an.

Diese Eigendrehung könnte bei Fibrillen der N-(+7)Ala-Variante entweder nicht so stark ausgeprägt oder nicht vorhanden sein. Die Segmente bei N-WT hatten eine Breite von 27,3-43 nm im Abstand von ca. 4 nm (Abb. 4.9A). Im Durchschnitt besaßen die Segmente eine Breite von 35,2 nm. Die Höhe der Segmente variierte zwischen 0,7 und 1,8 nm, wobei die einzeln gemessenen Höhen mit ähnlicher Wahrscheinlichkeit auftraten (Abb. 4.9B).



Abb. 4.9: AFM-Analyse von 21 Oberflächenpeaks der N-WT-Fibrillen. Häufigkeit der unterschiedlichen A: Breiten und B: Höhen der Peaks. Die Fibrillenhöhe und –breite wurde mittels NANOSCOPE *analysis software* bestimmt.

4.2.1 <u>Beeinflusst die seed-Struktur die Fibrillenstruktur?</u>

In weiteren Experimenten sollte analysiert werden, welche Fibrillenstruktur sich in Gegenwart von heterologen *seeds* ausbildet, die Struktur der *seeds* oder die der löslichen Variante. Die gebildeten Fibrillen wurden dazu mittels AFM analysiert. Es konnte nicht eindeutig festgestellt werden, wodurch die Fibrillenstruktur diktiert wurde. Bestimmt der *seed* die Struktur, dann würde N-(+7)Ala-Protein mit N-WT-*seeds* eine Ketten-ähnliche und N-WT mit N-(+7)Ala-*seeds* eine glatte Struktur ausbilden. Die vorwiegende Anzahl der beobachteten Fibrillen besaß allerdings eine glatte Fibrillenoberfläche unabhängig von der Art der *seeds* oder der zu fibrillierenden Variante (Abb. 4.10). Es wurden keine Hinweise darauf gefunden, dass die *seeds* die Struktur bestimmten. Es konnte aber auch nicht geklärt werden, ob allein die lösliche Variante die Fibrillenstruktur bedingt. Eventuell waren die so erhaltenen Fibrillen zu kurz, um eine Ketten-ähnliche Struktur auszubilden, wie sie bei N-WT-Fibrillen ohne Zugabe von *seeds* beobachtet werden konnte (Abb. 4.7E).



Abb. 4.10: AFM-Analyse von heterogenen Fibrillen. Die Varianten wurden bei 37°C in Gegenwart von *seeds* inkubiert. **A:** N-(+7)Ala mit N-WT-*seeds* **B:** N-WT mit N-(+7)Ala-*seeds*. Die Balken entsprechen 250 nm.

4.3 Stabilität der Fibrillen

4.3.1 Solubilisierung der Fibrillen mit Guanidiniumthiocyanat bei RT

Durch AFM-Analysen konnten unterschiedliche Strukturen von N-WT- und N-(+7)Ala-Fibrillen beobachtet werden. In weiteren Experimenten sollte analysiert werden, ob die Strukturunterschiede auch mit einer veränderten Stabilität der Fibrillen einhergehen. Die Fibrillen wiesen eine hohe Resistenz gegenüber Guanidinhydrochlorid (GdnHCl) auf, wie in Abschnitt 1.4.4 bereits erwähnt wurde. In den folgenden Versuchen wurde die Stabilität der Fibrillen gegenüber einem noch stärkeren Denaturierungsmittel, Guanidiniumthiocyanat (GdmSCN), untersucht. Die bei 37°C gewachsenen Fibrillen wurden sechs Stunden bei Raumtemperatur (RT) in Guanidiniumthiocyanat mit Konzentrationen von 0-6 M inkubiert. Die Proben wurde anschließend anhand von SDS-PAGE untersucht (Abb. 4.11). Am oberen Gelrand sind die nicht aufgelösten Fibrillen zu sehen. Aufgrund der Stabilität gegenüber SDS laufen die Fibrillen nicht in das Gel ein und bleiben so in den Taschen liegen. Die monomere Spezies beider Varianten läuft in Höhe der 25 kDa-Bande. Mit steigender GdmSCN-Konzentration ist bei N-WT sowie N-(+7)Ala deutlich eine erhöhte Menge an Monomer im Gel erkennbar. Bei den N-(+7)Ala-Fibrillen befanden sich auch mit 6 M GdmSCN noch Fibrillen im Sammelgel (Abb. 4.11A).



Abb. 4.11: Nachweis der solubilisierten Monomere nach Inkubation der Fibrillen mit GdmSCN von A: N-(+7)Ala und B: N-WT. Die Fibrillen wurden 3 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Proben mittels NaDOC gefällt und durch 14 %ige SDS-PAGE aufgetrennt. Dabei entspricht M dem Marker und 0M–6M der jeweiligen Konzentration an GdmSCN.

Für eine quantitative Analyse des aus den Fibrillen gelösten Proteins wurden die Proben nach Inkubation zentrifugiert. Die lösliche Fraktion wurde durch RP-HPLC untersucht. In Abbildung 4.12 wurde die Menge an gelöstem Protein gegen die Konzentration an Denaturierungsmittel aufgetragen. Die Proteinmenge in den Fibrillen vor der Solubilisierung wurde auf 100 % gesetzt. Bis 2 M GdmSCN waren beide Fibrillentypen gleich stabil. Bei höheren Konzentrationen besaßen N-WT-Fibrillen eine geringere Stabilität als N-(+7)Ala-Fibrillen (Abb. 4.12A). Die maximale Auflösung der N-WT-Fibrillen wurde bereits mit 4 M GdmSCN erreicht. Bei den N-(+7)Ala-Fibrillen wurde bis 6 M GdmSCN eine kontinuierlich steigende Menge an solubilisiertem Monomer beobachtet. Unter diesen Bedingungen wurden von den Fibrillen jeweils nur maximal 40-50 % gelöst. Eine höhere Konzentration des Denaturierungsmittels konnte aufgrund der Löslichkeit von GdmSCN nicht verwendet werden.

In der Literatur gibt es Hinweise, dass die Temperatur während der Fibrillenbildung einen Einfluss auf die Stabilität der Fibrillen hat (Pedersen *et al.*, 2006a). Deswegen wurde N-(+7)Ala-Protein zur Fibrillierung bei 60°C inkubiert. Dennoch wurde keine veränderte Stabilität gegenüber Fibrillen, welche bei 37°C inkubiert wurden, beobachtet (Abb. 4.12B).



Abb. 4.12: Auflösung der Fibrillen bei RT. RP-HPLC-Analysen der solubilisierten Fibrillen nach 6 h Inkubation gegen GdmSCN A: N-(+7)Ala- (grün) bzw. N-WT-Fibrillen (schwarz), welche sich bei 37°C gebildet hatten. B: N-(+7)Ala-Fibrillen, welche sich bei 37°C (grün) bzw. 60°C (blau) gebildet hatten.

4.3.2 Solubilisierung der Fibrillen mit Guanidiniumthiocyanat bei 50°C

Um eine bessere Auflösung zu erreichen, wurden die Fibrillen 16 Stunden bei 50°C mit GdmSCN inkubiert (Abb. 4.13A). Bei GdmSCN-Konzentrationen unterhalb von 3 M waren die Stabilitätsunterschiede zwischen den beiden Fibrillentypen am deutlichsten erkennbar. Die maximale Auflösung der N-WT-Fibrillen konnte bei dieser Temperatur bereits mit 1 M erreicht werden. Bei den N-(+7)Ala-Fibrillen dagegen wurde wieder ein kontinuierlicher Anstieg der Ausbeute an gelöster Spezies festgestellt. Die Fibrillen konnten auch unter den extremeren Bedingungen nicht vollständig aufgelöst werden.

Eine Ursache für die geringe Auflösbarkeit der Fibrillen könnte sein, dass sich während der Inkubation ein Gleichgewicht zwischen Fibrille und gelöster Spezies bildete. Die unlöslichen Fraktionen wurden deswegen nach 16-stündiger Inkubation nochmals mit 6 M GdmSCN für weitere 16 Stunden inkubiert (Abb. 4.13B). Bei den Ansätzen bis 2 M GdmSCN wurde noch weiteres Protein solubilisiert. Im ersten Auflösungsschritt konnte unter diesen Bedingungen allerdings kaum lösliche Spezies erhalten werden (Abb. 4.13A). Die Ausbeute an aufgelösten Fibrillen bei Ansätzen oberhalb von 2 M GdmSCN wurde jedoch durch diese zweite Inkubation mit 6 M GdmSCN nicht verbessert.



Abb. 4.13: Auflösung der Fibrillen bei 50°C. A: RP-HPLC-Analysen der solubilisierten Fibrillen nach 16 h Inkubation unter Schütteln (600 rpm) gegen GdmSCN N-(+7)Ala (grün) und N-WT (schwarz). B: gelöstes Protein nach zweiter, 16-stündiger Inkubation mit 6 M GdmSCN, N-(+7)Ala (grün) bzw. N-WT (schwarz).

Trotz der extremen Bedingungen konnte nur maximal 50 % des Proteins aus den N-(+7)Ala-Fibrillen erhalten werden. Entweder konnten die Fibrillen nicht vollständig aufgelöst werden oder das gelöste Protein bildete amorphe Aggregate. Beide Formen der Aggregate werden durch eine Zentrifugation von der löslichen Spezies abgetrennt. Die unlösliche Fraktion nach einer Solubilisierung von N-(+7)Ala-Fibrillen wurde deswegen mittels eines Elektronenmikroskops analysiert (Abb. 4.14). Wie erwartet, konnten bei der Kontrolle ohne GdmSCN Fibrillen gefunden werden (Abb. 4.14A). Die Fibrillen unterschieden sich zu nicht behandelten Fibrillen lediglich in der Länge. Die Verkürzung der ca. 1 µm-langen Fibrillen auf 200 nm große Fragmente entsteht möglicherweise durch Scherkräfte aufgrund des Schüttelns während der Inkubation. In Gegenwart von 3 M GdmSCN konnten vorwiegend nur noch kleine Fibrillenfragmente von ca. 50 nm bis 100 nm beobachtet werden (Abb. 4.14B). Sogar nach einer Inkubation mit 6 M GdmSCN waren noch seed-ähnliche, ca. 30 nm große Fragmente in der unlöslichen Fraktion enthalten (Abb. 4.14C). Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestätigten, dass Fibrillenfragmente gegenüber 6 M Guanidiniumthiocyanat stabil waren.



Abb. 4.14: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der nicht aufgelösten N-(+7)Ala-Fibrillen nach einer 16-stündigen Inkubation bei 50°C und 600 rpm mit A: 0 M, B: 3 M und C: 6 M GdmSCN. Die Balken entsprechen 200 nm.

4.3.3 Analyse der RP-HPLC-Chromatogramme

Bei Analysen durch RP-HPLC wurden für die löslichen Varianten (vor Inkubation bei 37°C) jeweils nur ein Peak erhalten (Abb. 4.15oben). Allerdings konnte eine Verzögerung der Elution von N-(+7)Ala zu N-WT um ca. 2 min festgestellt werden. Die Verschiebung wurde vermutlich durch die zusätzlichen Alanine und damit durch eine erhöhte Hydrophobizität des N-(+7)Ala-Proteins im Vergleich zum N-WT verursacht.

Bei beiden Proteinen wurden die Monomere aus den Fibrillen gelöst, wobei der Peak des solubilisierten Monomers geringfügig verschoben war. Aufgrund der hohen Sensitivität der Methode können kleine Veränderungen, wie beispielsweise ein Pufferwechsel, die Elutionszeit der Proteine etwas verändern. Nach der Solubilisierung der Fibrillen konnten neben dem Peak der monomeren Spezies auch noch weitere Peaks beobachtet werden. Die Existenz weiterer Peaks lässt auf mögliche Abbauprodukte der Solubilisierung schließen. Bei der Analyse mittels SDS-PAGE konnten ebenfalls schwache Banden von Abbauprodukten bei höheren GdmSCN-Konzentrationen beobachtet werden (Abb. 4.11). Das Elutionsprofil der Varianten war von den Solubilisierungsbedingungen, 6 h bei RT oder 16 h bei 50°C, unabhängig. Allerdings konnten bei einem Vergleich der Chromatogramme nach der Solubilisierung von N-WT und N-(+7)Ala jeweils verschiedene Peaks beobachtet werden. Die unterschiedlichen Peaks von N-WT und N-(+7)Ala könnten auf verschiedene Abbauprodukte hinweisen. Während des Fibrillenwachstums könnten aber auch kleinere

Abbaufragmente entstanden sein, welche unspezifisch mit den Fibrillen assoziierten. Bei der Inkubation mit GdmSCN könnten solche Fragmente wieder gelöst worden sein.



Abb. 4.15: Analyse der löslichen Fraktionen nach Solubilisierung der Fibrillen mit GdmSCN mittels RP-HPLC. A: N-(+7)Ala, B: N-WT, als Kontrolle wurde jeweils das Elutionsprofil der nicht inkubierten Varianten dargestellt (oben) und mit der solubilisierten Fraktion nach Auflösung bei RT (Mitte) und nach Auflösung bei 50°C (unten) verglichen.

4.3.4 Fibrillenstabilität über die Zeit und bei saurem pH

Die Stabilität der Fibrillen wurde über einen längeren Zeitraum analysiert, um zu untersuchen, ob die Ausbeute an gelösten Fibrillen erhöht werden kann. Für einen Vergleich zwischen N-WT und N-(+7)Ala wurde die jeweils maximal aufgelöste Proteinmenge auf 100 % gesetzt (Abb. 4.16A). Bei den N-WT-Fibrillen wurde bereits nach 30 Minuten die maximale Auflösung erreicht. Die N-(+7)Ala-Fibrillen waren dagegen wesentlich stabiler, die maximal gelöste Fibrillenmenge wurde erst nach 21 Stunden erhalten. Eine verlängerte Inkubationzeit der Fibrillen gegen GdmSCN führte zu keiner Erhöhung der Ausbeute an solubilisiertem Monomer.



Abb. 4.16: Auflösung der Fibrillen über die Zeit. A: Inkubation mit 6 M GdmSCN bei 50°C, 600 rpm. N-(+7)Ala (grün) und N-WT (schwarz), **B:** EM-Aufnahme der nicht aufgelösten N-(+7)Ala-Fibrillen nach 45 h in 6M GdmSCN bei 50°C, unter 600 rpm Schütteln. Der Balken entspricht 200 nm.

Die unlösliche Fraktion nach einer 45 Stunden-Inkubation mit 6 M GdmSCN wurde mit einem Elektronenmikroskop analysiert (Abb. 4.16B). Es konnten noch eindeutig Fibrillenfragmente von 10 bis 100 nm Länge beobachtet werden. In Abbildung 4.18 sind die HPLC-Chromatogramme der Fibrillen von N-WT (oben) und N-(+7)Ala (unten), welche mehr als einen Tag mit 6 M GdmSCN inkubiert wurden, gezeigt. Die Profile unterscheiden sich nicht von denen aus Abbildung 4.15. Nach längerer Inkubation werden demnach keine weiteren Fragmente aus der Fibrille gelöst.

Die Fibrillen beider Varianten eine Stabilität haben sehr hohe gegenüber Denaturierungsmitteln. Die Stabilität wird ebenfalls nicht von veränderten Fibrillierungsbedingungen, wie eine Erhöhung der Temperatur von 37°C auf 60°C, beeinflusst. Als nächstes wurde untersucht, ob die Fibrillen bei saurem pH besser solubilisiert werden können. Dafür wurden die N-(+7)Ala-Fibrillen mit 6 M GdmSCN unter Schütteln bei RT und einem pH-Wert zwischen 3 und 4 inkubiert (Abb. 4.17). Anhand von RP-HPLC-Analysen konnte aber unter diesen Bedingungen ebenfalls nur ca. 20 % der Fibrillen gelöst werden. Die Fibrillen waren sogar über fünf Tage stabil.



Abb. 4.17: Solubilisierung der Fibrillen bei saurem pH-Wert. Auflösung der N-(+7)Ala-FIbrillen bei pH 3-4 mit 6 M GdmSCN bei 50°C, unter Schütteln bei 600 rpm.

Beim Vergleich der HPLC-Chromatogramme konnten wiederum keine Unterschiede zwischen der Solubilisierung von N-(+7)Ala-Fibrillen bei neutralem und saurem pH beobachtet werden (Abb. 4.18 Mitte bzw. unten). Der pH-Wert beeinflusst demnach weder die Ausbeute an gelösten Fibrillen noch die Proteinfragmente, die bei der Solubilisierung entstehen.



Abb. 4.18: Analyse der löslichen Spezies mittels HPLC. RP-HPLC-Chromatogramme der löslichen Fraktion nach 24-29 h Inkubation mit 6 M GdmSCN von N-WT (oben), N-(+7)Ala bei pH 7,4 (Mitte) und N-(+7)Ala bei pH 3-4 (unten).

4.3.5 Einfluss der GdmSCN-resistenten Fibrillenfragmente auf die Fibrillierung

Wie gezeigt werden konnte, besitzen die Fibrillen eine extreme Stabilität. Nach zweitägiger Inkubation mit GdmSCN konnten immer noch Fragmente der Fibrillen durch EM gezeigt werden (Abb. 4.14 und 4.16). Im nächsten Schritt wurde getestet, ob diese GdmSCNresistenten Fibrillenfragmente genauso als seeds fungieren können wie durch Ultraschall hergestellte Fibrillenkeime. Dazu wurde die unlösliche Fraktion nach 16 Stunden Inkubation in 6 M GdmSCN mit N-(+7)Ala-Protein bei 37°C inkubiert. Die Fibrillenfragmente beschleunigten die Fibrillierung durch Verkürzung der lag phase (Abb. 4.19A). Das lässt vermuten, dass die stabilen, seed-ähnlichen Fibrillen aktive Enden besitzen wie die durch Ultraschall hergestellten seeds. Allerdings konnte während der Inkubation ein weißer Niederschlag beobachtet werden. Zur Kontrolle wurde die Probe mittels Elektronenmikroskop analysiert, um auszuschließen, dass die gemessene ANS-Fluoreszenz durch amorphe Aggregate verursacht wurde (Abb. 4.19B). Dabei wurde eine Verlängerung einiger stabiler Fragmente um ca. 15 % auf mehr als 200 nm beobachtet. Die meisten Fibrillen klebten allerdings sehr stark zusammen, amorphe Aggregate wurden aber nicht beobachtet. Die ANS-Fluoreszenzveränderung wurde also durch das Fibrillenwachstum verursacht. Trotzdem kann die Bildung einiger weniger amorpher Aggregate nicht vollkommen ausgeschlossen werden.



Abb. 4.19: Einfluss GdmSCN-resistenter Fibrillenfragmente auf die Fibrillierung von N-(+7)Ala. A: Fibrillierungskinetik von 1 mM N-(+7)Ala bei 37°C ohne (blau) und in Gegenwart stabiler Fibrillenfragmente (schwarz). B: EM-Aufnahmen der Fibrillen nach elf Tagen Inkubation in Gegenwart von GdmSCN-stabilen, *seed*-ähnlichen Fibrillen. Der Balken entspricht 100 nm.

4.4 Untersuchung eines möglichen Gleichgewichts zwischen Fibrille und löslicher Spezies

In weiteren Experimenten sollte untersucht werden, ob sich während der Fibrillierung ein Gleichgewicht zwischen der löslichen Spezies und der Fibrille einstellt. Nach Erreichen eines Plateaus des ANS-Signals befand sich immer noch monomeres Protein in der löslichen Fraktion (Abb. 4.20A). Eine Analyse mittels UV-Spektroskopie und RP-HPLC ergab, dass ca. 30-40 % der N-(+7)Ala-Variante und bis zu 80 % des N-WT nicht in die Fibrille eingelagert wurden (Abb. 4.20B). Bei einer anfänglichen N-(+7)Ala-Proteinkonzentration von 15 mg/ml verblieben also immer noch 4-6 mg/ml des Proteins in Lösung. Bei der Bildung eines Gleichgewichts zwischen Fibrille und löslichem Protein sollten erneut mindestens 30 % des Proteins in eine Fibrillenstruktur gehen.



