

**Untersuchungen zur Fibrillenbildung  
unter Berücksichtigung einer benachbarten  
gefalteten Domäne**

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

Mirko Sackewitz

geb. am 09.07.1977 in Magdeburg

Gutachter:

1. PD Dr. Elisabeth Schwarz
2. Prof. Dr. Jochen Balbach
3. Prof. Dr. Franz X. Schmid

Promotionsgesuch eingereicht am: 27. November 2008

Tag der öffentlichen Verteidigung am: 23. April 2009

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Proteinmissfaltungen	1
1.2	Amyloide Fibrillen	4
1.2.1	Amyloidosen	4
1.2.2	Eigenschaften und Struktur amyloider Fibrillen	6
1.2.3	Amyloide Fibrillen als alternativer, funktioneller Faltungszustand	9
1.3	Poly-alanin-induzierte Proteinmissfaltungen	11
1.3.1	Poly-alanin-assoziierte Krankheiten	11
1.3.2	Die Krankheit OPMD und das assoziierte Protein PABPN1	12
1.3.3	Eigenschaften von Poly-Alanin-Peptiden	13
1.4	Zielstellung der Arbeit	14
1.4.1	Ausgangspunkt und Ziel der Arbeit	14
1.4.2	CspB als Modellprotein	15
1.4.3	Fusionskonstrukte	16
2	Materialien und Methoden	18
2.1	Materialien	18
2.1.1	Chemikalien	18
2.1.2	Säulenmaterialien	19
2.1.3	Enzyme, Antikörper und Proteine	19
2.1.4	Bakterienstämme und Plasmide	20
2.1.5	Kulturmedien	20
2.1.6	Primer und Oligonukleotide	21
2.1.7	<i>Kits</i> und Standards	22
2.1.8	Geräte	22
2.1.9	Sonstige Materialien	23
2.2	Molekularbiologische Methoden	24
2.2.1	Agarose-Gelelektrophorese	24
2.2.2	Plasmid-Präparationen	24
2.2.3	PCR	24
2.2.4	Präparation der PCR-Produkte	25
2.2.5	Klonierung der Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB	25

---

2.2.6	Klonierung der Fusionen von Poly-Alaninen und CspB	26
2.2.7	DNA-Sequenzierungen	27
2.3	Genexpression und Proteinreinigung	28
2.3.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	28
2.3.2	Westernblot und Immundetektion	29
2.3.3	Genexpression	29
2.3.4	Zellaufschluss	30
2.3.5	Hitzefällung	30
2.3.6	Ni-NTA-Affinitätschromatographie	31
2.3.7	Gelfiltration	31
2.4	Spektroskopische Methoden	32
2.4.1	Konzentrationsbestimmung von Protein- und Nukleinsäurelösungen mittels UV-Absorption	32
2.4.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen mittels Tryptophanfluoreszenz	33
2.4.3	Fluoreszenzspektroskopie	33
2.4.4	Analyse der nativen Faltung von CspB durch Fluoreszenztitration	34
2.4.5	ANS-Fluoreszenz-Messungen	35
2.4.6	Circulardichroismus	35
2.4.7	Massenspektrometrie	36
2.5	Analyse amyloider Strukturen und deren Bildung	37
2.5.1	Fibrillenbildung	37
2.5.2	Fibrillenbildung mit <i>Seed</i> -Zugabe	37
2.5.3	Elektronenmikroskopie	37
2.5.4	Proteolyse	38
2.5.5	Stabilitätsmessungen	38
2.5.6	Analyse der Faltung von CspB durch Ultrazentrifugation	39
2.6	RP-HPLC	39
2.7	Aminosäureanalytik	40
2.8	Chemisch-induzierte De- und Renaturierungen	40
3	Ergebnisse	43
3.1	Rekombinante Herstellung der Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB	43
3.1.1	Klonierung der Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB	43

---

3.1.2	Genexpression der Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB	45
3.1.3	Reinigung der Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB	46
3.2	Rekombinante Herstellung der „direkten Fusionen“	47
3.2.1	Reinigung der „direkten Fusionen“	47
3.3	Biophysikalische Charakterisierung der Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB	48
3.3.1	Geringe Sekundärstrukturanteile der Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB	48
3.3.2	Ähnliche spektroskopische Eigenschaften von CspB und den Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB	50
3.3.3	Natives CspB in den Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB	52
3.3.4	Die thermodynamische Stabilität von CspB in den Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB	54
3.4	Biophysikalische Charakterisierung der „direkten Fusionen“	55
3.4.1	Sekundärstrukturanteile der „direkten Fusionen“	55
3.4.2	Ähnliche spektroskopische Eigenschaften der „direkten Fusionen“ und CspB	57
3.4.3	Natives CspB in den „direkten Fusionen“	58
3.4.4	Reduzierte thermodynamische Stabilität von CspB in den „direkten Fusionen“	60
3.5	Fibrillenbildung der Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB	61
3.5.1	Poly-alanin-abhängige Fibrillenbildung der Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB	61
3.5.2	Beschleunigte Fibrillenbildung der Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 nach Zugabe homologer <i>Seeds</i>	65
3.5.3	Fibrillenbildung der Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 nach Zugabe heterologer <i>Seeds</i>	66
3.6	Fibrillenbildung der „direkten Fusionen“	68
3.6.1	Fibrillenbildung der „direkten Fusionen“ ohne Zugabe von <i>Seeds</i>	68
3.6.2	Vermeidung von Aggregaten bei der Fibrillenbildung von 10Ala-CspB durch Zugabe homologer <i>Seeds</i>	72
3.6.3	Induktion amorpher Aggregate von 17Ala-CspB durch heterologe <i>Seeds</i> von 10Ala-CspB	74