Abb. 4.20: Charakterisierung des Fibrillierungsüberstandes. A: SDS-PAGE der löslichen Fraktion des Fibrillierungsansatztes von N-WT nach 100 Tagen. B: UV-Spektrum von N-WT (blau) nach 100 Tagen bzw. N-(+7)Ala (schwarz) nach 30 Tagen.

Zur Analyse, ob nicht fibrilliertes Protein ebenfalls Fibrillen bilden kann, wurde die lösliche Fraktion erneut bei 37°C inkubiert. Dabei wurde allerdings keine weitere Fibrillierung festgestellt (Abb. 4.21).



Abb. 4.21: Inkubation des Fibrillierungsüberstandes. Nach Erreichen der maximalen ANS-Fluoreszenz wurde die lösliche Fraktion durch Zentrifugation von den N-(+7)Ala-Fibrillen abgetrennt und erneut bei 37°C inkubiert.

Die Konzentration an löslichem Monomer in der nicht fibrillierten Fraktion lag oberhalb der kritischen Konzentration von 10 μ M für eine Fibrillenbildung (Dissertation Till Scheuermann, 2003). Das lösliche Protein sollte deswegen eine Fibrillenbildung zeigen. Es konnte aber keine weitere Fibrillierung nach Erreichen des ANS-Plateaus beobachtet werden. Dies deutet daraufhin, dass kein Gleichgewicht zwischen löslicher und fibrillärer Form vorlag. Allerdings könnte das Protein, welches nicht in die Fibrillen geht, während der Reinigung oder der Inkubation modifiziert worden sein und kann vielleicht deswegen keine fibrillären Strukturen ausbilden. Die Fibrillenbildung könnte durch eine chemische Modifizierung möglicherweise verhindert oder erschwert werden.

4.5 Suche nach möglichen Intermediaten der Fibrillierung

Die Analyse des Fibrillierungsansatzes durch SDS-PAGE zeigte, dass während der Inkubation des Proteins bei 37°C oligomere Strukturen gebildet wurden (Abb. 4.20). Diese Strukturen wurden auch nach Solubilisierung der Fibrillen mit GdmSCN beobachtet (Abb. 4.11). Es könnte sich also um Intermediate der Fibrillenbildung handeln. Zur näheren Untersuchung wurde N-(+7)Ala vor der Fibrillenbildung biotinyliert. Nach der Inkubation bei 37°C wurde die Probe mittels Western Blot analysiert. Zur Detektion des biotinylierten Proteins wurde Peroxidase (POD) gekoppeltes Streptavidin verwendet (Abb. 4.22). Die Fibrillenbildung wurde durch die Biotinylierung nicht beeinflusst, da im Sammelgel (Spur 3) deutlich Fibrillen erkennbar waren. Die höhermolekularen Strukturen, die während der Inkubation gebildet wurden, liefen in Höhe der 45 kDa-Markerbande. Dies deutete daraufhin, dass es sich um dimere Strukturen von N-(+7)Ala, welches in Höhe der 25 kDa-Bande läuft, handelte. Als weitere Kontrolle wurde eine Probe des Fibrillenansatzes auf eine PVDF-Membran geblottet und die höhermolekularen Proteinstrukturen mittels Edman-Abbau analysiert. Die N-terminale Ansequenzierung bestätigte, dass es sich um N-(+7)Ala handelte.



Abb. 4.22: Western Blot mit Streptavidin-POD gegen biotinyliertes N-(+7)Ala. Biotinyliertes Protein wurde 15 Tage bei 37°C inkubiert. M- Marker; 1-nicht inkubiertes Protein; 2-lösliche Fraktion nach der Inkubation; 3-vollständiger Inkubationsansatz; 4-lösliche Fraktion nach der Inkubation von nicht-biotinylierten Fibrillen als Negativkontrolle.

Für detailliertere Untersuchungen wurden die Varianten über mehrere Tage bei 37°C inkubiert und nach verschiedenen Zeiten mittels SDS-PAGE analysiert. Stellvertretend wird in Abbildung 4.23A die SDS-PAGE-Analyse der N-(+7)Ala-Variante gezeigt, da ein gleiches Bandenmuster bei N-WT auftrat. Die höhermolekularen Strukturen bildeten sich innerhalb von zwei Tagen. Eine Analyse der Deletionsmutante (N-ΔAla) zeigte ebenfalls nach nur einem Inkubationstag bei 37°C dimere Strukturen (Abb. 4.23B). Bei der N-(+7)Ala-Variante waren allerdings, im Gegensatz zu N-WT und N-ΔAla, die Fibrillen bereits nach 14 Tagen im Sammelgel erkennbar (Abb. 4.23A, B). Die Bildung von "SDS-stabilen" Fibrillen ist demnach abhängig von der Länge der Polyalaninsequenz. Die Assoziation zu höheren Oligomeren wurde dagegen scheinbar nicht von der Anzahl der Alanine beeinflusst. Eine Erklärung besteht darin, dass diese Oligomere wahrscheinlich nicht als Intermediate der Fibrillenbildung fungieren. Es ist auch möglich, dass die Proteinmoleküle außerhalb der

Alaninsequenz miteinander assoziiert sind und dadurch eventuell die Alanin-abhängige Fibrillenbildung initiieren.

Aufgrund der "SDS-Stabilität" der oligomeren Strukturen könnte es sich um kovalentverknüpfte Dimere handeln. Zur genaueren Charakterisierung wurden die Proben mittels Gelfiltration getrennt und durch MALDI-TOF-MS analysiert. Es konnte allerdings kein kovalent verknüpftes Dimer oder Oligomer identifiziert werden (Diplomarbeit Rolf Sachs, 2005). Die 45 kDa-Bande (markierte Banden in Abb. 4.23A) wurde deswegen aus einem Polyacylamidgel ausgeschnitten und anschließend mittels Trypsin verdaut. Die erhaltenen Peptide wurden durch MALDI-TOF-MS und ESI-TOF-MS analysiert. Es konnten jedoch wiederum keine Hinweise auf kovalent-verknüpfte Fragmente erhalten werden.



Abb. 4.23: SDS-PAGE nach verschiedenen Inkubationszeiten der Proteinvarianten. A: N-(+7)Ala,
B: N-ΔAla. Nach verschiedenen Zeiten bei 37°C wurden die Proben entnommen und analysiert. M- Marker;
V- vor Inkubation, 1-19 d- Tag der Inkubation.

Ein Hinweis auf eine nicht-kovalente Assoziation wurde bei der Inkubation von N-(+7)Ala in Gegenwart von hohen Salz- sowie Argininkonzentrationen beobachtet. Unter diesen Bedingungen konnten keine Oligomere mittels SDS-PAGE identifiziert werden (Abb. 4.24). Die Fibrillenbildung von N-(+7)Ala wurde durch die hohen Salz- und Argininkonzentrationen aber nicht unterdrückt, da im Sammelgel deutlich fibrilliertes Protein zu erkennen war. Die Strukturen in Höhe der 45 kDa-Bande als zwingende Intermediate der Fibrillierung können daher ausgeschlossen werden.



Abb. 4.24: Einfluss von Argininsulfat. SDS-PAGE von N-(+7)Ala nach einer 27-tägigen Inkubation ohne (1) und in Gegenwart von 1,2 M Argininsulfat (2) bei 37°C.

4.6 Modifizierung der Fibrillierungsreaktion von N-(+7)Ala

4.6.1 Einfluss von Proteinen und Peptiden auf die Fibrillenbildung

Die Proteinkonzentration einer Zelle beträgt im Durchschnitt ca. 200 mg/ml. Durch die enorme Proteindichte ist eine gegenseitige Beeinflussung verschiedener Proteine gut vorstellbar. Es ist ebenfalls bekannt, dass PABPN1 während der RNA-Prozessierung in Form von oligomeren Strukturen vorliegt (Kühn *et al.*, 2003). In Zellkulturanalysen und auch bei *in vivo*-Experimenten wurden innerhalb der amyloiden Ablagerungen neben PABPN1 auch andere Proteine identifiziert (Calado *et al.*, 2000; Brais *et al.*, 2003; Abu-Baker *et al.*, 2003). Die große Hydrophobizität der Fibrillen könnte die Struktur anderer Zellproteine beeinflussen und zu deren Aggregation führen. Da *in vitro* unter sehr artifiziellen Bedingungen gearbeitet wird, sollte die Beeinflussung der Fibrillenbildung von N-(+7)Ala durch Zugabe verschiedener Proteine untersucht werden.

4.6.1.1 Effekt von der N-ΔAla-Variante

Als erstes Protein wurde der Einfluss von N-ΔAla untersucht. Bei N-ΔAla wurde nie eine Fibrillenbildung beobachtet. Durch die Verwendung der Deletionsmutante sollte der Einfluss der Aminosäuren außerhalb der Polyalaninsequenz auf die Fibrillenbildung analysiert werden. In Gegenwart der N-ΔAla-Variante wurde eine Verzögerung der Fibrillenbildung beobachtet
(Abb. 4.25A). Mit steigender Konzentration von N- Δ Ala verlängerte sich die *lag phase* der Fibrillierung, bei äquimolaren Konzentrationen von N- Δ Ala und N-(+7)Ala um den Faktor 5 und bei einem doppelten Überschuss an N- Δ Ala um das Neunfache. Das Fibrillenwachstum, welches durch den linearen Anstieg nach der *lag phase* gekennzeichnet ist, wurde ebenfalls durch N- Δ Ala verzögert. Der lineare Anstieg betrug mit 1 mM N- Δ Ala 0,27 d⁻¹ und mit 2 mM N- Δ Ala 0,21 d⁻¹ im Vergleich zur Kontrolle mit 0,41 d⁻¹. Elektronenmikroskopische Analysen der Fibrillen zeigten keine veränderte Morphologie der Fibrillenoberfläche mit zunehmender N- Δ Ala-Konzentration (Abb. 4.25B-D).



Abb. 4.25: Einfluss von N- Δ Ala auf die Fibrillierung von N-(+7)Ala. A: Fibrillierung von 1 mM N-(+7)Ala allein (schwarz), in Gegenwart von 1 mM (blau) und 2 mM N- Δ Ala (rot). B-C: EM-Aufnahmen von 1 mM N-(+7)Ala (B), N-(+7)Ala + 1 mM N- Δ Ala (C) und N-(+7)Ala + 2 mM N- Δ Ala (D).

Zur genaueren Analyse des Einflusses von N- Δ Ala auf das Fibrillenwachstum wurde der Effekt der Deletionsmutante auf die Fibrillierung in Gegenwart von *seeds* untersucht. Dabei konnte bestätigt werden, dass N- Δ Ala das Wachstum der Fibrillen verzögert (Abb. 4.26). Die

initiale Fibrillierungsgschwindigkeit wurde bei einem molaren Verhältnis von 1 N-(+7)Ala zu 2 N-ΔAla um ca. 30 % verringert

Quantitative RP-HPLC-Analysen nach der Fibrillierung von N-(+7)Ala und N- Δ Ala bestätigten, dass zur Fibrillierung von N-PABPN1 eine Polylaninsequenz essentiell ist. N- Δ Ala-Moleküle wurden nicht mit in die Fibrillen eingebaut, sondern befanden sich ausschließlich in der löslichen Fraktion des Fibrillenansatzes (Abb. 4.27).



Abb. 4.26: Einfluss von N-ΔAla in Gegenwart von *seeds* **auf die N-(+7)Ala-Fibrillenbildung.** Fibrillierung von 0,5 mM N-(+7)Ala ohne (schwarz) und in Gegenwart von 1 mM N-ΔAla (blau).



Abb. 4.27: Quantifizierung von N- Δ Ala durch RP-HPLC. 0,5 mM N(+7)Ala wurde mit 1 mM RCMLA bei 37°C 15 Tage inkubiert. Anschließend wurden die löslichen Fraktionen mittels RP-HPLC analysiert und der Anteil an N- Δ Ala in Abhängigkeit zur eingesetzten Menge bestimmt. 1-in Lösung gebliebenes N- Δ Ala, 2-durch GdnHCl entferntes, Fibrillen-assoziiertes N- Δ Ala; 3-mit GdmSCN solubilisiertes N- Δ Ala.

Aus der Diplomarbeit von Rolf Sachs (2005) ist bekannt, dass N- Δ Ala und N-(+7)Ala heterogene, dimere Strukturen bilden, welche durch SDS-PAGE detektiert wurden. Ähnliche Strukturen von N- Δ Ala und N-(+7)Ala wurden bereits im Abschnitt 4.5 näher erläutert und

analysiert. N-(+7)Ala und N-ΔAla assoziieren möglicherweise zu instabilen, höhermolekularen Strukturen, die im Gleichgewicht mit den monomeren Spezies stehen. Dadurch ist weniger freies N-(+7)Ala-Monomer zur Fibrillenbildung vorhanden und die Fibrillenbildung wird verzögert.

4.6.1.2 Effekt von RCMLA (reduziertes, carboxymethyliertes α-Lactalbumin)

Zur Untersuchung, ob der Effekt von N- Δ Ala auf die Fibrillierung von N-(+7)Ala durch eine spezifische oder unspezifische Assoziation der Varianten entsteht, wurde modifiziertes α -Lactalbumin (RCMLA) eingesetzt. Reduziertes, carboxymethyliertes α -Lactalbumin (RCMLA) wird häufig als Modellprotein für ein vollständig entfaltetes Protein verwendet (Tani *et al.*, 2003; Palleros *et al.*, 1991). Mit 16,2 kDa hat RCMLA zu N-PABPN1eine vergleichbare Größe.

Bei der Inkubation von N-(+7)Ala mit RCMLA bildeten sich amorphe Aggregate, welche die ANS-Fluoreszenz beeinflussten (Abb. 4.28A). Deswegen konnte der Effekt von RCMLA auf die Fibrillierung ohne *seeds* nicht analysiert werden. Bei der Inkubation von RCMLA ohne N-(+7)Ala konnte allerdings keine veränderte ANS-Fluoreszenz beobachtet werden. Daraus geht hervor, dass N-(+7)Ala und RCMLA sich gegenseitig beeinflussen. Durch eine elektronenmikroskopische Analyse konnten neben amorphen Aggregaten auch einige Fibrillen beobachtet werden. Analysen mittels RP-HPLC und SDS-PAGE ergaben, dass RCMLA während der Inkubation bei 37°C abgebaut wurde (Abb. 4.28B). Vor der Inkubation eluierte RCMLA bei der RP-HPLC-Analyse nach ca. 33 min. Nach einer Inkubation von zehn Tagen wurden nur noch kleinere Peaks nach kürzeren Retentionszeiten detektiert. Verunreinigungen durch geringe Mengen einer Protease könnten ausreichen, um RCMLA während der Inkubation bei 37°C abzubauen.

Um eine amorphe Aggregation zu verhindern, wurde der Einfluss von RCMLA auf die Fibrillenbildung in Gegenwart von *seeds* untersucht. Dabei konnte kein Effekt von RCMLA auf das Fibrillenwachstum beobachtet werden (Abb. 4.29A). RCMLA beeinflusst weder die Menge der gebildeten Fibrillen noch die initiale Fibrillierungsgeschwindigkeit. Eine Verlängerung der Fibrillenkeime wurde durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt (Abb. 4.29B-D).



Abb. 4.28: Einfluss von RCMLA auf die N-(+7)Ala-Fibrillierung ohne Zugabe von *seeds*. A: 1 mM N-(+7)Ala wurde ohne RCMLA (schwarz), mit 1 mM (blau) oder 2 mM (rot) bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurde 1 mM RCMLA ohne N-(+7)Ala (grün) inkubiert. B: RP-HPLC-Chromatogramm von 1mM RCMLA in Abwesenheit von N-(+7)Ala vor Inkubation bei 37°C (blau) und nach zehn Tagen (schwarz).



Abb. 4.29: Einfluss von RCMLA auf die N-(+7)Ala-Fibrillierung in Gegenwart von seeds. A: 0,5 mM N-(+7)Ala wurde ohne RCMLA (schwarz), mit 0,5 mM (blau) oder 1 mM (rot) bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurde 1 mM RCMLA ohne N-(+7)Ala (grün) inkubiert. B-D: EM-Aufnahmen von 0,5 mM N-(+7)Ala ohne RCMLA (B), mit 0,5 mM RCMLA (C) und mit 1 mM RCMLA (D) nach 10 d bei 37°C. Die Balken entsprechen 200 nm.

Dabei wurde allerdings eine leicht veränderte Fibrillenmorphologie in Gegenwart von RCMLA beobachtet, welche eventuell durch assoziiertes Protein verursacht wurde. Die Fibrillen waren auch stärker miteinander verklebt im Vergleich zu den Fibrillen der Kontrollansätze.

Beim Waschen der Fibrillen mit Guanidinhydrochlorid (GdnHCl) und anschließender Solubilisierung mit Guanidiniumthiocyanat (GdmSCN) konnte festgestellt werden, dass nicht abgebautes RCMLA mit den Fibrillen assoziiert war (Daten nicht gezeigt). Durch quantitative Analysen der löslichen Fraktionen vom Fibrillenansatz, der Waschfraktion und der Solubilisierung mittels RP-HPLC konnten ca. 15-20 % intaktes RCMLA wieder gefunden werden (Abb. 4.30). In der löslichen Fraktion des Fibrillierungsansatzes konnte kein vollständiges RCMLA detektiert werden. Dies lässt vermuten, dass RCMLA möglicherweise durch die Assoziation mit den Fibrillen vor einem Abbau geschützt wird.



Abb. 4.30: Quantifizierung von RCMLA durch RP-HPLC. 0,5 mM N(+7)Ala wurde mit 0,5 mM RCMLA bei 37°C 20 Tage inkubiert. Anschließend wurden die löslichen Fraktionen mittels HPLC analysiert und der Anteil an RCMLA in Abhängigkeit zur eingesetzten Menge bestimmt. 1-in Lösung gebliebenes RCMLA, 2-durch GdnHCl entferntes, Fibrillen-assoziiertes RCMLA; 3-mit GdmSCN solubilisiertes RCMLA.

4.6.1.3 Effekt von Lysozym

Des Weiteren sollte der Effekt von Lysozym auf die Fibrillierung analysiert werden. Mit 14,4 kDa besitzt Lysozym ein vergleichbares Molekulargewicht zu N(+7)Ala. Im Gegensatz zu N-PABPN1 hat Lysozym aber einen wesentlich höheren Anteil an Sekundärstrukturelementen (Blake *et al.*, 1965). Aus diesem Grund wurde Lysozym als stellvertretendes Protein für globuläre Proteine ausgewählt. Bei der Fibrillierung in Gegenwart von Lysozym ohne Fibrillenkeime wurden, wie auch bei RCMLA, amorphe

Aggregate beobachtet. Diese Aggregate beeinflussten die Fluoreszenz-Emmisions-Messungen mit ANS. Durch eine Koinkubation mit Lysozym schien die Fibrillierung beschleunigt zu werden (Abb. 4.31A). Es kann aber nicht geklärt werden, ob die gemessene ANS-Fluoreszenz durch Fibrillen oder durch amophe Aggregate hervorgerufen wurde. Es konnten auch stark aneinander gebundene Fibrillen, neben amorphen Aggregaten, mittels Elektronenmikroskopie beobachtet werden (Abb. 4.31B). Die Verklebungen von Fibrillen könnten mit unspezifisch an die Fibrillen gebundenem Lysozym erklärt werden. Die Menge an Fibrillen, welche aufgrund des ANS-Fluoreszenzsignals erwartet wurde, konnte durch EM nicht bestätigt werden.



Abb. 4.31: Einfluss von Lyszozym auf die N-(+7)Ala-Fibrillierung ohne Zugabe von *seeds.* **A:** 1 mM N-(+7)Ala wurde ohne Lysozym (schwarz) und mit 1 mM (blau) bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurde 1 mM Lysozym ohne N-(+7)Ala (grün) inkubiert. **B:** EM-Aufnahme von 1 mM N-(+7)Ala, welches in Gegenwart von 1 mM Lysozym 30 Tage inkubiert wurde. Der Balken entspricht 200 nm.

Im nächsten Schritt wurde der Effekt von Lysozym auf die Fibrillenbildung in Gegenwart von *seeds* getestet. Dadurch sollte festgestellt werden, ob Lysozym einen Effekt auf das Fibrillenwachstum hat oder nur die Bildung der Keime beeinflusst. Die initialen Geschwindigkeiten der Fibrillenbildungen ohne und in Gegenwart von Lysozym waren vergleichbar (Abb. 4.32A). Die Fibrillenverlängerung wird durch Lysozym demnach nicht beeinflusst. Allerdings hatte Lysozym einen Effekt auf die Fluoreszenzintensität. Die Analyse der Fibrillen mittels Elektronenmikroskopie zeigte neben Proteinaggregaten auch stark miteinander verklebte Fibrillen, möglicherweise verursacht durch unspezifisch gebundenes Lysozym (Abb. 4.32B-D). Die reduzierte Fluoreszenzintensität wurde durch eine

Verringerung der Fibrillenmasse hervorgerufen. Die Menge der gebildeten Fibrillen wurde also durch Lysozym inhibiert. Bei der Inkubation von Lysozym mit N-(+7)Ala-*seeds* in Abwesenheit von monomerem N-(+7)Ala wurde keine ANS-Fluoreszenzänderung beobachtet. Dies lässt vermuten, dass Lysozym unter den gegebenen Bedingungen nur in Gegenwart von löslichem N-(+7)Ala-Protein bzw. von wachsenden Fibrillien aggregiert.



Abb. 4.32: Einfluss von Lyszozym auf die N-(+7)Ala-Fibrillierung in Gegenwart von seeds. A: 0,5 mM N-(+7)Ala wurde ohne (schwarz), mit 0,5 mM (blau) oder 1 mM (rot) Lysozym bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurde 1 mM Lysozym in Abwesenheit von N-(+7)Ala (grün) inkubiert. B-D: EM-Aufnahmen nach 24 Tagen bei 37°C von N-(+7)Ala ohne (B), mit 0,5 mM (C) und mit 1 mM Lysozym (D). Die Balken entsprechen 200 nm.

Die löslichen Fraktionen des Fibrillierungsansatzes, der Waschfraktion sowie der Solubilisierung der Fibrillen mittels GdmSCN wurden durch RP-HPLC analysiert (Abb. 4.33). Lysozym befand sich hauptsächlich in der löslichen Fraktion des Fibrillierungsansatzes. Die restliche Menge an Protein wurde beim Waschen der Fibrillen mit 4 M GdnHCl entfernt. Bei der Solubilisierung der Fibrillen mit 5 M GdmSCN wurde kein weiteres Lysozym detektiert. Dadurch konnte bestätigt werden, dass das Lysozym nicht in die Fibrillen eingelagert wird, sondern nur mit den Fibrillen assoziiert war.



Abb. 4.33: Quantifizierung von Lysozym durch RP-HPLC. 0,5 mM N-(+7)Ala wurde mit 0,5 mM Lysozym bei 37°C 50 Tage inkubiert. Anschließend wurden die löslichen Fraktionen mittels HPLC analysiert und der Anteil an Lysozym in Abhängigkeit zur eingesetzten Menge bestimmt. 1-in Lösung gebliebenes Lysozym, 2-durch GdnHCl entferntes, Fibrillen-assoziiertes Lysozym; 3-mit GdmSCN solubilisiertes Lysozym.

4.6.1.4 Einfluss des Polyalaninpeptids A₁₇KYK-NH₂

Die Fibrillenbildung von N-PABPN1 ist abhängig von der Länge der Polyalaninsequenz (Scheuermann et al., 2003). Aus diesem Grund sollte der Einfluss eines Polyalaninpeptids auf die Fibrillierung untersucht werden. Das Peptid wurde von Dr. J. Faust (Universität Halle-Wittenberg, Fachbereich Biochemie) synthetisiert. Es besteht aus 17 Alaninen, zwei Lysinen zur Verbesserung der Löslichkeit der hydrophoben Alanine und einem Tyrosin zur einfacheren Detektion mittels UV-Absorption. Die terminale Carboxylgruppe des Peptids wurde in ein Amid überführt. Von anderen Arbeitsgruppen war bekannt, dass Polyalaninpeptide ebenfalls Fibrillenstrukturen ausbilden (Blondell et al., 1997; Miller et al., 2001; Shinchuk et al., 2005). Analysen des Peptids mittels CD-Spektroskopie ergaben, dass die Alanine eine α-helicale Struktur annehmen. Während der Inkubation bei 37°C trat eine Verschiebung des Spektrums auf. Nach Inkubation lag, wie auch bei Fibrillen beobachtete wurde, ein Spektrum mit den typisches Merkmalen einer β -Faltblattstruktur vor (Abb. 4.34). Bei Koinkubation des Peptids mit N-(+7)Ala-Protein wurde eine Beschleunigung der Fibrillenbildung beobachtet (Abb. 4.35A). Das Peptid beeinflusste nicht nur die lag phase um den Faktor 3, sondern hatte auch einen positiven Effekt auf das Fibrillenwachstum. Die Fibrillenverlängerung, welche dem linearen Anstieg der Fluoreszenz entspricht, war in

Gegenwart des Peptids mehr als doppelt so schnell als in Abwesenheit des Peptids. Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen unterschieden sich die Fibrillen aus Protein mit Peptid nicht von den Kontrollfibrillen (Abb. 4.35B-C).



Abb. 4.34: CD-Spektrum des Polyalaninpeptids. 0,1 mM Peptid wurde für einen Tag bei 37°C inkubiert. Die lösliche Fraktion (blau) und die unlösliche Fraktion (grün) des Inkubationsansatzes im Vergleich zum nicht inkubierten Peptid (schwarz).

Es wurden auch fibrilläre Strukturen des Peptids mittels Elektronenmikroskopie beobachtet. Allerdings konnte, eventuell durch die geringe Peptidkonzentration und die dadurch geringe Fibrillenmenge, keine Verschiebung der ANS-Fluoreszenz detektiert werden. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die gemessene ANS-Fluoreszenz-Verschiebung vorwiegend durch die Fibrillenbildung von N-(+7)Ala verursacht wurde.

Anhand von RP-HPLC-Analysen wurde festgestellt, dass das Peptid im Gegensatz zu den vorher untersuchten Proteinen in die Fibrillen eingebaut wurde (Abb. 4.36). Dabei wurde mehr als 50 % des Peptids in Fibrillen umgewandelt. Wie auch bei N-(+7)Ala beobachtet werden konnte, blieb ein Teil des Peptids in Lösung. Weitere 20 % des Peptids waren mit den Fibrillen assoziiert und konnten durch einen Waschschritt der Fibrillen mit GdnHCl entfernt werden.



Abb. 4.35: Einfluss des Polyalaninpeptids auf die Fibrillierung. A: 1 mM N-(+7)Ala wurde ohne (schwarz) und mit 0,1 mM Peptid (blau) bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurde 0,27 mM Peptid ohne Protein inkubiert (grün). B-C: EM-Aufnahmen von N-(+7)Ala ohne (B) und mit 0,1 mM Peptid (C), D: 0,27 mM Peptid. Die Balken entsprechen 200 nm.



Abb. 4.36: Quantifikation des Peptids durch RP-HPLC. 1 mM N-(+7)Ala wurde mit 0,1 mM Peptid bei 37°C 15 Tage inkubiert. Anschließend wurden die löslichen Fraktionen mittels HPLC analysiert und der Anteil an Peptid in Abhängigkeit zur eingesetzten Menge bestimmt. 1-in Lösung gebliebenes Peptid, 2-durch GdnHCl entferntes, Fibrillen-assoziiertes Peptid; 3-mit GdmSCN solubilisiertes Peptid.

4.6.2 <u>Einfluss von Salzen auf die Fibrillenbildung</u>

Die einzelnen Proteinmoleküle sind innerhalb der Fibrille durch ionische und hydrophobe Wechselwirkungen miteinander assoziiert (Geddes *et al.*, 1968; Forood *et al.*, 1995; Fändrich & Dobson, 2002; Nelson *et al.*, 2005; Sawaya *et al.*, 2007). Deswegen sollte der Effekt der Ionenstärke und von unterschiedlichen Anionen sowie Kationen auf die Fibrillenbildung von N-(+7)Ala analysiert werden. Im folgenden Abschnitt ist die Fibrillierung von N-(+7)Ala in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen (0,6-1,2 M) beschrieben. Es wurden ausschließlich Fibrillierungen in Gegenwart von *seeds* untersucht. Damit kann lediglich eine Aussage über die Effekte der Salze auf die initiale Fibrillierungsgeschwindigkeit und die Menge an gebildeten Fibrillen getroffen werden. Der Einfluss von Salzen auf die Bildung eines Nukleationskeimes kann nicht ermittelt werden. Mittels CD-spekroskopischer Analysen konnte eine Beeinflussung der Sekundärstruktur von löslichem N-(+7)Ala durch die untersuchten Salze in allen Fällen ausgeschlossen werden (Abb. 4.37).



Abb. 4.37: CD-Strukturanalyse von N-(+7)Ala in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen. Die Spektren wurden bei RT in 5 mM KH₂PO₄ pH 7,4, 0,15 M NaCl ohne weitere Salze (schwarz), mit 1,2 M NaCl (blau), NH₄Cl (rot) und (NH₄)₂SO₄ (grün) aufgenommen.

4.6.2.1 Einfluss von Anionen

Innerhalb der Hofmeister-Reihe werden Ionen nach ihrer stabilisierenden oder destabilisierenden Wirkung auf Proteinstrukturen eingeteilt (Hofmeister, 1888). Entsprechend der Hofmeister-Reihe wurden Sulfat, wegen seiner stabilisierenden Wirkung in Bezug auf die native Proteinstruktur, Chlorid, als relativ neutrales Anion, und Nitrat, als eher destabilisierendes Anion ausgewählt. Für die Untersuchungen der Effekte dieser Anionen auf

die Fibrillenbildung von N-(+7)Ala wurde Ammonium als Gegenion verwendet. In Gegenwart von 0,6 M und 1,2 M Ammoniumsulfat wurde eine sehr stark beschleunigte Fibrillenbildung beobachtet (Abb. 4.38A). In Anwesenheit von 0,6 M (NH₄)₂SO₄ wurde die initiale Fibrillierungsgeschwindigkeit fast um das Vierfache beschleunigt, mit 1,2 M sogar um mehr als das 30fache im Vergleich zur Kontrolle. Entgegen den Erwartungen hatte Ammoniumsulfat demnach eher einen stabilisierenden Effekt auf die fibrilläre Struktur oder mögliche Intermediate und nicht auf die native Struktur. Ein beschleunigender Effekt, wie bei Ammoniumsulfat beobachtet wurde, konnte mit Chlorid und Nitrat nicht verzeichnet werden (Abb. 4.38). Beide Anionen beeinflussten die Fibrillierung auf ähnliche Weise. Mit 1,2 M wurde die Fibrillenbildung um 20-30 % beschleunigt. Bei einer Konzentration von 0,6 M wurde sogar eine Verzögerung der Fibrillenbildung um bis zu 40 % beobachtet.



Abb. 4.38: Einfluss von $(NH_4)_2SO_4$ (A), NH_4Cl (B), NH_4NO_3 (C) auf die N-(+7)Ala-Fibrillierungskinetik. ANS-Fluoreszenz in Gegenwart von Fibrillenkeimen. Inkubation von 1 mM Protein ohne (schwarz) und in Gegenwart von 0,6 M (blau) bzw. 1,2 M (grün) des jeweiligen Salzes.

Als nächstes wurden die Effekte von Sulfat, Chlorid und Nitrat mit Natrium als Gegenion analysiert (Abb.4.39). Die Natriumsalze zeigten einen vergleichbare Wirkung wie die Ammoniumsalze. Sulfat beschleunigte um mehr als 200 % die Fibrillierung im Vergleich zur Kontrolle. Die Einflüsse von NaCl und NaNO₃ waren vergleichbar zu denen der Ammoniumsalze. In Gegenwart von 0,6 M Natriumchlorid bzw. -nitrat waren die initiale Fibrillierungsgeschwindigkeiten ähnlich der Fibrillenbildung in Abwesenheit der Salze. Durch 1,2 M Natriumchlorid bzw. -nitrat wurde eine Beschleunigung um das Zwei- bis Dreifache der Fibrillierung beobachtet.



Abb. 4.39: Einfluss von Na₂SO₄ (A), **NaCl** (B) **und NaNO₃** (C) **auf die N-(+7)Ala-Fibrillierungskinetik.** ANS-Fluoreszenz in Gegenwart von Fibrillenkeimen. Inkubation von 1 mM Protein ohne (schwarz) und in Gegenwart von 0,6 M (blau) bzw. 1,2 M (grün) des jeweiligen Salzes.

Durch RP-HPLC-Analysen konnte kein Einfluss auf die Menge an gebildeten Fibrillen durch die verwendeten Salze festgestellt werden. Die Morphologie der Fibrillen wurde durch die Salze ebenfalls nicht beeinflusst. Deswegen sind stellvertretend für die hier untersuchten Salze lediglich die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Fibrillen, welche sich in

Gegenwart von Ammoniumsulfat gebildet hatten, im Vergleich zu den Fibrillen ohne Salz gezeigt (Abb. 4.40).



Abb. 4.40: EM-Aufnahmen der N-(+7)Ala-Fibrillen in Gegenwart von Fibrillenkeimen. Inkubation von 1 mM Protein bei 37°C **A:** ohne und in Anwesenheit von **B:** 0,6 M und **C:** 1,2 M (NH₄)₂SO₄.

4.6.2.2 Einfluss von Kationen

Die N-PABPN1 enthält neben der Polyalaninsequenz 24 Glutaminsäure- sowie vier Asparaginsäurereste. Der isoelektrische Punkt liegt bei ca. 4,6. Die Fibrillenbildung wurde bei neutralem pH-Wert analysiert. Das Protein besitzt also eine hohe negative Ladung. Deswegen wurde neben den Anionen auch der Effekt von Kationen auf die Fibrillenbildung von N-(+7)Ala untersucht. Es wurde der Einfluss von Ammonium- und Natriumnitrat auf die Fibrillenbildung in Gegenwart von *seeds* untersucht (Abb. 4.41).



Abb. 4.41: Einfluss von Kationen auf die N-(+7)Ala-Fibrillierungskinetik. ANS-Fluoreszenz in Gegenwart von Fibrillenkeimen. Inkubation von 1 mM Protein bei 37°C ohne (schwarz) und mit 0,6 M NaNO₃ (blau) oder NH₄NO₃ (grün).

Die Unterschiede der Kationen in Bezug auf die Beeinflussung der Fibrillierungsgeschwindigkeit waren nicht so ausgeprägt wie bei den Anionen. In Gegenwart

von Natrium wurde die initiale Fibrillierungsgeschwindigkeit leicht beschleunigt, während Ammonium keinen Effekt auf die Fibrillenbildung zeigte. Ammoniumionen könnten aufgrund ihrer Größe die Anlagerung von Proteinmolekülen an die Fibrille bzw. *seeds* stören.

4.6.2.3 Einfluss von Arginin

Arginin wird häufig bei in vitro-Renaturierungen als Zusatz zur Verhinderung der amorphen Proteinaggregation verwendet (DeBernadez Clark et al., 1999; Reddy et al., 2005). Deshalb wurde der Effekt von Argininhydrochlorid und -sulfat auf die Fibrillenbildung von N-(+7)Ala untersucht. Argininhydrochlorid führte in denselben Konzentrationen wie die Salze zu einer 50 % (Abb. 4.42A). Verlangsamung der Fibrillenbildung um ca. Aus den Fluoreszenzmessungen in Gegenwart von Argininhydrochlorid ging hervor, dass neben der initialen Fibrillierungsgeschwindigkeit auch die Fluoreszenzintensität verringert war. Nach Erreichen der maximalen ANS-Fluoreszenz, gekennzeichnet durch ein Plateau, wurden die löslichen Fraktionen durch RP-HPLC analysiert. Dabei wurden ca. 30 % nicht fibrilliertes N-(+7)Ala detektiert (Abb. 4.42B). Die Kontrollansätze dagegen beinhalteten kaum noch monomeres N-(+7)Ala. Durch RP-HPLC-Analyse wurde bestätigt, dass Argininhydrochlorid die Menge an gebildeten Fibrillen insgesamt reduzierte.



Abb. 4.42: Einfluss von Argininhydrochlorid auf die N-(+7)Ala-Fibrillenbildung. 1 mM Protein wurde bei bei 37°C ohne (schwarz) und in Anwesenheit von 0,6 M (blau) und 1,2 M (grün) Arginin inkubiert, **A:** ANS-Fluoreszenz **B:** RP-HPLC-Analyse der löslichen Fraktion nach der Fibrillierung.

Um den Effekt von Arginin in Verbindung mit Sulfationen zu testen, wurde die Fibrillierung in Gegenwart von Argininsulfat untersucht (Abb. 4.43). Dazu wurde Arginin als freie Base

verwendet und mittels Schwefelsäure der pH-Wert eingestellt. Es konnte festgestellt werden, dass bei einer Konzentration von 0,6 M Argininsulfat die initiale Fibrillierungsgeschwindigkeit gegenüber der Kontrolle um ²/₃ verlangsamt wurde. In Gegenwart von 1,2 M konnte allerdings eine Beschleunigung der Fibrillenbildung um fast das Doppelte gemessen werden. Bei RP-HPLC-Analysen der löslichen Fraktionen nach 27 Tagen Inkubation wurde beobachtet, dass in Gegenwart von 0,6 M Argininsulfat noch 60 % des eingesetzten Proteins als lösliche monomere Spezies vorlagen (Abb. 4.43B). Mit 1,2 M Argininsulfat wurde dagegen nur 20 % monomeres Protein detektiert. Im Kontrollansatz konnte ungefähr 40 % des eingesetzten N-(+7)Ala als nicht fibrilliertes Protein bestimmt werden (Abb. 4.43B). Der Einfluss von Argininsulfat beruht demnach eventuell auf zwei verschiedenen Effekten. Arginin verzögert wahrscheinlich die Fibrillenbildung aufgrund seiner Löslichkeitsfördernden Eigenschaften, während die Sulfationen vermutlich die Fibrillenbildung beschleunigen, eventuell durch eine stabilisierende Wirkung auf die Fibrillenstruktur oder mögliche Intermediate. Eine geringere Konzentration an Sulfationen, wie zum Beispiel bei 0,6 M, reicht nicht aus, um den Effekt des Arginins zu kompensieren. Die Fibrillenbildung wird also verzögert.

Trotz der stark unterschiedlichen Effekte von Argininhydrochlorid und Argininsulfat auf die initiale Geschwindigkeit der Fibrillenbildung und die Menge an gebildeten Fibrillen konnte durch eine elektronenmikroskopische Analyse keine veränderte Fibrillenmorphologie bei den Ansätzen mit den Argininsalzen im Vergleich zu den Kontrollansätzen beobachtet werden.



Abb. 4.43: Einfluss von Argininsulfat auf die N-(+7)Ala-Fibrillenbildung. 1 mM Protein wurde bei bei 37°C ohne (schwarz) und in Anwesenheit von 0,6 M (blau) und 1,2 M (grün) Arginin inkubiert, A: ANS-Fluoreszenz
B: RP-HPLC-Analyse der löslichen Fraktion nach der Fibrillierung.

4.6.3 Einfluss von niedermolekularen Substanzen auf die Fibrillenbildung

Am Ende des Kapitels wird der Effekt von Trehalose und Doxycyclin auf die Fibrillierung von N-(+7)Ala beschrieben. In der Literatur wird aufgezeigt, dass diese und ähnliche Substanzen, wie beispielsweise Curcumin, die Fibrillenbildung von Proteinen beeinflussen (Tagliavini *et al.*, 2000; Forloni *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2005; Ono & Yamada, 2006). Bei Tierversuchen mit transgenen Mäusen wurde ein therapeutischer Effekt der Substanzen bei Huntigton und OPMD beobachtet (Tanaka *et al.*, 2004; Davies *et al.*, 2006; Fan *et al.*, 2007).