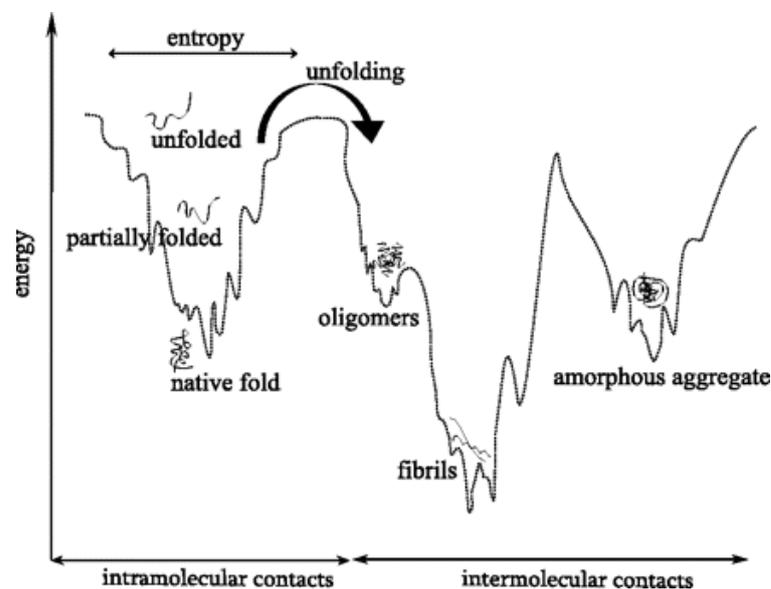
---

3.6.4	Fibrillenbildung der „direkten Fusionen“ nach Zugabe heterologer <i>Seeds</i> von N-(+7)Ala-CspB	75
3.6.5	Fibrillierung 10Ala-CspB nach Zugabe von dT7	77
3.7	Biophysikalische Charakterisierung der Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB	80
3.7.1	Amyloidtypische Sekundärstruktur der Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB	80
3.7.2	Hohe Stabilität der Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB gegenüber chemischen Denaturierungsmitteln	81
3.7.3	Natives CspB in den Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB	83
3.7.4	Proteolysegeschützter Bereich der Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB	86
3.8	Biophysikalische Charakterisierung der Fibrillen von 10Ala-CspB	89
3.8.1	Amyloidtypische Sekundärstruktur der Fibrillen von 10Ala-CspB	89
3.8.2	Geringe Stabilität der Fibrillen von 10Ala-CspB gegenüber chemischen Denaturierungsmitteln	90
3.8.3	Nicht-natives CspB in den Fibrillen von 10Ala-CspB	92
3.8.4	Proteolysegeschützter Bereich der Fibrillen von 10Ala-CspB	94
4	Diskussion	97
4.1	Poly-alanin-abhängige Fibrillenbildung	97
4.2	Artifizielle Fusionen zur Analyse amyloider Strukturen	99
4.3	Proteolyseresistenz und native Faltung innerhalb amyloider Fibrillen	100
4.4	Einfluss der Thermodynamik auf die Bildung amyloider Fibrillen	103
4.5	Induktion der Fibrillenbildung durch <i>Seeding</i> und <i>Cross-Seeding</i>	105
5	Abkürzungen	109
6	Literaturverzeichnis	111

# 1 Einleitung

## 1.1 Proteinmissfaltungen

Die native, dreidimensionale Struktur eines jeden Proteins vermittelt dessen Funktion und ist daher von essentieller Bedeutung für biologische Prozesse. Sie wird im Wesentlichen durch die Aminosäuresequenz bestimmt (Anfinsen, 1973). Aufbauend auf der Primärsequenz entstehen durch präferentielle Wechselwirkungen der Aminosäuren die typischen Sekundärstrukturelemente und eine für jedes Protein charakteristische, kompakte Tertiärstruktur. Die treibende Kraft der Strukturbildung (Faltung) von Proteinen ist der Zustand geringster Energie, welcher durch Wasserstoffbrücken, ionische- und hydrophobe Wechselwirkungen und kovalente Bindungen (Disulfidbrücken) erreicht wird. Die korrekte Faltung von Proteinen ist ein bis heute nicht vollständig verstandener Prozess. So kann es in Abhängigkeit äußerer Faktoren zu alternativen Konformationen oder auch Missfaltungen von Proteinen kommen. Abbildung 1.1 zeigt ein schematisches Energieprofil der Faltung und Missfaltung von Proteinen.