4.6.3.1 Effekt von Trehalose

Mehrere *in vivo*-Studien an Mäusen konnten zeigen, dass Trehalose zu einer Verbesserung der Symptome von Chorea Huntington und OPMD führt (Tanaka et al., 2004; Davies et al., 2006). Trehalose verhindert ebenfalls die Aggregation von Proteinen bei Hitzestress in vitro und in vivo (Singer & Lindquist, 1998; Arora et al., 2004; Chen et al., 2005). Bei Koinkubation von N-(+7)Ala und Trehalose ohne Fibrillenkeime wurde allerdings eine Beschleunigung der Fibrillierung beobachtet (Abb. 4.44A). Trehalose hatte nicht nur einen Effekt auf die lag phase, sondern auch auf die Fibrillenverlängerung. Bei einer Trehalose-Konzentration von 0,25 M konnte die Fibrillierungsgeschwindigkeit verdoppelt und die lag phase sogar um das Fünffache verringert werden. Mit einer Konzentration von 0,5 M wurde die lag phase ähnlich wie mit 0,25 M verkürzt, aber die Fibrillenverlängerung war langsamer. Möglicherweise sind diese Effekte auf eine zu hohe Viskosität zurückzuführen. Um den Einfluss von Trehalose auf das Fibrillenwachstum genauer zu analysieren, wurde die Fibrillierung in Gegenwart von Trehalose und seeds untersucht (Abb. 4.44B). Es wurde mit geringeren Trehalose-Konzentrationen gearbeitet, um eine zu hohe Viskosität zu unterbinden. Dabei konnte allerdings nur eine marginale Beschleunigung der initialen Fibrillierungsgeschwindigkeit beobachtet werden. Trehalose zeigt also hauptsächlich einen fördernden Effekt auf die Bildung von Fibrillenkeimen und weniger auf die Fibrillenverlängerung.



Abb. 4.44: Einfluss von Trehalose auf die N-(+7)Ala-Fibrillenbildung. A: Fibrillenbildung in Abwesenheit von *seeds* mit 1 mM N-(+7)Ala (schwarz) bei 0,25 M (blau) oder 0,5 M Trehalose (grün). **B:** Fibrillenbildung in Gegenwart von *seeds* mit 1 mM N-(+7)Ala (schwarz) bei 0,1 M (blau) oder 0,3 M Trehalose (rot).

Die Fibrillen wurden durch Elektronenmikroskopie analysiert (Abb. 4.45). Eine veränderte Morphologie, verursacht durch die Koinkubation von Trehalose, konnte wiederum nicht beobachtet werden.



Abb. 4.45: EM-Aufnahmen der N-(+7)Ala-Fibrillen. Inkubation von 1 mM N-(+7)Ala A: in Abwesenheit von *seeds* bei 37°C, B: mit 0,25 M oder C: 0,5 M Trehalose.

4.6.3.2 Effekt von Doxycyclin

In der Literatur wird auch der positive Einfluss von Tetracyclin-Antibiotika auf die Symptome von amyloiden Krankheiten beschrieben (Chen *et al.*, 2000; Davies *et al.*, 2005; Cardoso & Saraiva, 2006; Fan et al., 2007). Um den Effekt eines Tetracyclin-Derivates auf die in vitro-Fibrillierung von N-(+7)Ala zu untersuchen, wurde Doxycyclin im molaren Verhältnis von 1:1 mit N-(+7)Ala koinkubiert. Es wurde eine Verkürzung der lag phase um fast das Dreifache beobachtet (Abb. 4.46A). Das Fibrillenwachstum wurde ebenfalls leicht durch Doxycyclin beeinflusst. Um den Effekt von Doxycyclin auf die Fibrillierungsgeschwindigkeit zu analysieren, wurde die Fibrillenbildung in Anwesenheit von

seeds untersucht. Bei der Fibrillierung in Gegenwart von seeds wurde eine Verminderung der maximalen ANS-Fluoreszenzintensität beobachtet (Abb. 4.46B). Die initiale Fibrillierungsgeschwindigkeit wurde durch Doxycyclin nicht beeinflusst. Eine RP-HPLC-Analyse der löslichen Fraktionen ergab allerdings keine Unterschiede in der Menge der gebildeten Fibrillen. Eventuell bindet Doxycyclin an ANS und beeinflusst dadurch die Fluoreszenz. Bei Inkubation des Doxycyclins unter Fibrillierungsbedingungen in Abwesenheit von N-(+7)Ala wurde ebenfalls eine leichte Verschiebung der ANS-Fluoreszenz detektiert, ähnlich der bei der Fibrillenbildung. Doxycyclin hat demnach einen Einfluss auf die ANS-Bindung und dadurch kann der Effekt auf das Fibrillenwachstum nicht genau analysiert werden.



Abb. 4.46: Einfluss von Doxycyclin auf die N-(+7)Ala-Fibrillenbildung. Fibrillenbildung von 1 mM N-(+7)Ala (schwarz) und in Gegenwart von 1 mM Doxycyclin (blau) **A:** Abwesenheit von *seeds*, **B:** Gegenwart von *seeds*.

Die Fibrillen wurden durch Elektronenmikroskopie analysiert. Es konnten jedoch kaum Unterschiede zu den Kontrollfibrillen beobachtet werden (Abb. 4.47).



Abb. 4.47: EM-Aufnahmen der N-(+7)Ala-Fibrillen. Inkubation von A: 1 mM N-(+7)Ala ohne und B: mit 1 mM Doxycyclin.

5 Diskussion

Die Bildung von fibrillären Strukturen unterschiedlicher Proteine wird mit einer Vielzahl von Krankheiten, wie beispielsweise *Chorea Huntington, Morbus Alzheimer* und *Morbus Parkinson*, in Verbindung gebracht (Xing & Higuchi, 2002; *reviews:* Everett & Wood, 2004; Liu, 2006; Finder & Glockshuber, 2007). Die Mechanismen, die zu fibrillären Strukturen führen, sind aber bis jetzt nahezu ungeklärt. Im Zusammenhang mit der Okulopharyngealen Muskeldystrophie (OPMD) wurden fibrilläre Strukturen in Kernen von Muskelzellen gefunden (Tomé & Fardeau, 1980; Brais *et al.*, 1998). Es handelt sich dabei um amyloide Ablagerungen verschiedener PABPN1-Mutanten, die eine um bis 7 Alanine verlängerte Polyalaninsequenz aufweisen. Ob die fibrillären Strukturen die Ursache für die Symptome oder nur eine Begleiterscheinung sind, wird in der Literatur momentan kontrovers diskutiert. Einige Arbeitsgruppen sind der Meinung, dass PABPN1 in fibrillären Strukturen der Auslöser für die Symptome von OPMD ist (Abu-Baker & Rouleau, 2006). Hingegen argumentieren Chartier und Mitarbeiter, aufgrund von Studien mit transgenen *Drosophila melanogaster*, dass die Fibrillenbildung nicht die Ursache für die OPMD-Symptome darstellt (Chartier *et al.*, 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde *in vitro* die Fibrillenbildung von PABPN1 näher charakterisiert. Die Untersuchungen zur Fibrillierung wurden ausschließlich mit der N-terminalen Domäne von PABPN1 durchgeführt, da das vollständige PABPN1 eine starke Tendenz zur amorphen Aggregation zeigte (Scheuermann *et al.*, 2003). Die Charakteristik der Fibrillenbildung und die Eigenschaften der gebildeten Fibrillen von N-WT und der Insertionsmutante N-(+7)Ala wurden miteinander verglichen. In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die *lag phase* der Fibrillierung durch Verlängerung der Polyalananinsequenz verkürzt wird (Scheuermann *et al.*, 2003). Die Analyse der *in vitro*-Fibrillenbildung von N-PABPN1 lässt jedoch keine direkten Rückschlüsse auf die amyloiden Ablagerungen bei OPMD-Patienten zu. Durch Zellkulturexperimente wurde gezeigt, dass die amyloiden Ablagerungen aus Patientengewebe neben PABPN1 auch noch andere zelluläre Komponenten, wie beispielsweise Chaperone und RNA, enthalten (Calado *et al.*, 2000; Bao *et al.*, 2002; Brais, 2003; Abu-Baker *et al.*, 2003). Es ist bisher nicht klar, ob und auf welche Weise die Proteine und Nukleinsäuren die Fibrillenbildung beeinflussen. Des Weiteren ist die

genaue Proteinkonzentration von PABPN1 innerhalb der Zelle und auf subzellulärer Ebene nicht bekannt.

5.1 Einfluss von *seeds* auf die Fibrillierung von N-PABPN1

Es wird allgemein vermutet, dass sich die Fibrillenbildung aus mindestens zwei Reaktionen zusammensetzt. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist die Bildung eines Nukleationskeimes, anschließend erfolgt die Fibrillenverlängerung. Eine Beschleunigung der Fibrillenbildung wird durch die Zugabe von Fibrillenkeimen (*seeds*) durch Eliminierung der *lag phase* erreicht (Scheuermann *et al.*, 2003).

Ähnlich der Fibrillierungen ohne *seeds* wurde ebenfalls bei Experimenten mit Fibrillenkeimen eine langsamere Fibrillenbildung bei N-WT gegenüber N-(+7)Ala beobachtet. Demnach wird durch Verlängerung der Polyalaninsequenz, wie bereits erwähnt, nicht nur die lag phase verkürzt, sondern auch die Elongation der Fibrillen gegenüber N-WT beschleunigt. Es wurden außerdem Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Fibrillenbildung von N-WT und N-(+7)Ala festgestellt. Bei der Fibrillenbildung von N-WT in Gegenwart von seeds wurde im Gegensatz zu N-(+7)Ala selbst nach 100 Tagen kein Plateau in der ANS-Fluoreszenz beobachtet. Die RP-HPLC-Analysen der löslichen Fraktion des Fibrillierungsansatzes zeigten eine stetige, nahezu lineare Abnahme der Monomerkonzentration, die auch zum Ende des Experiments nach 50 Tagen kein Plateau erreicht hatte. Nach dieser Zeit wurde noch 60 % des eingesetzten N-WT in der löslichen Fraktion detektiert. Im Gegensatz hierzu wurde bei der induzierten Fibrillierung von N-(+7)Ala bereits nach zehn Tagen ein Plateau des ANS-Signals beobachtet. Analysen der löslichen Fraktion mittels RP-HPLC bestätigten die Fibrillenbildung durch die Abnahme der monomeren Spezies während der Inkubation. Gleichzeitig mit Erreichen des Plateaus der ANS-Fluoreszenz wurde keine weitere Abnahme des Proteins in der löslichen Fraktion beobachtet und die Fibrillenbildung somit als abgeschlossen betrachtet. Allerdings lagen zu diesem Zeitpunkt noch ungefähr 20 % des eingesetzten Proteins als Monomer vor. Bei der Fibrillenbildung des Aβ-Peptids, von Immunoglobulin sowie von Glugacon beispielsweise wurde ebenfalls nicht-fibrilliertes Protein nach Beendigung der Fibrillierungsreaktion detektiert. Es wird deswegen ein Gleichgewicht zwischen monomerer und fibrillärer Form diskutiert (Jarret & Lansbury, 1992; Hasegawa et al., 1999; Khurana et al., 2001; Pedersen et al., 2006a). Bei den Experimenten mit N-PABPN1 konnte jedoch kein Gleichgewicht zwischen Monomer und Fibrille nachgewiesen werden (siehe dazu auch Abschnitt 5.4). Bei dem nicht-fibrillierten Protein könnte es sich daher um modifiziertes oder fehlerhaftes Protein handeln, welches keine Fibrillenstruktur ausbilden kann. Eventuell verändern sich aber auch die Fibrillenenden so, dass sie nicht mehr aktiv sind und sich kein weiteres Protein anlagern kann. Eine Inkubation der Fibrillen mit frischem Protein könnte Aufschluß darüber geben, ob die unvollständige Fibrillierung durch den Verlust der "aktiven Enden" oder durch eine Modifizierung des löslichen Proteins verursacht wurde.

Der Einfluss von *seeds* auf die Fibrillenbildung von N-(+7)Ala wurde näher analysiert. Dabei wurde beobachtet, dass die initiale Fibrillierungsgeschwindigkeit linear mit steigender *seed*-Konzentration zunahm. Mit zunehmender Konzentration an Fibrillenkeimen waren mehr "aktive Enden" bzw. fibrilläre Strukturen vorhanden, an denen sich weiteres Protein anlagern konnte. Mit zunehmender *seed*-Konzentration traten verstärkt verkürzte Fibrillen auf, wahrscheinlich aufgrund der erhöhten Anzahl an "aktive Enden".

Die Aktivität der seeds war teilweise großen Schwankungen unterworfen, was sich in den Kinetiken der jeweiligen Fibrillierung widerspiegelte. Da die Fibrillenkeime durch Ultraschall aus vollständigen Fibrillen hergestellt wurden, variierten trotz Standardisierung der Bedingungen Menge und Größe der Fragmente erheblich. Des Weiteren konnte die Anzahl der "aktiven Enden" der seeds nicht bestimmt werden. Unter diesen Aspekten muss auch der Vergleich zwischen heterologem und homologem seeding kritisch betrachtet werden. Um die Ergebnisse zur seed-vermittelten Fibrillierung besser miteinander vergleichen zur können, stammten die seeds einer Konzentrationsreihe von einer Präparation. Analog zu seeding-Experimenten wurde auch für cross-seeding ein konzentrationsabhängiger Einfluss auf die Fibrillenbildung beobachtet. Die initialen Fibrillierungsgeschwindigkeiten bei homologem seeding waren jedoch doppelt so groß wie bei heterologem seeding. Für das Aβ-Peptid wurde ebenfalls eine veränderte Charakteristik der Fibrillenbildung nach cross-seeding beschrieben (Hasegawa et al., 1999; O'Nuallain et al., 2004). Die Ursache für die Unterschiede von homologem und heterologem seeding kann auf zwei Gründen beruhen: Zum einen könnte die Anzahl der "aktiven Enden" der verwendeten Fibrillenkeime je nach seed-Präparation variieren. Außerdem sind strukturelle Unterschiede von N-WT- und N-(+7)Ala-seeds möglich, wodurch die Anlagerung von beispielsweise löslichem N-(+7)Ala an N-WT-seeds gegenüber der Anlagerung an N-(+7)Ala-seeds erschwert wird. Da jedoch bei allen Experimenten eine langsamere Fibrillierung beim cross-seeding als bei homologem seeding beobachtet wurde, sind die verschiedenen Fibrillierungsgeschwindigkeiten wahrscheinlich nicht auf die unterschiedlichen *seed*-Präparationen zurückzuführen. Mögliche strukturelle Unterschiede zwischen N-WT- und N-(+7)Ala-*seeds* konnten mittels EM oder AFM jedoch nicht nachgewiesen werden (siehe dazu auch Abschnitt 5.2).

Bei gleichem prozentuallen Anteil an *seeds* beeinflusste die eingesetzte Proteinkonzentration die Ausbeute an gebildeten Fibrillen. Eine Erhöhung der Proteinkonzentration oder eine erneute Inkubation der Fibrillen mit löslichem Protein resultierte bei konstanter *seed*-Konzentration in längeren, fibrillären Srukturen. Demnach wurden keine neuen Nukleationskeime gebildet, sondern die vorhandenen *seeds* verlängert. Wie zu erwarten, führte eine Erhöhung der Proteinkonzentration auch zu einer Beschleunigung des Fibrillenwachstums.

5.2 Einfluss der Länge der Polyalaninsequenz auf die Fibrillenstruktur

Die Anzahl, Größe und Anordnung der Protofilamente der Fibrillenstruktur variieren abhängig vom Fibrillentyp (Jiménez et al., 1999; Champerlain et al., 2000). Die meisten Fibrillen besitzen längs der Fibrillenachse eine Eigendrehung, hauptsächlich wurde eine linksgängige Drehung aufgrund der L-Aminosäuren beschrieben (Champerlain et al., 2000; Jiménez et al., 2002, Makin & Serpell, 2005). Bei einigen Proteinen wurde sogar mehr als eine Fibrillenform beobachtet (Jiménez et al., 2002; Antzutkin, 2004). Vor diesem Hintergrund ist eine veränderte Fibrillenstruktur von N-PABPN1 durch die Verlängerung der Polyalaninsequenz um 70 % vorstellbar. AFM-Analysen ergaben für N-WT eine Kettenähnliche Fibrillenmorphologie, während die Fibrillen von N-(+7)Ala eine glatte Struktur zeigten. Durch eine Oberflächenanalyse der N-WT-Fibrillen wurden Segmente einer definierten Breite von 35 nm längs der Fibrillenachse identifiziert. Die Ketten-ähnliche Struktur, wie sie beim N-WT vorlag, ist auch für andere Fibrillentypen beschrieben (Khurana et al., 2001). Es wird davon ausgegangen, dass diese Struktur aufgrund der Eigendrehung längs der Fibrillenachse entsteht (Goldsbury et al., 1997; Antzutkin, 2004). Ein solches Segment der Fibrillenoberfläche mit definierter Breite könnte eventuell eine Umdrehung längs der Fibrillenachse darstellen. N-(+7)Ala-Fibrillen besitzen aufgrund der glatten Oberfläche demnach keine Eigendrehung oder die Drehung ist sehr gestreckt. Ketten-ähnliche Strukturen der Fibrillen können auch dadurch gebildet werden, dass Protofilamente sich umeinander winden (Jiménez *et al.*, 2002). Ein Hinweis auf Protofilamente innerhalb der Fibrille konnte allerdings weder bei N-WT noch bei N-(+7)Ala gefunden werden.

Einen weiteren Hinweis auf verschiedene Fibrillenstrukturen von N-WT und N-(+7)Ala lieferten die Fibrillierungsexperimente in Anwesenheit von seeds. Die initiale Geschwindigkeit der Fibrillenbildung von N-(+7)Ala beim homologen seeding war schneller als beim *cross-seeding*. Bei identischer *seed*-Struktur der Varianten wäre kein Unterschied in den Fibrillierungsgeschwindigkeiten aufgetreten. Wenn N-WT-seeds eine andere Struktur als N-(+7)Ala-seeds besitzen, stellt sich die Frage: Welche Struktur nimmt das fibrillierende Protein an? In der Literatur wurde darüber schon ausführlich diskutiert. Es gibt gegensätzliche Beobachtungen; bei einigen Proteinen wurde festgestellt, dass die seeds die Struktur der Fibrillen bestimmen (O'Nuallain et al., 2004; Pedersen et al., 2006a). Es gibt aber auch Arbeiten, die zeigen, dass die monomere Spezies und nicht der seed die Morphologie der Fibrille diktiert (Hasegawa et al., 1999). Eine AFM-Analyse der durch N-(+7)Ala verlängerten N-WT-seeds lieferte keine Hinweise darauf, dass die Fibrillenstruktur durch die seeds bestimmt wird. Bei den so entstandenen Fibrillen konnte keine Ketten-ähnliche Struktur, wie sie bei N-WT-Fibrillen gezeigt werden konnte, beobachtet werden. Im Kontrollexperiment wurden N-(+7)Ala-seeds durch N-WT verlängert. Überraschender Weise konnten die erwarteten Ketten-ähnlichen Strukturen der Fibrillen nicht nachgewiesen werden. Letztlich konnten diese Versuche beide in der Literatur diskutierten Mechanismen nicht bestätigen. Eventuell waren die verlängerten seeds zu kurz, um strukturellen Unterschiede durch AFM nachzuweisen.

5.3 Stabilität der Fibrillen

In Abhängigkeit von der Länge der Polyalaninsequenz wurde die Morphologie der Fibrille beeinflusst. Analog zu den Untersuchungen zur Fibrillenstruktur sollte deswegen analysiert werden, ob die verschiedenen Fibrillentypen auch eine unterschiedliche chemische Stabilität besitzen. Durch frühere Arbeiten von Till Scheuermann konnte gezeigt werden, dass die Fibrillen von N-PABPN1 gegenüber hohen Konzentrationen (bis 6 M) des Denaturierungsmittels Guanidinhydrochlorid resistent sind (Dissertation Till Scheuermann, 2003). Im Rahmen dieser Arbeit wurde deswegen die Resistenz der Fibrillen gegenüber Guanidiniumthiocyanat näher untersucht. Die Fibrillen besaßen auch gegenüber GdmSCN eine hohe Stabilität. Bei GdmSCN-Konzentrationen unterhalb von 4 M zeigten die N-(+7)Ala-Fibrillen eine höhere chemische Stabilität als N-WT-Fibrillen. Allerdings konnte unabhängig vom Fibrillentyp, N-(+7)Ala oder N-WT, maximal nur 50 % der Fibrillen solubilisiert werden. Eine Ursache dafür könnte sein, dass die Struktur innerhalb einer Fibrille nicht homogen ist. Möglicherweise sind die Fibrillen an den Enden mehr zugänglich und damit weniger resistent als im mittleren Teil der Fibrillenstruktur. Um eine bessere Solubilisierung der Fibrillen zu erreichen, wurden die Fibrillen bei 50°C über einen längeren Zeitraum solubilisiert. Bei N-WT-Fibrillen wurde dadurch die maximale Auflösung mit bereits 1 M GdmSCN erreicht, während bei N-(+7)Ala mit steigender GdmSCN-Konzentration wieder ein stetiger Anstieg der Menge an solubilisierten Fibrillen erfolgte. Oberhalb von 4 M GdmSCN konnte keine weitere Auflösung der Fibrillen erreicht werden.

Eine Ursache für die unvollständige Auflösung der Fibrillen könnte die Ausbildung von mehreren Fibrillentypen unterschiedlicher Stabilität sein. Bei Insulin beispielsweise wurden unterschiedliche Fibrillentypen beobachtet (Jiménez *et al.*, 2002). Bei Fibrillen von N-PABPN1 konnten allerdings weder durch AFM noch Elektronenmikroskopie unterschiedliche Fibrillenstrukturen beobachtet werden. Dennoch können Unterschiede auf atomarer Ebene nicht ausgeschlossen werden, da die Fibrillen lediglich optisch untersucht wurden.

Fibrillen Solubilisierung der könnte teilweise auch auf Die unvollständige Messungenauigkeiten beruhen. Die Proteinmenge innerhalb der Fibrillen konnte nur indirekt bestimmt werden. Der Anteil von nicht-fibrilliertem Protein wurde quantitativ durch RP-HPLC ermittelt und daraus die Proteinmenge in den Fibrillen berechnet. Eventuelle Verluste durch Assoziation der Proteine oder Fibrillen an Gefäßwänden wurden dadurch nicht berücksichtigt. Durch diese Methode war es schwierig, eine genaue Aussage über die Proteinmenge innerhalb der Fibrillen zu treffen, was eine quantitative Analyse der Solubilisierung der Fibrillen ebenfalls beeinträchtigte. Fehler bei der Bestimmung des nichtfibrillierten Proteins durch RP-HPLC könnten auch dadurch entstehen, dass solubilisiertes Protein durch hydrophobe Wechselwirkungen auf der Säule gebunden blieb und die prozentuale Berechnung von solubilisiertem Protein verfälscht wurde.

Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen der nicht-solubilisierten Fraktion konnten eindeutig Fibrillenfragmente beobachtet werden. Es kann daher mit Sicherheit gesagt werden, dass Fibrillenfragmente stabil gegenüber GdmSCN waren. Ein weiterer Hinweis darauf, dass nach der Solubilisierung noch intakte Fibrillen bzw. Fragmente vorhanden waren, lieferte die Koinkubation von GdmSCN-resistenten Fibrillen mit monomerer Spezies. Dabei wurde eine beschleunigte Fibrillenbildung im Vergleich zur "nicht-geseedeten" Fibrillierung beobachtet. Das Experiment bestätigte, dass die stabilen Fragmente "aktive Enden" ähnlich der durch Ultraschall zerkleinerten Fibrillen hatten.

Um auszuschließen, dass sich während der Inkubation mit GdmSCN ein Gleichgewicht zwischen solubilisierten und nicht-solubilisierten Fibrillen bildete, wurden die nichtsolubilisierten Fibrillen ein zweites Mal mit 6 M GdmSCN inkubiert. Dadurch konnte allerdings kein weiteres Protein von den Fibrillen gelöst werden. Während der Solubilisierung bildete sich demnach kein Gleichgewicht zwischen löslichem Protein und Fibrillen aus.

Durch eine Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Solubilisierung wurde bestätigt, dass N-WT-Fibrillen weniger stabil gegenüber GdmSCN im Vergleich zu N-(+7)Ala-Fibrillen waren. Die maximale Auflösung der N-WT-Fibrillen wurde bereits nach 20 Minuten erreicht, während bei N-(+7)Ala-Fibrillen erst nach mehr als 20 Stunden kein weiteres, lösliches Protein erhalten wurde. Die Verlängerung der Polyalaninsequenz von zehn auf 17 Alanine beeinflusst demnach nicht nur die Fibrillenmorphologie, sondern auch die chemische Stabilität der Fibrillen. Durch die zusätzlichen Alanine ist die Hydrophobizität von N-PABPN1 vergrößert. Dadurch könnte die fibrilläre Struktur von N-(+7)Ala über stärkere hydrophobe Wechselwirkungen als die N-WT-Fibrillen stabilisiert sein. Die zusätzlichen Alanine könnten aber auch einen Einfluss auf die Packungsdichte der Proteinmoleküle innerhalb der Fibrille haben. Die Monomere der N-(+7)Ala-Fibrillen könnten gegenüber der N-WT-Fibrille enger gepackt sein und dadurch die Struktur besser stabilisieren.

Die solubilisierten Proteinfraktionen wurden durch RP-HPLC analysiert. Nach der Solubilisierung wurden allerdings neben den Peaks der monomeren Spezies weitere Peaks detektiert. Die zusätzlichen Peaks könnten durch Modifizierung der Varianten während der Fibrillenbildung oder Solubilisierung entstanden sein. Es könnte sich aber auch um Proteinfragmente bzw. Oligomere handeln, welche durch GdmSCN von den Fibrillen gelöst wurden. Aufgrund der verschiedenen Peaks der solubilisierten Fraktionen von N-WT und N-(+7)Ala lassen sich unterschiedliche Abbauprodukte der jeweiligen Fibrillentypen vermuten. Eine unterschiedliche Fibrillenmorphologie von N-WT und N-(+7)Ala resultiert demnach wahrscheinlich auch in verschiedenen Produkten nach Solubilisierung mit GdmSCN.

In einem weiteren Experiment sollte analysiert werden, ob die Temperatur während der Fibrillenbildung eine veränderte Fibrillenstabilität bewirkt. Es wurden bereits Temperaturabhängige Effekte bei Glucagonfibrillen beobachtet (Pedesen *et al.*, 2006a). Allerdings konnte im Gegensatz zu Glucagonfibrillen bei N-PABPN1 kein Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Fibrillenstabilität oder Fibrillenmorphologie beobachtet werden. Auf einen möglichen Einfluss von anderen Parametern auf die Fibrillenbildung, wie beispielsweise dem pH-Wert, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht eingegangen.

5.4 Untersuchung eines möglichen Gleichgewichts zwischen Fibrille und löslicher Spezies

Wie schon in Abschnitt 5.1 erwähnt, wird in der Literatur über ein Gleichgewicht zwischen monomerer Spezies und Fibrillen diskutiert (Jarret & Lansbury, 1992; Hasegawa et al., 1999; Khurana et al., 2001; Pedersen et al., 2006a). Bei meinen Untersuchungen war nach Beendigung der Fibrillenbildung immer noch lösliches Protein im Fibrillierungsansatz vorhanden. Deswegen sollte untersucht werden, ob sich auch im Falle von N-PABPN1 ein Gleichgewicht zwischen löslicher und fibrillierter Spezies während der Fibrillierung einstellt. Die N-PABPN1-Proteinkonzentration des nicht-fibrillierten Proteins lag oberhalb der für eine Fibrillenbildung kritischen Konzentration von 10 µM (Dissertation Till Scheuermann, 2003). Entgegen den Erwartungen zeigte nach Entfernung der bereits vorhandenen Fibrillen die lösliche Spezies allerdings keine Fibrillierung. Ein Gleichgewicht zwischen löslicher und fibrillärer Form kann die Tatsache, dass das Protein nicht vollständig in die Fibrillenstruktur übergeht, also nicht erklären. Eine andere Möglichkeit wäre eine Modifizierung des Proteins während der Inkubation oder Proteinreinigung, welche die Ausbildung fibrillärer Strukturen verhindern könnte. Eine MALDI-TOF-Analyse der löslichen Spezies nach Inkubation ergab allerdings keine Hinweise auf eine Modifizierung. Neben der monomeren Spezies wurden jedoch auch kleinere Proteinfragmente beobachtet. Die Proteinfragmente könnten sich an die Fibrillen anlagern oder mit anderen Monomeren assoziieren und damit die Fibrillenbildung inhibieren. Des Weiteren bildeten sich während der Fibrillierung oligomere Strukturen von N-PABPN1, welche ebenfalls die Fibrillenbildung unterdrücken könnten. Die oligomeren Strukturen hatten allerdings nur einen geringen Anteil an der Gesamtproteinmenge der nichtfibrillierten Fraktion. Deswegen kann die Assoziation der Monomere nicht als einzige Ursache für die Tatsache, dass nicht alles in die Fibrillenstruktur umlagerte, verantwortlich sein.

5.5 Suche nach möglichen Intermediaten der Fibrillierung

Die komplexen Prozesse einer Fibrillenbildung sind noch ungeklärt. Zum Mechanismus der Fibrillierung existieren zurzeit verschiedene Modelle (Kelly, 2000; Nguyen & Hall, 2005). Bei α -Synuclein, A β -Peptid, β_2 -Microglobulin sowie Immunoglobulin konnten Intermediate der Fibrillierung nachgewiesen werden (Kaylor et al., 2005; Watson et al., 2005; Jahn et al., 2006; Qin et al., 2007). Während der Inkubation von N-PABPN1 bei 37°C wurde die Bildung oligomerer Strukturen anhand von SDS-PAGE beobachtet. Diese Strukturen traten ebenfalls bei der Solubilisierung der Fibrillen mit GdmSCN auf. Durch Biotinylierung und N-terminale Ansequenzierung wurde bestätigt, dass es sich um N-PABPN1 und nicht um eine Verunreinigung durch andere Proteine handelte. Es wurde untersucht, ob diese Strukturen Intermediate der Fibrillenbildung darstellten. Die Oligomere bildeten sich im Gegensatz zu den Fibrillen unabhängig von der Anzahl der Alanine innerhalb von wenigen Tagen. Die Monomere waren demnach außerhalb der Polyalaninsequenz miteinander verknüpft. Eine kovalente Verknüpfung der Oligomere wurde nicht festgestellt. Ein Hinweis auf nichtkovalente Wechselwirkungen lieferte die Fibrillenbildung in Anwesenheit von hohen Salzkonzentrationen. Bei hohen Ionenstärken wurden keine oligomeren Proteinstrukturen während der Inkubation detektiert. Durch ANS-Fluoreszenz sowie EM konnte aber meist eine beschleunigte Fibrillenbildung in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen beobachtet werden. Die Oligomere sind demnach sehr wahrscheinlich keine Intermediate der Fibrillenbildung. Es ist allerdings ungeklärt, ob sich der Mechansimus der Fibrillenbildung bei hohen Ionenstärken von dem bei niedrigen Ionenstärken unterscheidet.

5.6 Modifizierung der Fibrillierungsreaktion von N-(+7)Ala

5.6.1 Einfluss von Proteinen und Peptiden auf die Fibrillenbildung

Die Fibrillenbildung von N-PABPN1 wurde *in vitro* lediglich unter sehr artifiziellen Bedingungen analysiert. Aufgrund der hohen Proteinkonzentration innerhalb einer Zelle ist allerdings eine gegenseitige Beeinflussung verschiedener Proteine gut vorstellbar. Deswegen wurde der Effekt verschiedener Proteine auf die Fibrillenbildung von N-(+7)Ala untersucht.

Der Einfluss der Deletionsmutante N-AAla, von RCMLA und Lysozym sowie des Polyalaninpeptids A₁₇KYK-NH₂ auf die Fibrillenbildung von N-(+7)Ala wurden analysiert. Durch die Verwendung der Deletionsmutante konnte der Einfluss der Aminosäuren außerhalb der Polyalaninsequenz auf die Fibrillenbildung bestimmt werden. Mit steigender N-AAla-Konzentration wurde eine stärkere Verzögerung der Fibrillierung beobachtet. Dabei beeinflusste die Deletionsmutante die Bildung eines Nukleationskeimes sowie das Fibrillenwachstum. Durch SDS-PAGE-Analysen wurde gezeigt, dass N-(+7)Ala und N-∆Ala, ähnlich der in Abschnitt 5.5 beschriebenen Strukturen, einen oligomeren Komplex bildeten (Diplomarbeit Rolf Sachs, 2005). Diese Komplexbildung verzögerte wahrscheinlich die N-(+7)Ala-Fibrillenbildung, da weniger "freies" Protein zur Verfügung stand. Es ist möglich, dass die Deletionsmutante mit N-(+7)Ala assoziierte, aber durch die fehlenden Alanine keine fibrilläre Struktur ausbilden konnte. Die gebildete Fibrillenmenge war in Gegenwart von N-ΔAla nicht verringert, eine Tatsache, die auf eine reversible Assoziation hindeutet. Die Fibrillenlänge Fibrillenmorphologie und wurden durch die Koinkubation der Deletionsmutante nicht beeinflusst. Bei einem nicht-reversiblen Komplex wären verkürzte Fibrillen aufgrund der Inhibierung des Fibrillenwachstums durch die Anlagerung eines N-AAla-Moleküls an ein Fibrillenende entstanden. Der einzige Unterschied zwischen N-(+7)Ala und N-∆Ala besteht in der Polyalaninsequenz, die Verzögerung der N-(+7)Ala-Fibrillenbildung durch N-AAla bestätigt, dass die Alanine essentiell für eine Fibrillenbildung von N-PABPN1 sind.

Um den Effekt anderer Proteine auf die Fibrillenbildung von N-(+7)Ala zu bestimmen, wurde der Einfluss von RCMLA und Lysozym auf die Fibrillierung analysiert. Beide Proteine haben mit 16,2 bzw. 14,4 kDa ein ähnliches Molekulargewicht wie N-(+7)Ala mit 14,7 kDa. RCMLA, ein Modell für ein entfaltetes Protein, liegt als *random coil*-Struktur vor (Palleros *et al.*, 1991; Tani *et al.*, 2003), während Lysozym eine kompakt gefaltete Proteinstruktur besitzt (Blake *et al.*, 1965). Munishkina und Mitarbeiter zeigten bereits eine Beschleunigung der Fibrillenbildung von Glucagon in Gegenwart von Lysozym und BSA. Dabei wurde argumentiert, dass der Effekt nicht auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den Proteinen, sondern auf einer Reduzierung des wässrigen Milieus (engl. *macromolecular crowding*) aufgrund der hohen Proteinkonzentrationen beruht (Munishkina *et al.*, 2004b). Unter den eingestellten Inkubationsbedingungen für die Fibrillierung wurde RCMLA

innerhalb von wenigen Tagen vollständig abgebaut. Eine Quantifizierung der Proteinmenge durch RP-HPLC nach abgeschlossener Fibrillenbildung war deswegen nicht möglich. Eine Aggregatbildung von RCMLA wurde ebenfalls beobachtet, welche die ANS-Fluoreszenzmessungen beeinträchtigte. Der Einfluss von RCMLA auf die Fibrillenbildung von N-(+7)Ala in Abwesenheit von *seeds* konnte deshalb nicht ausgewertet werden. In Anwesenheit von Fibrillenkeimen wurde die amorphe Aggregation von RCMLA unterdrückt. RCMLA beeinflusst die Fibrillenbildung von N-(+7)Ala dabei nicht. An *seeds* assoziiertes RCMLA war vor einem Abbau geschützt. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass RCMLA zum Teil mit in die Fibrillen eingebaut wurde.

In Anwesenheit von Lysozym und in Abwesenheit von Fibrillenkeimen konnten ähnlich wie mit RCMLA amorphe Aggregate während der Fibrillenbildung beobachtet werden. Durch Lysozym klebten die Fibrillen sehr stark aneinander, ähnlich der Protofilamente, wie sie für andere Fibrillentypen beschrieben worden (Jiménez *et al.*, 1999; Champerlain *et al.*, 2000; Jiménez *et al.*, 2002). In Gegenwart von *seeds* beeinflusste Lysozym die initialen Fibrillierungsgeschwindigkeiten von N-(+7)Ala kaum. Die Fibrillenmenge wurde allerdings in Anwesenheit von Lysozym reduziert. Lysozym lag fast ausschließlich in der nichtfibrillierten Fraktion vor. Das Fibrillenwachstum wurde also durch die Wechselwirkung von Lysozym und N-(+7)Ala-Monomeren verhindert.

Die Bildung von amorphen Aggregaten durch RCMLA und Lysozym erfolgte nur bei Inkubation der Proteine mit löslichem N-(+7)Ala. Bei der Fibrillierung mit *seeds* wurde kein Einfluss von RCMLA auf das Fibrillenwachstum beobachtet. Bei Kontrollversuchen, in denen nur RCMLA oder Lysozym inkubiert wurden, konnten weder Aggregate noch eine veränderte ANS-Fluorezenz beobachtet werden. RCMLA und Lysozym besaßen demnach in Gegenwart von löslichem N-(+7)Ala eine erhöhte Tendenz zur Aggregation. In Anwesenheit von *seeds* wurde diese Aggregation der Proteine unterdrückt. Bei anderen amyloiden Krankheiten wie *Chorea Huntington* oder Alzheimer wird postuliert, dass Intermediate der Fibrillenbildung wesentlich toxischer auf die Zellen wirkten als die fibrillären Strukturen (Watson *et al.*, 2005; Bodner *et al.*, 2006; Finder & Glockshuber, 2007). Analog dazu könnten auch bei N-PABPN1 die Nukleationskeime, die sich während der *lag phase* der Fibrillierung bilden, einen größeren Aggregations-fördernden Einfluss als *seeds* oder Fibrillen auf andere Proteine besitzen.

Die Fibrillenbildung von N-PABPN1 ist abhängig von der Anwesenheit der Polyalaninsequenz (Scheuermann *et al.*, 2003). Deswegen wurde der Einfluss des Polyalaninpeptids A₁₇KYK-NH₂ auf die Fibrillenbildung untersucht. Durch Inkubation des Peptids mit N-(+7)Ala-Protein wurde die Fibrillenbildung beschleunigt. Das Peptid beeinflusste neben der Nukleationskeimbildung (*lag phase*) auch die Fibrillenverlängerung.

Die gebildeten Fibrillen aus N-(+7)Ala und A₁₇KYK-NH₂ zeigten keine morphologischen Unterschiede zu "reinen" N-(+7)Ala-Fibrillen oder "reinen" Peptidfibrillen. HPLC-Analysen bestätigten den Einbau des Peptids in die Fibrillen. Aus den Experimenten geht nicht hervor, ob eine individuelle Fibrille Peptid und Protein enthält. Das Peptid könnte aufgrund einer schnelleren Umwandlung zur β -Faltblattstruktur einen *seed* für die Fibrillenstruktur des Proteins bilden. Es ist aber auch eine zeitgleiche Umlagerung von Peptid und Protein zur Fibrille möglich. Durch den beschleunigenden Effekt des Peptids auf die Fibrillenbildung von N-PABPN1 wurde die essentielle Rolle der Polyalaninsequenz bei der Fibrillenbildung nochmals bestätigt.

5.6.2 Einfluss von Salzen auf die Fibrillenbildung

Ein beschleunigender Einfluss von Anionen auf die *in vitro*-Fibrillenbildung wurde bereits für andere Proteine wie α -Synuclein, β_2 -Microglobulin und Glucagon beschrieben (Munishkina et al., 2004a; Raman et al., 2005; Pedersen et al., 2006a). In der Literatur wird dabei häufig der elektrostatische Effekt der Anionen als Ursache diskutiert (Munishkina et al., 2004a; Raman et al., 2005; Pedersen et al., 2006a). Der Einfluss der Anionen auf die Fibrillenbildung wurde allerdings bei millimolaren Salz-Konzentrationen analysiert. In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von Salzen bei molaren Konzentrationen untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass die Effektivität der getesteten Anionen nicht mit der Elektroselektivitäsreihe einherging (Baldwin, 1996), sondern mit der Hofmeisterserie (Hofmeister, 1888). Die Anionen beeinflussten die Fibrillenbildung analog ihrer Fähigkeit, die Hydrathülle der Proteine zu entziehen und dadurch die hydrophoben Wechselwirkungen zu verstärken, wodurch die fibrilläre Struktur begünstigt wurde. Die Fibrillierung wurde aus zeitlichen Gründen ausschließlich in Gegenwart von *seeds* untersucht, deswegen konnte der Effekt auf die Bildung von Nukleationskeimen nicht bestimmt werden. Andererseits konnte dadurch der Einfluss der Ionen auf die initiale Fibrillierungsgeschwindigkeit genauer quantifiziert werden. Sulfationen beschleunigten die Fibrillierung um ein Vielfaches, während Chlorid und Nitrat die Fibrillenbildung nur marginal beeinflussten (Tab. 5.1). Die doppelte Ionenstärke von Sulfat gegenüber Chlorid und Nitrat kann nicht für den beobachteten Effekt verantwortlich sein, da durch Sulfat eine weitaus größere Beschleunigung der Fibrillenbildung als Faktor zwei gegenüber den beiden anderen Anionen festgestellt wurde.

In Abbildung 5.1 sind die Nettoladungen der einzelnen Aminosäuren von N-(+7)Ala graphisch dargestellt. Dadurch wird deutlich, dass N-PABPN1 nur wenige positive Reste besitzt, die mit den Anionen in ionische Wechselwirkungen treten könnten. Die Salze bewirkten also eine Anionen-abhängige Beschleunigung der Fibrillierung von N-(+7)Ala, welche keinesfalls ausschließlich auf eine elektrostatische Interaktion zurückgeführt werden kann. Anhand von CD-Analysen konnte gezeigt werden, dass weder Sulfat noch ein anderes der verwendeten Salze die Sekundärstruktur von löslichem N-(+7)Ala beeinflusste. Die Ionen stabilisierten demnach mögliche Intermediate oder direkt die Fibrillen gegenüber der monomeren Struktur. In der Literatur ist bereits ein spezifischer Einfluss von Sulfationen auf die Fibrillenbildung des A β -Peptids beschrieben worden (Fraser *et al.*, 1992). Dabei konnten in Anwesenheit von geringen Sulfatkonzentrationen (bis 50 mM) Makrofibrillen beobachtet werden

Tab. 5.1: Beschleunigungsfaktor der initialen Fibrillierungsgeschwindigkeiten durch die verschiedenen Ionen gegenüber der Kontrolle (ohne Zugabe von Salzen). Die initiale Fibrillierungsgeschwindigkeit der Kontrolle wurde als 1 gesetzt.

		$\mathrm{SO_4}^{2-}$	Cl	NO ₃ ⁻
$\mathrm{NH_4}^+$	0.6 M	3.8	0.6	0.95
	1.2 M	(> 30)	1.3	1.2
Na ⁺	0.6 M	(> 200)	1.1	1.3
	1.2 M	(>300)	2.7	2.3
Arginin	0.6 M	0.3	0.4	
	1.2 M	1.8	0.5	

Wenn auch in weit geringerem Ausmaß als mit Anionen, konnte ebenfalls ein Kationenabhängiger Einfluss auf die Fibrillierung beobachtet werden. Bei der *in vitro*-Fibrillenbildung von α -Synuclein und Glucagon wurde ebenfalls eine Kationen-abhängige Beschleunigung festgestellt (Munishkina *et al.*, 2004a; Pedersen *et al.*, 2006b). Es wurde spekuliert, dass die Kationen die Coulomb-Kräfte gleich geladener Proteinmoleküle unterdrücken (engl. *Coulombic repulsion*) und dadurch die Fibrillenbildung beschleunigen (Munishkina *et al.*, 2004a). Des Weiteren wird beschrieben, dass organische Polykationen, wie Polylysin, zur Beschleunigung der Fibrillenbildung führen. Es wird vermutet, dass Polykationen Ladungsabstoßungen kompensieren und dadurch die Fibrillierung beschleunigt wird (Goers *et* *al.*, 2003). N-PABPN1 besitzt nach der Polyalaninsequenz 24 Glutamat- und 4 Aspartatreste. Der isoelektrische Punkt von N-PABPN1 liegt bei 4,6. Unter den Fibrillierungsbedingungen bei neutralem pH ist demnach N-(+7)Ala negativ geladen (Abb. 5.1). Eine Abschwächung der negativen Ladungen des Proteins durch die Kationen könnte eine Zusammenlagerung von Monomeren erleichtern und damit die Fibrillenbildung beschleunigen. Natriumionen zeigten dabei einen stärkeren Effekt als Ammoniumionen (Tab. 5.1). Die Größe der Ammoniumionen könnte die Anlagerung von Proteinmolekülen an die *seeds* räumlich behindern. Der Effekt der getesteten Salze auf die Fibrillenbildung von N-(+7)Ala beruht aber hauptsächlich auf dem Einfluss der Anionen, die Kationen spielen lediglich eine untergeordnete Rolle. Das molare Verhältnis der negativen Ladungen vom Protein zu den zugegebenen Kationen entsprach ca. 1:40. Aufgrund des molaren Überschußes der Kationen wirken vorwiegend Aussalzeffekte und nicht elektrostatische Wechselwirkungen auf die Fibrillenbildung.



Abb. 5.1: Verteilung der negativen und positiven Ladungen innerhalb der Aminosäuresequenz von N-(+7)Ala. Die Aminosäuren 1-20 zeigen den His-*tag* (blau), die Polyalaninesequenz (AS 21-43) ist rosa gekennzeichnet. Argininreste sind in rot, Lysinreste in blau, Aspartatreste in grün und Glutamatreste in schwarz dargestellt.

Neben verschiedenen Salzen wurde auch der Einfluss von Arginin auf die Fibrillenbildung analysiert. Arginin wird hauptsächlich bei der *in vitro*-Proteinfaltung eingesetzt, da die Aminosäure die Löslichkeit von Proteinen erhöht und damit eine Aggregation während der Proteinfaltung unterdrückt (DeBernadez Clark *et al.*, 1999; Reddy *et al.*, 2005). In Anwesenheit von Argininhydrochlorid wurde auch, wie erwartet, eine Verringerung der Fibrillenmenge sowie eine Verzögerung der initialen Fibrillierungsgeschwindigkeit aufgrund der Löslichkeits-fördernden Eigenschaften von Arginin beobachtet (Tab. 5.1). Arginginsulfat verursachte jedoch einen Konzentrations-abhängigen Effekt. In Gegenwart von 0,6 M

Argininsulfat wurde die Fibrillenbildung verzögert, während 1,2 M Argininsulfat die Fibrillierungsgeschwindigkeit beschleunigte. In Anwesenheit hoher Argininsulfat-Konzentrationen wurde die Fibrillenbildung wahrscheinlich durch gegenläufige Effekte beeinflusst. Arginin verzögert vermutlich die Fibrillenbildung durch die Erhöhung der Löslichkeit des Monomers, während die Sulfationen die Fibrillenbildung durch die Stabilisierung der Fibrillenstruktur beschleunigten (Hofmeister, 1888). Eine geringere Konzentration an Sulfationen, wie in Gegenwart von 0,6 M, kann den Effekt des Arginins nicht kompensieren und die Fibrillenbildung wird verzögert.

5.6.3 Einfluss von niedermolekularen Substanzen auf die Fibrillenbildung

Trehalose unterdrückt die Aggregation von Proteinen in vitro und stabilisiert Proteine unter Hitzestressbedingungen in vivo (Singer & Lindquist, 1998). Die thermodynamische Stabilität des ribosomalen Proteins S6 wird mit bis zu 0,8 M Trehalose stabilisiert (Chen et al., 2005). Die in vitro-Fibrillenbildung von Insulin wird ebenfalls durch Trehalose inhibiert (Arora et al., 2004). Eine Minderung der Symptome von OPMD sowie Chorea Huntington durch orale Verabreichung von Trehalose konnte bereits im Tiermodell gezeigt werden (Davies et al., 2006; Tanaka et al., 2004). Deswegen wurde der Effekt von Trehalose auf die in vitro Fibrillenbildung von N-(+7)Ala untersucht. Die Koinkubation mit 0,25 M Trehalose resultierte jedoch in einer Verkürzung der *lag phase* sowie in einer geringen Beschleunigung des Fibrillenwachstums. Trehalose bewirkt als Osmolyt bei Proteinen eine Strukturänderung durch Reduzierung der Lösungsmittel-exponierten Oberfläche (Xie & Timasheff, 1997; Qu et al., 1998). Die fibrilläre Struktur von N-PABPN1 könnte deswegen gegenüber dem löslichen, wenig strukturierten Monomer begünstigt sein. Bei den in vivo-Experimenten wurde allerdings immer mit dem vollständigen Protein gearbeitet. Das gesamte PABPN1 besitzt einen wesentlich größeren Anteil an Sekundär- sowie Tertiärstrukturen im Vergleich zu N-PABPN1. Deswegen könnte beim gesamten PABPN1 die native Struktur gegenüber der fibrillären Form stabilisiert sein.

Bei einer Verdopplung der Trehalose-Konzentration auf 0,5 M wurde die Bildung des Nukleationskeims ähnlich wie bei 0,25 M beschleunigt, die Fibrillenverlängerung aber etwas verzögert. Dieser Effekt könnte durch eine zunehmende Viskosität, aufgrund der hohen Trehalose-Konzentration, verursacht worden sein (Munishkina *et al.*, 2004b). Bei den Experimenten mit Fibrillenkeimen war kein Einfluss auf die initiale

Fibrillierungsgeschwindigkeit zu beobachten. Trehalose förderte demnach die Bildung des Nukleationskeims und nicht das Fibrillenwachstum.

Neben dem Zucker Trehalose ist ein positiver Effekt von Tetracyclin-Antibiotika auf die Symptome von amyloiden Krankheiten bekannt (Chen *et al.*, 2000; Cardoso & Saraiva, 2006; Davies *et al.*, 2005; Fan *et al.*, 2007). Durch Zellkultur-Studien wurde gezeigt, dass Doxcyclin eine Reduzierung der Proteinaggregation und die Induktion des Zelltods bewirkt (Bao *et al.*, 2005). *In vitro* beeinflussten Tetracycline die Fibrillenbildung des Prion-Proteins, Aβ-Peptids und von Transthyretin kaum, verringerten aber die proteolytische Resistenz der gebildeten amyloiden Strukturen (Tagliavini *et al.*, 2000; Forloni *et al.*, 2001; Cardoso *et al.*, 2003). Es wurde der Effekt von Doxycyclin auf die Fibrillenbildung von N-(+7)Ala analysiert. Entgegen den Erwartungen wurde allerdings eine Beschleunigung der Fibrillenbildung von N-PABPN1 beobachtet. Die Ergebnisse deuten auf eine Interaktion zwischen Doxycyclin und der löslichen Form oder dem Nukleationskeim hin, wodurch die Fibrillerung beschleunigt wird.

Aufgrund der hier beschriebenen Ergebnisse kann argumentiert werden, dass die beschriebene Verminderung der OPMD-Symptome im Tiermodell wahrscheinlich auf einen indirekten Einfluss von Doxycyclin auf die PABPN1-Fibrillenbildung zurückzuführen ist. Doxycyclin könnte in den Zellen beispielsweise die Expression von *Chaperonen* erhöhen oder den proteolytischen Abbau der amyloiden Ablagerungen fördern. Allerdings ist die intrazelluläre Konzentration von Doxycyclin nicht bekannt und ein Vergleich der *in vitro*- und *in vivo*-Daten nicht zulässig.

6 Zusammenfassung

Die okulopharyngeale Muskeldystrophy (OPMD) ist eine autosomal vererbbare Krankheit. Die ersten Symptome, wie Schluckbeschwerden und Bindegewebsschwäche, treten ab dem 50. Lebensjahr auf. Die Krankheit wird durch eine Trinukleotidexpansion (GCG) verursacht, wodurch die Polyalaninsequenz des nukleären poly(A)-bindenden Proteins (PABPN1) von zehn auf maximal 17 Alanine verlängert sein kann. In Biopsiematerial von erkrankten Personen konnten intranukleäre Ablagerungen in Muskelzellen beobachtet werden, welche hauptsächlich aus PABPN1 bestehen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Polyalanin-abhängige Fibrillenbildung der N-terminalen Domäne von PABPN1 (N-PABPN1) *in vitro* analysiert. Für die Studien wurde das Wildtyp-Protein (N-WT) sowie eine Polyalaninmutante mit sieben zusätzlichen Alaninen (N-(+7)Ala) verwendet. Ein Zusammenhang zwischen der Länge der Polyalaninsequenz und der Bildung fibrillärer Strukturen wurde bereits gezeigt. Ebenfalls war bekannt, dass N-WT eine langsamere Fibrillenbildung zeigte als N-(+7)Ala. Die Fibrillierung beider Varianten konnte durch mittels Ultraschall zerkleinerten Fibrillen (*seeds*) induziert werden.

- In dieser Arbeit wurden Hinweise f
 ür unterschiedliche Mechanismen der Fibrillenbildung bei N-(+7)Ala und N-WT in Gegenwart von *seeds* gefunden. Demnach ist wahrscheinlich nicht nur die Bildung des Nukleationskeims abh
 ängig von der Polyalaninsequenz, sondern auch das Fibrillenwachstum.
- 2. Die Beschleunigung der Fibrillenbildung war proportional zur eingesetzten *seed*-Konzentration.
- Eine Induktion der Fibrillierung von N-(+7)Ala mit seeds aus N-WT-Fibrillen (heterologes seeding) war möglich. Dabei wurde ebenfalls eine seedkonzentrationsabhängige Beschleunigung der Fibrillenbildung beobachtet.
- Bei heterologem *seeding* war die Fibrillierung im Vergleich zu homologem *seeding* verzögert. Die Unterschiede in den Fibrillierungskinetiken deuten auf verschiedene fibrilläre Strukturen von N-WT und N-(+7)Ala hin.
- 5. N-WT und N-(+7)Ala besaßen im Rasterkraftmikroskop eine unterschiedliche Fibrillenmorphologie. Während die Fibrillen von N-(+7)Ala eine relativ gleichmäßige Oberfläche ausbildeten, besaßen die N-WT-Fibrillen eine Ketten-ähnliche Struktur. Es ist möglich, dass diese Struktur durch eine Drehung der Fibrillen um die eigene Achse entsteht. Demnach besitzen N-(+7)Ala-Fibrillen keine oder eine sehr gestreckte Eigendrehung.
- 6. Ein weiterer Unterschied der beiden Fibrillentypen bestand in der Stabilität gegenüber der Solubilisierung mit Guanidiniumthiocyanat (GdmSCN). Die Fibrillen von N-(+7)Ala waren über einen längeren Zeitraum und bei höheren Konzentrationen von GdmSCN resistenter gegenüber Solubilisierung als N-WT-Fibrillen. Die zusätzlichen Alanine von N-(+7)Ala erhöhen die Hydrophobizität des Proteins und stabilisieren dadurch wahrscheinlich die Fibrillenstruktur aufgrund stärkerer hydrophober Wechselwirkungen.
- Bei der Analyse zum Einfluss der Deletionsmutante N-∆Ala auf die Fibrillierung von N-(+7)Ala wurde eine Verangsamung der Fibrillenbildung durch eine nicht-kovalente Assoziation der monomeren Spezies festgestellt.
- In Gegenwart von N-(+7)Ala aggregierte RCMLA, wodurch die ANS-Fluoreszenzmessungen zur Analyse der Fibrillenbildung beeinträchtigt wurde. In Gegenwart von *seeds* wurde kein Einfluss von RCMLA auf die Fibrillenbildung beobachtet.
- 9. Lysozym beeinflusste die Fibrillierungsgeschwindigkeit kaum, verringerte aber die Menge an gebildeten Fibrillen in Anwesenheit von *seeds*.
- Durch Koinkubation des Polyalaninpeptides A₁₇KYK-NH₂ wurde die Fibrillenbildung von N-(+7)Ala beschleunigt. Ebenfalls konnte der Einbau des Peptids in die Fibrillen gezeigt werden. Dabei ist nicht vollkommen geklärt worden, ob eine individuelle Fibrille Peptid und Protein enthält.

Die Beschleunigung der Fibrillenbildung durch $A_{17}KYK-NH_2$ sowie die Verzögerung durch N- Δ Ala bestätigten, dass die Polyalaninsequenz essentiell für eine Fibrillenbildung von N-PABPN1 ist.

- 11. Sulfat beschleunigte die Fibrillierungsgeschwindigkeit stärker als Nitrat- oder Chloridionen.
- Neben dem Effekt der Anionen wurde auch eine Kationen-abhängige Beschleunigung beobachtet. Natriumionen zeigten einen deutlicheren Effekt auf die Fibrillenbildung als Ammoniumionen.
- 13. Argininhydrochlorid verzögerte sehr wahrscheinlich aufgrund von Löslichkeitsfördernden Eigenschaften des Arginins die Fibrillenbildung. Argininsulfat dagegen beschleunigte bei einer Konzentration von 1,2 M die Fibrillierung durch die Aussalzeffekte der Sulfationen.

Die Salze beeinflussten die Fibrillenbildung analog ihrer Fähigkeit, die Hydrathülle der Proteine zu entziehen und dadurch hydrophobe Wechselwirkungen zu verstärken, wodurch die fibrilläre Struktur begünstigt wurde.

14. Es wurde entgegen den Erwartungen eine Verkürzung der *lag phase* sowie eine Beschleunigung des Fibrillenwachstums durch Trehalose und Doxycyclin beobachtet.

Bei *in vivo*-Studien ist die Verminderung der Symptome von OPMD durch Trehalose und Doxycyclin wahrscheinlich auf eine indirekte Beeinflussung der PABPN1-Fibrillenbildung durch die Substanzen zurückzuführen.

7 Literaturverzeichnis

- Abu-Baker, A., Messaed, C., Laganiere, J. Gaspar, C., Brais, B. and Rouleau, G. A. Involvement of the ubiquitin-proteasome pathway and molecular chaperones in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 2609-2623 (2003).
- Abu-Baker, A. and Rouleau, G. A. Oculopharyngeal muscular dystrophy: Recent advances in the understanding of the molecular pathogenic mechanisms and treatment strategies. *Biochim. Biophys. Acta* **1772**, 173-185 (2007).
- Amiel, J., Trochet, D., Clément-Zizam, M., Munnich, A. and Lyonnet S. Polyalanine expansions in human. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 235-243 (2004).
- Antzutkin, O. N. Amyloidosis of Alzheimer's Aβ peptides: solid-state nuclear magnetic resonance, electron paramagnetic resonance, transmission electron microscopy, scanning transmission electron microscopy and atomic force microscopy studies. *Magn. Reson. Chem.* 42, 231-246 (2004).
- Arora, A., Ha, C. and Park, C. B. Inhibition of insulin amyloid formation by small stress molecules. *FEBS L.* **564**, 121-125 (2004).
- Baldwin, R. L.. How Hofmeister ion interaction affect protein Stability. *Biophys. J.* **71**, 2056-2063 (1996).
- Ban, T., Hamada, D., Hasegawa, K., Naiki, H. and Goto, Y. Direct observation of amyloid fibril growth monitored by thioflavin T fluorescence. J. Biol. Chem. 278, 16462-16465 (2003).
- Bao, Y. P., Cook, L. J., O'Donovan, D., Uyama, E., and Rubinsztein, D. C. Mammalian, yeast, bacterial, and chemical chaperones reduce aggregate formation and death in a cell model of oculopharyngeal muscular dystrophy. J. Biol. Chem. 277, 12263-12269 (2002).
- Bao, Y. P., Sakar, S., Uyama, E., and Rubinsztein, D. C. Congo red, doxycycline and HSP70 overexpression reduce aggregate formation and cell death in cell models of oculopharyngeal muscular dystrophy. J. Med. Genet. 41, 47-51 (2004).
- Benhold, H. Specific staining of amyloid by Congo red. *Muenchen. Med. Wochenschr.* 1537-1538 (1922).
- Bienroth, S., Wahle, E., Suter-Crazzolara, C. and Keller, W. Purification of the cleavage and polyadenylation factor involved in the 3'-processing of messenger RNA precursors. J. *Biol. Chem.* 266, 19768-19776 (1991).

- Blake, C. C., Koenig, D. F., Mair, G. A., North, A. C., Phillips, D. C. and Sarma, V. R. Structure of hen egg-white lysozyme. A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution. *Nature* **206**, 757-761 (1965).
- Blondelle, S. E., Forood, B., Houghten, R. A., and Perez-Paya, E. Polyalanine-based peptides as models for self-associated beta-pleated-sheet complexes. *Biochemistry* 36, 8393-8400 (1997).
- Brais, B. Oculopharyngeal muscular dystrophy: a late-onset polyalanine disease. *Cytogenet. Genome Res.* **100**, 252-260 (2003).
- Brais, B., Bouchard, J. P., Xie, Y. G., Rochefort, D. L., Chretien, N., Tomé, F. M., Lafreniere, R. G., Rommens, J. M., Uyama, E., Nohira, O., Blumen, S., Korczyn, A. D., Heutink, P., Mathieu, J., Duranceau, A., Codere, F., Fardeau, M., Rouleau, G. A., and Korcyn, A. D. Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nature Genet.* 18, 164-167 (1998).
- Brais, B., Xie, Y.-G., Sanson, M., Morgan, K., Weissenbach, J., Korczyn, A. D., Blumen, S. C., Fardeau, M., Tomé, F. M., Bouchard J.-P. and Rouleau, G. A. The oculopharyngeal muscular dystrophy locus maps to the region of the cardiac α and β myosin heavy chain genes on chromosome 14q11.2-q13. *Hum. Mol. Genet.* **4**, 429-434 (1995).
- Brinkmann, U., Mattes, R. E., and Buckel, P. High-level expression of recombinant genes in Escherichia coli is dependent on the availability of the dnaY gene product. *Gene* **85**, 109-114 (1989).
- Brown, P., Liberski, P. P., Wolff, A. and Gajdusek, D. C. Conservation of infectivity in purified fibrillary extracts of scrapie-infected hamster brain after sequential enzymatic digestion or polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 7240-7244 (1990).
- Bodner, R. A., Outeiro, T. F., Altmann, S., Maxwell, M., Cho, S. H., Hyman, B. T., McLean, P. J., Young, A. B., Housman, D. E. and Kazantsev, A. G. Pharmacological promotion of inclusion formation: A therapeutic approach for Huntington's and Parkinson's diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 4246-4251 (2006).
- Borrell-Pagès, M., Zala, D., Humbert, S. and Saudou, F. Huntington's disease: from huntingtin function and dysfunction to therapeutic strategies. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 2642-2660 (2006).
- Busch, A., Engemann, S., Lurz, R., Okazawa, H., Lehrach, H. and Wanker, E. E. Mutant Huntingtin promotes the fibrillogenesis of wild-type Huntingtin. *J. Biol. Chem.* **278**, 41452-41461 (2003).
- Calado, A., Tomé, F. M., Brais, B., Rouleau, G. A., Kuhn, U., Wahle, E., and Carmo-Fonseca, M. Nuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy consist of poly(A) binding protein 2 aggregates which sequester poly(A) RNA. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2321-2328 (2000).

- Cardoso, I. and Saraiva, M. J. Doxycycline disrupts transthyretin amyloid: evidence from studies in a FAP transgenic mice model. *FASEB J.* **20**, 234-239 (2006).
- Cardoso, I., Merlini, G. & Saraiva, M. J. 4'-iodo-4'-Deoxydoxorubicin and tetracyclines disrupt transthyretin amyloid fibrils in vitro producing noncytotoxic species: screening for TTR fibril disrupters. *FASEB J.* 17, 803-809 (2003).
- Chamberlain, A. K., MacPhee, C. E., Zurdo, J., Morozova-Roche, L. A., Hill, H. A. O., Dobson, C. M. and Davis, J. J. Ultrastructural organization of amyloid fibrils by atomic force microscopy. *Biophys. J.* **79**, 3282-3293 (2000).
- Chartier, A., Benoit, B. and Simonelig, M. A Drosophila model of oculopharyngeal muscular dystrophy reveals intrinsic toxicity of PABPN1. *EMBO J.* **25**, 2253-2262 (2006).
- Chen, M., Margittai, M., Chen, J. and Langen, R. Investigation of alpha-synuclein fibril structure by site-directed spin labeling. *J. Biol. Chem.* **282**, 24970-24979 (2007).
- Chen, L., Cabrita, G. J., Otzen, D. E. & Melo, E. P. Stabilization of the ribosomal protein S6 by trehalose is counterbalanced by the formation of a putative off-pathway species. *J. Mol. Biol.* **351**, 402-416 (2005).
- Chen, M., Ona, V. O., Ferrante, R. J., Fink, K. B., Zhu, S., Guo, L., Farrell, L. A., Hersch, S. M., Hobbs, W., Vonsattel, J.-P., Cha, J.-H. J. and Friedlander, R. M. Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and dwlays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nature Medicine* 6, 797-801 (2000).
- Chiba, T., Hagihara, Y., Higurashi, T., Hasegawa, K., Naiki, H. and Goto, Y. Amyloid fibril formation in the context of full-length protein. *J. Biol. Chem.* **278**,47016-47024 (2003).
- Chien, P und Weissman, J. S. Conformational diversity in a yeast prion dictates ist seeding specificity. *Nature* **410**, 223-227 (2001).
- Chiti, F., Stefani, M., Taddei, N., Ramponi, G. and Dobson, C. M. Rationalization of the effects of mutations on peptide and protrein aggregation rates. *Nature* **424**, 805-808 (2003).
- Conway, K. A., Harper, J. D., and Lansbury, P. T., Jr. Fibrils formed in vitro from alphasynuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. *Biochemistry* **39**, 2552-2563 (2000).
- Creel, G. B., Giuliani, M. J., Lacomis, D. and Holbach, S. M. Oculopharyngeal muscular dystrophy: non-french-canadian pedigrees. *Muscle Nerve* **21**, 816-818 (1998).
- Davies, J. E., Garcia-Oroz, L., Cook, L. J., Vacher, C., O'Donovan, D. G. and Rubinsztein, D. C. Doxycycline attenuates and delays toxicity of the oculopharyngeal muscular dystrophy mutation in transgenic mice. *Nature Medicine* 11, 672-677 (2005).

- Davies, J. E., Sarkar, S. and Rubinsztein, D. C. Trehalose reduces aggregate formation and delays pathology in a transgenic mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 15, 23-31 (2005).
- De Bernadez Clark E, Schwarz E & Rudolph R Inhibition of aggregation side reactions during in vitro protein folding. *Amyloid, Prions, and other Protein Aggregates: Methods Enzymol.* (Wetzel R, ed) **309**, 217-236, Academic Press, San Diego (1999).
- Díaz-Hernández, M., Valera, A. G., Morán, M. A., Gómez-Ramos, P., Alvarez-Castelao, J. G., Hernández, F. and Lucas, J. J. Inhibition of 26S proteasome activity by huntingtin filaments but not inclusion bodies isolated from mouse and human brain. *J. Neurochem.* **98**, 1585-1596 (2006)
- Diplomarbeit Sachs, R. Untersuchungen zum Einfluss makromolekularer Substanzen auf die Polyalanin vermittelte Fibrillenbildung. MLU Halle-Wittenberg, Deutschland (2005).
- Dissertation Scheuermann, T. Untersuchungen zum Einfluss von Polyalaninsequenzen auf die bildung amyloider Fibrillen von PABPN1. MLU Halle-Wittenberg, Deutschland (2003).
- Dobson, C. M. Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Cell Develop. Biol.* **15**, 3-16 (2004).
- Everett, C. M. and Wood, N. M. Trinukleotide repeats and neurodegenerative disease. *Brain* **127**, 2385-2405 (2004).
- Engelhard, M. and Evans, P. A. Kinetics of interaction of partially folded proteins with a hydrophobic dye: evidence that molten globule character is maximal in early folding intermediates. *Protein Sci.* **4**, 1553-1562 (1995).
- Esler, W. P., Stimson, E. R., Ghilardi, J. R., Lu, Y.-A., Felix, A. M., Vinters, H. V., Mantyh, P. W., Lee, J. P. and Maggio, J. E. Point substitution in the central hydrophobic cluster of a human β-amyloid congener disrupts peptide folding and abolishes plaque competence. *Biochemistry* 35, 13914-13921 (1996).
- Fan, R., Xu, F., Previti, M. L., Davis, J., Grande, A. M., Robinson, J. K. and van Nostrand W.
 E. Minocycline reduces microglial activation and improves behavioral deficits in a transgenic model of cerebral microvascular amyloid. *J. Neurosci.* 27, 3057-3063 (2007).
- Fändrich, M. and Dobson, C. M. The behaviour of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation. *EMBO J.* **21**, 5682-5690 (2002).
- Finder, V. H. and Glockshuber, R. Amyloid-β aggregation. *Neurodegener. Dis.* **4**, 13-27 (2007).
- Fraser, P. E., Nguyen, J. T., Chin, D. T. and Kirschner, D. A. Effects of sulfate ions on Alzheimer $\beta/A4$ peptide assemblies: Implications for amyloid fibril-proteoglycan interaction. *J. Neurochem.* **59**, 1531-1540 (1992).

- Fried, K., Arlozorov, A. and Spira, R. Autosomal recessive oculophayngeal muscular dystrophy. J. Med. Genet. 12, 416-418 (1975).
- Forloni, G., Colombo, L., Girola, L., Tagliavini, F. and Salmona, M. Anti-amyloidogenic activity of teracyclines:studies in vitro. *FEBS L.* **487**, 404-407 (2001).
- Forood, B., Pérez-Payá, E., Houghten, R. A. and Blondelle, S. E. Formation of an extremely stable polyalanine β-sheet macromolecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211, 7-13 (1995).
- Galant, R. and Carroll, S. B. Evolution of a transcriptional repression domain in an insect Hox protein. *Nature* **415**, 910-913 (2002).
- Geddes, A. J., Parker, K. D., Atkins, E. D., and Beighton, E. "Cross-beta" conformation in proteins. J. Mol. Biol. 32, 343-358 (1968).
- Gill, S. C. and von Hippel, P. H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319-326 (1989)
- Giri, K., Bhattacharyya, N. P. and Basak, S. pH-dependent self-assembly of polyalanine peptides. *Biophys. J.* **92**, 293-302 (2007).
- Gjerde, D.T, Schmuckler, G. und Fritz, J.S. Anion chromatography with low conductivity eluents. II. *J. Chromatogr.* **187**, 35-45 (1980).
- Goers, J., Uversky, V. N. and Fink, A. L. Polycation-induced oligomerization and accelerated fibrillation of human α-synuclein *in vitro*. *Protein Sci.* **12**, 702-707 (2003).
- Goldsbury, C. S., Cooper, G. J. S., Goldie, K. N., Müller, S. A., Saafi, E. L., Gruijters, W. T. M., Engel, M., Aebi, U. and Kistler, J. Polymorphic fibrillar assembly of human amylin. J. Struc. Biol. 119, 17-27 (1997).
- Goldsbury, C. S., Kistler, J., Aebi, U., Arvinte, T. and Cooper, G. J. S. Watching amyloid fibrils grow by time-lapse atomic force microscopy. *J. Mol. Biol.* **285**, 33-39 (1999).
- Grossman, H., Bergmann, C. and Parker, S. Dementia: A brief Review. *Mount Sinai J. Med.* **73**, 985-992 (2006).
- Hamada, D. and Dobson, C. M. A kinetic study of β-lactoglobulin amyloid fibril formation promoted by urea. *Protein Sci.* **11**, 2417-2426 (2002).
- Han, K. and Manley, J. L. Functional domains of the Drosophila Engrailed protein. *EMBO J.* 12, 2723-2733 (1993).
- Harper, J. D. and Lansbury, P. T., Jr. Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 385-407 (1997).

- Hasegawa, K., Yamaguchi, I., Omata, S., Gejyo, F. and Naiki, H. Interaction between Aβ(1-40) in Alzheimer's β-amyloid fibril formation in vitro. *Biochemistry* **38**, 15514-15521 (1999).
- Hilbich, C., Kisters-Woike, B., Reed, J., Masters, C. L. and Beyreuther, K. Substitution of hydrophobic amino acids reduce the amyloidogenicity of Alzheimer's disease βA4 peptides. *J. Mol. Biol.* **228**, 460-473 (1992).
- Hill, M. E., Creed, G. A., McMullan, T. F., Tyers, A. G., Hilton-Jones, D., Robinson, D. O., and Hammans, S. R. Oculopharyngeal muscular dystrophy: phenotypic and genotypic studies in a UK population. *Brain* 124, 522-526 (2001).
- Hofmeister, F. On the understanding of the effects of salts. On regularities in the precipitating effect of salts and their relationship to their physiological behavior. *Arch. Exp. Pathol. Pharmakol. (Leipzig)* **24**, 247-260 (1888).
- Holmes, S. E., O'Hearn, E., Rosenblatt, A., Callahan, C., Hwang, H. S., Ingersoll-Ashworth, R. G., Fleisher, A., Stevanin, G., Brice, A., Potter, N. T., Ross, C. A., and Margolis, R. L. A repeat expansion in the gene encoding junctophilin-3 is associated with Huntington disease-like 2. *Nature Genetics* 29, 377-378 (2001).
- Inoue, Y., Kishimoto, A., Hirao, J., Yoshida, M. and Taguchi, H. Strong growth polarity of Yeast prion fiber revealed by single fiber imaging. *J. Biol. Chem.* **276**, 35227-35230 (2001).
- Iwata, K., Fujiwara, T., Matsuki, Y., Akutsu, H., Takahashi, S., Naiki, H. and Goto, Y. 3D structure of amyloid protofilaments of beta2-microglobulin fragment probed by solidstate NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 18119-18724 (2006).
- Jahn, T. R., Parker, M. J., Homans, S. W. and Radford, S. E. Amyloid formation under physiological conditions proceeds via a native-like folding intermediate. *Nature Struc. Mol. Biol.* 13, 195-201 (2007).
- Jarrett, J. T. and Lansbury, P. T., Jr. Amyloid fibril formation requires a chemically discriminating nucleation event: Studies of an amyloidogenic sequence from the bacterial protein OsmB. *Biochemistry* 31, 12345-12352 (1992).
- Jiménez, J., Guijarro, J. I., Orlova, E., Zurdo, J., Dobson, C. M., Sunde, M. and Saibil, H. R. Cryo-electron microscopy structure of an SH3 amyloid fibril and model of the molecular packing. *EMBO J.* 18, 815-821 (1999).
- Jiménez, J., Nettleton, E. J., Bouchard, M., Robinson, C. V., Dobson, C. M. and Saibil, H. R. The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 9196-9201 (2002).
- Kaylor, J., Bodner, N., Edridge, S., Yamin, G., Hong, D.-P. and Fink, A. L. Characterization of Oligomeric Intermediates in α-synuclein Fibrillation: FRET Studies of Y125W/Y133F/Y136F α-synuclein. J. Mol. Biol. 353, 357-372 (2005).

- Kelly, J. W. Alternative conformations of amyloidogenic proteins govern their behavior. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 11-17 (1996).
- Kelly, J. W. Mechanism of amyloidogenesis. Nature Struc. Biol. 7, 824-826 (2000).
- Khurana, R., Gillespie, J. R., Talapatra, A., Minert, L. J., Ionescu-Zanetti, C., Millet, I. and Fink, A. L. Partially folded intermediates as critical precursors of light amyloid fibrils and amorphous aggregates. *Biochemistry* 40, 3525-3535 (2001).
- Kokkoni, N., Stott, K., Amijee, H., Mason, J. M. and Doig, A. J. N-methylated peptide inhibitors of β-amyloid aggregation and toxicity. Optimization of the inhibitor structure. *Biochemistry* **45**, 9906-9918 (2006).
- Kong, B., Chae, Y. and Lee, K. Degradation of wild.type alpha-synuclein by a molecular chaperone leads to reduced aggregate formation. *Cell Biochem. Funct.* 23, 125-132 (2005).
- Krause, S., Fakan, S., Weis, K., and Wahle, E. Immunodetection of poly(A) binding protein II in the cell nucleus. *Exp. Cell Res.* **214**, 75-82 (1994).
- Kühn, U., Nemeth, A., Meyer, S. and Wahle, E. The RNA binding domains of the nuclear poly(A)-binding protein. *J. Biol. Chem.* **278**, 16916-16925 (2003).
- Kühn, U. and Wahle, E. Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1678**, 67-84 (2004).
- Kudva, Y. C., Hiddinga, H. J., Butler, P. C., Mueske, C. S. and Eberhardt, N. L. Small heat shock proteins inhibit in vitro Aβ₁₋₄₂ amyloidogenesis. *FEBS L.* **416**, 117-121 (1997).
- Kuwata, K., Matumoto, T., Cheng, H., Nagayama, K., James, T. L. and Roder H. NMRdetected hydrogen exchange and moleceluar dynamics simulations provide structural insight into fibril formation of prion protein fragment 106-126. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 100, 14790-14795 (2003).
- Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
- Lee, S., Cason, K., Rice-Ficht, A. and Good, T. Hsp20, a novel α-crystallin, prevents Aβ fibril formation and toxicity. *Protein Sci.* 14, 593-601 (2005).
- LeVine, III, H. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.* **2**, 404-410 (1993).
- Liu, B. Modulation of Microglial Pro-inflammatory and Neurotoxic Activity for the Treatment of Parkinson's disease. *AAPS J.* **8**, E606-620 (2006).
- Liu, R., Barkhordarian, H., Emadi, S., Park, C. B. and Sierks, M. R. Trehalose differentially inhibits aggrgation and neurotoxicity of beta-amyloid 40 and 42. *Neurobiol. Dis.* **20**, 74-81 (2005).

- Lodderstedt, G., Sachs, R., Faust, J., Bordusa, F., Kühn, U., Golbik, R., Kerth, A., Wahle, E., Balbach, J., Schwarz, E. Hofmeister salts and potential therapeutic compounds accelerate *in vitro* fibril formation of the N-terminal domain of PABPN1 containing a disease-causing alanine extension. *Biochemistry* 47, 2181-2189 (2008).
- Markin, O. S. and Serpell, L. C. Structures of amyloid fibrils. FEBS J. 272, 5950-5961 (2005).
- Martin, J. and Hartl, F. U. Chaperone-assissted protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 41-52 (1997).
- Mason, J. M., Kokkoni, N., Stott, K. and Doig, A. J. Design stratigies for anti-amyloid agents. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 526-532 (2003).
- Meyer, R. K., Lustig, A., Oesch, B., Fatzer, R., Zurbriggen, A. and Vandevelde, M. A monomer-dimer equilibrium of a cellular prion protein (PrP^C) not observed with recombinant PrP*. J. Biol. Chem. 275, 38081-38087 (2000).
- Miller, J. S., Kennedy, R. J. and Kemp, D. S. Short, solubilized polyalanines are conformational chameleons: Exceptionally helical if N- and C-capped with helix stabilizers, weakly to moderatly helical if capped with rigid spacers. *Biochemistry* 40, 305-9 (2001).
- Mitchell, P. and Tollervey, D. mRNA stability in eukaryotes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 193-198 (2000).
- Munishkina, L. A., Henriques, J., Uversky, V. N. and Fink, A. L. Role of protein-water interactions and electrostatics in a α -synuclein fibril formation. *Biochemistry* **43**, 3289-3300 (2004a).
- Munishkina, L. A., Cooper, E. M., Uversky, V. N. and Fink, A. L. The effect of macromolecular crowding on protein aggregation and amyloid fibril formation. J. Mol. Recognit. 17, 456-464 (2004b).
- Nagai, K. RNA-protein complexes. Curr. Opin. Struct. Biol. 6, 53-61 (1996).
- Nagai, K., Oubridge, C., Jessen, T. H., Li, J. and Evans, P. R. Crystal structure of the RNAbinding domain of the U1 small nuclear ribonucleoprotein A. *Nature* **348**, 515-520 (1990).
- Naiki, H., Higuchi, K., Hosokawa, M. and Takeda, T. Fluorometric determination of amyloid fibrils *in vitro* using the fluorescent dye, thioflavine T. *Analyt. Biochem.* **177**, 244-249 (1989).
- Nakamoto, M., Nakano, S., Kawashima, S., Ihara, M., Nishimura, Y., Shinde, A., and Kakizuka, A. Unequal crossing-over in unique PABP2 mutations in Japanese patients: a possible cause of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Arch. Neurol.* **59**, 474-477 (2002).

- Nakielny, S. and Dreyfuss, G. Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell* **99**, 677-690 (1999).
- Nelson, R. and Eisenberg, D. Recent atomic models of amyloid fibril structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**, 260-265 (2006).
- Nelson, R., Sawaya, M. R., Balbirnie, M., Madsen, A. Ø., Riekel, C., Grothe, R and Eisenberg, D. Structure of the cross-β spine of amyloid-like fibrils. *Nature* **435**, 773-778 (2005).
- Nguyen, H. D. and Hall, C. K. Kinetics of fibril formation by polyalanine peptides. J. Biol. Chem. 280, 9074-9082 (2005).
- Ono, K. and Yamada, M. Antioxidant compounds have potent anti-fibrillogenic and fibrildestabilizing effects for α-synuclein fibrils *in vitro*. J. Neurochem. **97**, 105-115 (2006).
- O'Nuallain, B., Williams, A. D., Werstermark, P. and Wetzel, R. Seeding specificity in amyloid growth induced by heterolous fibrils. *J. Biol. Chem.* **279**, 17490-17499 (2004).
- Ostermann, J., Horwich, A. L., Neupert, W. and Hartl, F. U. Protein folding in mitochondria requires complex formation with hsp60 and ATP hydrolysis. *Nature* **341**, 125-130 (1989).
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* **11**, 2411-2423 (1995).
- Palleros, D. R., Welch, W. J. and Fink, A. L. Interaction of hsp70 with unfolded proteins: effects of temperature and nucleotides on the kinetics of binding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 88, 5719-2573 (1991).
- Pedersen, J. S., Christiansen, G. and Otzen, D. E. Modulation of S6 fibrillation by unfoldeding rates and gatekeeper residues. *J. Mol. Biol.* **341**, 575-588 (2004).
- Pedersen, J. S., Dikov, D., Flink, J. L., Hjuler, H. A., Christiansen, G. and Otzen, D. E. The changing face of glucagon fibrillation: structural polymorphism and conformational imprinting. *J. Mol. Biol.* 355, 501-523 (2006a).
- Pedersen, J. S., Flink, J. L., Dikov, D. and Otzen, D. E. Sulfate dramatically stabilize a saltdependent type of glucagon fibrils. *Biophys. J.* **90**, 4181-4194 (2006b).
- Perutz, M. F., Pope, B. J., Owen, D., Wanker. E. E. and Scherzinger, E. Aggregation of proteins with expanded glutamine and alanine repeats of the glutamine-rich and asparagine-rich domains of Sup35 and of the amyloid β-peptide of amyloid plaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 5596-5600 (2002).
- Petkova, A. T., Ishii, Y., Balbach, J. J., Antzutkin, O. N., Leapman, R. D., Delaglio, F., and Tycko, R. A structural model for Alzheimer's beta-amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 16742-16747 (2002).

- Petkova, A. T., Buntkowsky, G., Dyda, F., Leapman, R.D., Yau, W.-M. and Tycko, R. Solid state NMR reveals a pH-dependent antiparallel β-sheet registry in fibrils formed by a β-amyloid peptide *J. Mol. Biol.* **335**, 247-260 (2004).
- Puchtler, H. and Sweat, F. A review of early concepts of amyloid in context with contemporary chemical literature from 1839 to 1859 *J. Histochem. Cytochem.* **14**, 123-134 (1966).
- Qin, Z., Hu, D., Zhu, M. and Fink, A. L. Structural Characterization of Partially Folded Intermediates of an Immunoglobulin Light Chain Leading to Amyloid Fibrillation and Amorphous Aggregation. *Biochemistry* 46, 3521-3531 (2007).
- Qu, Y., Bolen, C. L. & Bolen, D. W. Osmolyte-driven contraction of a random coil protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9268-9273 (1998).
- Raman, B., Chatani, E., Kihara, M., Ban, T., Sakai, M., Hasegawa, K., Naiki, H., Rao, C. M. and Goto, Y. Critical balance of electrostatic and hydrophobic interactions is required for β_2 -microglobulin amyloid fibril growth and stability. *Biochemistry* **44**, 1288-1299 (2005).
- Reddy, R. C. K., Lilie, H., Rudolph, R. and Lange, C. L-arginine increases the solubility of unfolded species of hen egg white lysozyme. *Protein Sci.* 14, 929-935 (2005).
- Ritter, C., Maddelein, M.-L., Siemer, A. B., Lührs, T., Ernst, M., Meier, B. H., Saupe, S. J. and Riek, R. Correlation of structural elements and infectivity of the HET-s prion. *Nature L.* **435**, 844-848 (2005).
- Rost, B. PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile-based neural networks. *Methods Enzymol.* **266**, 525-539 (1996).
- Sachs, A. B. and Varani, G. Eukaryotic translation initiation: there are (at least) two sides to every story. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 356-361 (2000).
- Safar, J., Roller, P. P., Gajdusek, D. C. and Gibbs, C. J. Jr. Thermal stability and conformational transitions of scrapie amyloid (prion) protein correlate with infectivity. *Protein Sci.* **2**, 2206-2216 (1993).
- Sawaya, M. R., Sambashivan, S., Nelson, R., Ivanova, M. I., Sievers, S. A., Apostol, M. I., Thompson, M. J., Balbirnie, M. Wiltzius, J. J. W., McFarlane, H. T., Madsen, A. Ø., Riekel, C. and Eisenberg, D. Atomic structures of amyloid cross-β spines reveal varied steric zippers. *Nature* 447, 453-457 (2007).
- Scacheri, P. C., Garcia, C., Hebert, R., and Hoffman, E. P. Unique PABP2 mutations in "Cajuns" suggest multiple founders of oculopharyngeal muscular dystrophy in populations with French ancestry. *Am. J. Med. Genet.* 86, 477-481 (1999).

- Scherzinger, E., Sittler, A., Schweiger, K., Heiser, V., Lurz, R., Hasenbank, R., Bates, G. P. Lehrach, H. and Wanker, E. E. Self-assembly of polyglutamine-containing huntingtin fragments into amyloid-like fibrils: Implication for Huntington's disease pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 4604-4609 (1999).
- Scheuermann, T., Schulz, B., Blume, A., Wahle, E., Rudolph, R. and Schwarz, E. Trinukleotide expansions leading to an extended poly-L-alanine segment in the poly (A) binding protein PABPN1 cause fibril formation. *Protein Sci.* 12, 2685-2692 (2003).
- Semisotnov, G. V., Rodionova, N. A., Razgulyaev, O. I., Uversky, V. N., Gripas', A. F., and Gilmanshin, R. I. Study of the "molten globule" intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe. *Biopolymers* **31**, 119-128 (1991).
- Shinchuk, L. M., Sharma, D., Blondelle, S. E., Reixach, N., Inouye, H. and Kischner, D. A. Poly-(L-alanine) expansions form core β -sheets that nucleate amyloid assembly. *Proteins* **61**, 579-589 (2005).
- Singer, M. A. & Lindquist, S. Multiple effects of trehalose on protein folding *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Cell* **1**, 639-648 (1998).
- Souillac, P. O., Uversky, V. N., Millett, I. S., Khurana, R., Doniach, S., and Fink, A. L. Effect of association state and conformational stability on the kinetics of immunoglobulin light chain amyloid fibril formation at physiological pH. J. Biol. Chem. 277, 12657-12665 (2002).
- Soreghan, B., Kosmoski, J. and Glabe, C. Surfant properties of Alzheimer's Aβ peptides and the mechanism of amyloid aggregation. *J. Biol. Chem.* **269**, 28551-28554 (1994).
- Tagliavini, F., Forloni, G., Colombo, L., Rossi, G., Girola, L., Canciani, B., Angeretti, N., Giampaolo, L., Peressini, E., Awan, T., de Gioia, L., Ragg, E., Bugiani, O. and Salmona, M. Teracycline affects abnormal properties of synthetic PrP peptides and PrP^{Sc} in vitro. J. Mol. Biol. 300, 1309-1322 (2000).
- Tanaka, M., Machida, Y., Niu, S., Ikeda, T., Jana, N. R., Doi, H., Kurosawa, M., Nekooki, M. and Nukina, N. Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. *Nature Medicine* 10,148-154 (2004).
- Tanaka, M., Machida, Y. and Nukina, N. A novel therapeutic stratigy for polyglutamine diseases by stabilizing aggregation-prone proteins with small molecules. J. Mol. Med. 83, 343-352 (2005).
- Tani, F., Shirai, N., Nakanishi, Y. and Kitabatake, N. Analysis of molecular interactions in heat-induced aggregation of a non-inhibitory serpin ovalbumin using a molecular chaperone. *Biosci. Biotech. Biochem.* 67, 1030-1038 (2003).
- Tavanez, J P., Calado, P., Braga, J., Lafarga, M. and Carmo-Fonseca, M. In vivo aggregation properties of the nuclear poly(A)-binding protein PABPN1. *RNA* **11**, 752-762 (2005).

- Tayler, E. W. Progressive vagus-glossopharyngeal paralysis with ptosis: contibution to group of family disease. *J. Nerv. Ment. Disord.* **42**, 129-139 (1915).
- Tomé, F. M. and Fardeau, M. Nuclear inclusions in oculopharyngeal dystrophy. Acta Neuropathol.(Berlin) 49, 85-87 (1980).
- Tomé, F. M. and Fardeau, M. Oculopharyngeal muscular dystrophy. In: *Myology*. (eds Engel, A.G. & Franzini-Amstrong,C.) pp1233-1245 Mc-Graw-Hill, N.Y.(1994).
- Utsch, B., Becker, K., Brock, D., Lentze, M. J., Bidlingmaier, F., and Ludwig, M. A novel stable polyalanine [poly(A)] expansion in the HOXA13 gene associated with hand-foot-genital syndrome: proper function of poly(A)-harbouring transcription factors depends on a critical repeat length? *Hum. Genet.* **110**, 488-494 (2002).
- Virchow, R. Zur Cellulose-Frage. Virchows Arch. Path. Anat. 6/8, 416/140 (1854).
- Vollrath, F. Die Seiden und Netze von Spinnen. Spektrum d. Wissenschaft 5, 82-89 (1992).
- Wahle, E. A novel poly(A)-binding protein acts as a specificity factor in the second phase of messenger RNA polyadenylation. *Cell* **66**, 759-768 (1991).
- Wahle, E. and Ruegsegger, U. 3'-End processing of pre-mRNA in eukaryotes. FEMS Microbiol. Rev. 23, 277-295 (1999).
- Wang, Q., Mosser, D. D. and Bag, J. Induction of Hsp70 expression and recruitment of HSC70 and HSP70 in the nucleus reduce aggregation of a polyalanine expansion mutant of PABPN1 in HeLa cells. *Hum. Mol. Genet.* 14, 3673-3684 (2005).
- Warren, S. T. Polyalanine expansion in synpolydactyly might result from unequal crossingover of HOXD13. *Science* **275**, 408-409 (1997).
- Watson, D., Castaño, E., Kokjohn, T. A., Kuo, Y. M., Lyubchenko, Y., Pinsky, D., Connolly, E. S. Jr., Esh, C., Luehrs, D. C., Stine, W. B., Rowse, L. M., Emmerling, M. R., Roher, A. E. Physicochemical characteristics of soluble oligomeric Abeta and their pathologic role in Alzheimer's disease. *Neurol. Res.* 27, 869-81 (2005).
- Wells, R. D. Molecular basis of genetic instability of triplet repeats. J. Biol. Chem. 271, 2875-2878 (1996).
- Wong, S. S., Harper J. D., Lansbury P. T. and Lieber C. M. Carbon nanotube tips highresolution probes for imaging biological systems. J. Am. Chem. Soc. 120, 603-604 (1998).
- Wood, S. J., Wetzel, R., Martin, J. D. and Hurle, M. R. Prolines and amyloidogenicity in fragments of the Alzheimer's peptide β/A4. *Biochemistry* 34, 724-730 (1995).
- Wood, S. J., Maleeff, B., Hart, T. and Wetzel, R. Physical, morphological and functional differences between pH 5.8 and 7.4 aggregates of the Alzheimer's amyloid peptide Abeta. J. Mol. Biol. 256, 870-877 (1996).

- Xie G & Timasheff SN (1997) The thermodynamic mechanism of protein stabilization by trehalose. *Biophys. Chem.* 64, 25-43.
- Xing, Y. & Higuchi, K. Amyloid fibril proteins. Mech. Ageing Dev. 123, 1625-1636 (2002).
- Xu, M. and Lewis, R. V. Structure of a protein superfiber: Spider dragline silk. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 7120-7124 (1990).
- Yang, F., Lim, G. P., Begum, A. N., Ubeda, O. J., Simmons, M. R., Ambegaokar, S. S., Chen, P. P., Kayed, R., Glabe, C. G., Frautschy, S. A. and Cole, G. M. Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid *in vivo. J. Biol. Chem.* 280, 5892-5901 (2005).

Anhang

In der Arbeit wurde mit N-PABPN1 vom Rind gearbeitet, welches zur humanen Variante sehr homolog ist (Unterschiede zwischen den Varianten sind blau markiert).

Sequenz von PABPN1 (Rind)

AAAAAAAAA GAAGGRGSGP GRRRHLVPGA GGEAGEGAPG GAGDYGNGLE SEELEPEELL LEPEPEPEPE EEPPRPRAPP GAPGPGPGSG APGNQEEEEE SGLVEGDPGD GAIEDPELEA IKARVREMEE EAEKLKELQN EVEKQMNMSP PPGNAGPVIM SIEEKMEADA RSIYVGNVDY GATAEELEAH FHGCGSVNRV TILCDKFSGH PKGFAYIEFS DKESVRTSLA LDESLFRGRQ IKVIPKRTNR PGISTTDRGF PRARYRARTT NYNSSRSRFY SGFNSRPRGR VYRGRARATS

WYSPY

Sequenz von N-WT mit His-tag

GSSHHHHHHS SGLVPRGSHM AAAAAAAAA GAAGGRGSGP GRRHLVPGA GGEAGEGAPG GAGDYGNGLE SEELEPEELL LEPEPEPEPE EEPPRPRAPP GAPGPGPGSG APGNQEEEEE SGLVEGDPGD GAIEDPELEA IKAR

Sequenz von N-(+7)Ala mit His-tag

GSSHHHHHHS SGLVPRGSHM AAAAAAAAA AAAAAAAAA GGRGSGPGRR RHLVPGAGGE AGEGAPGGAG DYGNGLESEE LEPEELLLEP EPEPEEEP PRPRAPPGAP GPGPGSGAPG **N**QEEEEE**S**GL VEGDPGDGAI EDPELEAIKA

R

Sequenz von N-AAla mit His-tag

GSSHHHHHHS SGLVPRGSHM GAAGGRGSGP GRRRHLVPGA GGEAGEGAPG GAGDYGNGLE SEELEPEELL LEPEPEPEPE EEPPRPRAPP GAPGPGPGSG APGNQEEEEE SGLVEGDPGD GAIEDPELEA IKAR

Sequenz von PABPN1 (Mensch)

AAAAAAAAA GAAGGRGSGP GRRRHLVPGA GGEAGEGAPG GAGDYGNGLE SEELEPEELL LEPEPEPE EEPPRPAPP GAPGPGPGSG APG**S**QEEEEE **P**GLVEGDPGD GAIEDPELEA IKARVREMEE EAEKLKELQN EVEKQMNMSP PPGNAGPVIM SIEEKMEADA RSIYVGNVDY GATAEELEAH FHGCGSVNRV TILCDKFSGH PKGFAYIEFS DKESVRTSLA LDESLFRGRQ IKVIPKRTNR PGISTTDRGF PRARYRARTT NYNSSRSRFY SGFNSRPRGR VYRGRARATS

WYSPY

Danksagung

Zum Abschluss meiner Arbeit möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuerst möchte ich Dr. Elisabeth Schwarz für die hervorragende Betreuung durch anregende und fördernde Gespräche und Diskussionen während meiner Doktorarbeit danken, sowie für die erstklassige Arbeit bei den papern.

Bei Prof. Rainer Rudolph bedanke ich mich für die Möglichkeit, die Arbeit an seinem Institut anzufertigen.

Dr. Gerd Hause danke ich für die Zeit und Geduld, die bei den unzähligen elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Fibrillen nötig waren.

Die AFM-Bilder sind in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Thomas Scheibel von der TU München entstanden. Deswegen möchte ich mich besonders bei Dr. Simone Hess für die stete Bereitschaft zur Analyse meiner Fibrillen mittels AFM bedanken.

Bei Prof. Frank Bordusa und seiner Arbeitsgruppe, ins besondere bei Dr. Jürgen Faust, möchte ich mich für die Synthese des Polyalaninpeptids und der dazu beantworteten Fragen bedanken.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Andrea Sinz sage ich danke für die netten Tage und den kurzen Einblick in die MALDI- und ESI-Massenspektrometrie der tryptisch-verdauten Peptide.

Dr. Peter Rücknagel danke ich für die N-terminale Ansequenzierung meines Proteins zur Unterstützung meiner Daten.

Natürlich möchte ich mich bei den besten Kollegen, die ich mir vorstellen kann, für das super Arbeitsklima bedanken. Der triste Arbeitsalltag wird durch nette Kollegen wie Euch, aus Labor 262, viel bunter und lustiger.

Besonderer Dank gilt Mirko Sackewitz für die vielen Stunden und Abende, die wir mit Diskutieren und Erörtern unserer Daten verbracht haben. Ebenfalls danke ich Dir für die kritischen Anmerkungen, obwohl ich sie nicht immer hören wollte.

Am Ende bedanke ich mich bei Martin Kleinschmidt für die Unterstützung bei der Erreichung all`meiner Ziele und das Selbstvertrauen, welches du mir, wenn nötig, gestärkt hast.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Grit Lodderstedt
Geburtsdatum:	22.08.1979
Geburtsort:	Halle/Saale
Familienstand:	ledig

Bildungsgang

09/1986 - 08/1991	Besuch der Grundschule 6. POS Halle-Neustadt
09/1991 - 08/1992	Besuch der Sekundarschule Kastanienallee 8, Halle
09/1992 - 07/1998	Besuch des Sportgymnasiums Halle
07/1998	Abschluss der Schulausbildung mit dem Abitur
10/1998 - 07/2003	Studium der Biochemie an
	der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
07/2003	Abschluss des Studiums als Diplom-Biochemiker
seit 09/2003	Promotion am Institut für Biotechnologie
	der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,
	bei Dr. Elisabeth Schwarz
ab 11/2007	wissenschaftl. Mitarbeiter bei der Scil Proteins GmbH

Publikationen:

Effect of oculopharyngeal muscular dystrophy-associated extension of seven alanines on the fibrillation properties of the N-terminal domain of PABPN1. <u>Lodderstedt G</u>, Hess S, Hause G, Scheuermann T, Scheibel T, Schwarz E. *FEBS Journal* **274**, (2007); 346-355

Hofmeister salts and potential therapeutic compounds accelerate *in vitro* fibril formation of the N-terminal domain of PABPN1 containing a disease-causing alanine extension. <u>Lodderstedt G</u>, Sachs R, Faust J, Bordusa F, Kühn U, Golbik R, Kerth A, Wahle E, Balbach J, Schwarz E *Biochemistry* **47**, (2008); 2181-2189

Vorträge:

17. Faltertage at the Leucorea Wittenberg, April, 2005Titel: "Kinetics of poly-L-alanine induced fibril formation"

halbjährliche Vorträge bei SFB-Tagungen (SFB 610)

Posterpräsentationen:

Mai 2005 beim 4,0 ECTS PhD Kurs der Universität Aalborg, Dänemark Mai 2006 beim Biotechnologie-Tag in Leipzig auf verschiedenen SFB-Tagungen

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich mich bisher mit dieser Arbeit weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg noch an einer anderen Einrichtung um die Erlangung eines akademischen Grades beworben habe. Ich versichere weiterhin, dass die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt wurde. Den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Grit Lodderstedt Halle, November 2007