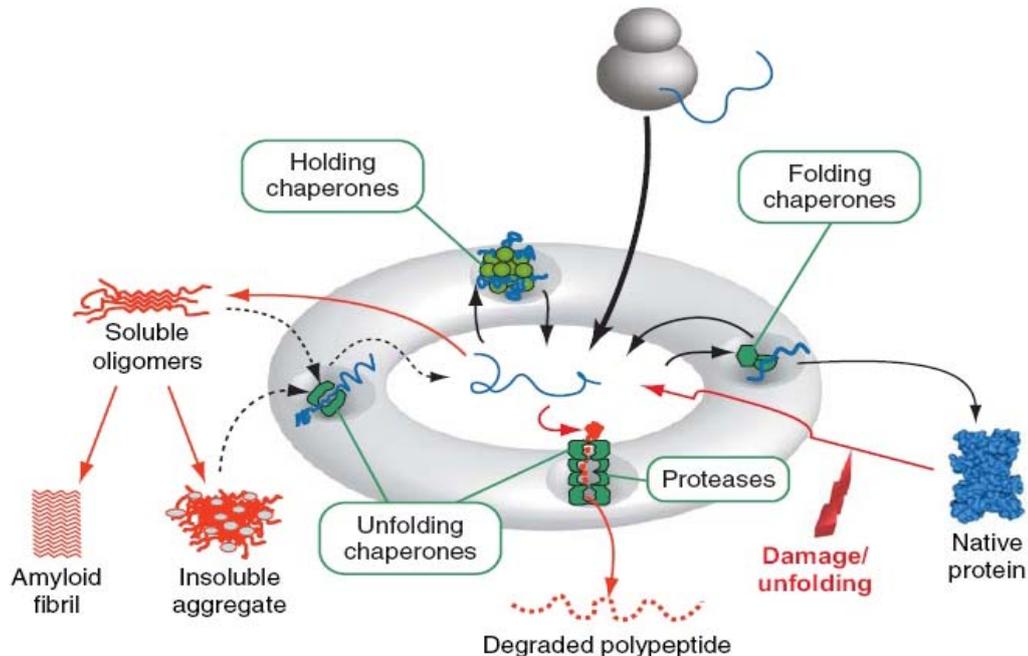


**Abbildung 1.1 Exemplarisches Energieprofil der Faltung und Missfaltung von Proteinen.** In Abhängigkeit von Energie und Entropie, sowie äußerer Faktoren durchlaufen die Proteine „Faltungstrichter“ zum Erreichen des jeweiligen Faltungs- oder Missfaltungszustands (Herczenik & Gebbink, 2008).

Die von den Umgebungsbedingungen abhängige konformationelle Flexibilität wird mittlerweile als universelle Eigenschaft von Proteinen diskutiert und kann sowohl zu Missfaltungen als auch

zur Erweiterung der Funktionalität der jeweiligen Proteine führen (Dobson, 2004; Eisenmesser *et al.*, 2005; Wang & Nogales, 2005; Dumoulin *et al.*, 2006; Hoffmann *et al.*, 2008).

Aufgrund spontan auftretender lokaler Entfaltungen oder Missfaltungen von Proteinen in der Zelle weisen die Proteine exponierte hydrophobe Bereiche auf. Diese hydrophoben Segmente führen häufig zu intermolekularen Wechselwirkungen zwischen den Proteinen, ein Prozess, der im Allgemeinen als Aggregatbildung bezeichnet wird. Neben der Hydrophobizität der exponierten, entfalteten Bereiche spielen eine geringe Ladung und die Tendenz zur Bildung von  $\beta$ -Faltblättern eine entscheidende Rolle bei der Zusammenlagerung oder Aggregatbildung missgefalteter Proteine (Calamai *et al.*, 2003; Chiti *et al.*, 2003). Die *in vivo*, in geringem Maße, ständig auftretende Missfaltung von Proteinen wird durch zelluläre Mechanismen wie den molekularen Chaperonen oder Degradation reguliert und beseitigt (Hartl & Hayer-Hartl, 2002; Goldberg, 2003). Dieses Regulationssystem wird auch als PQC (*Protein Quality Control*) bezeichnet (Gregersen *et al.*, 2006). Kommt es jedoch zur vermehrten Missfaltung von Proteinen, versagt das PQC und es kommt zur Anhäufung der missgefalteten, aggregierten Spezies. In Abbildung 1.2 ist ein schematischer Überblick der zellulären Regulation zur Sicherstellung einer korrekten Proteinfaltung (PQC) gezeigt.



**Abbildung 1.2** Schematischer Überblick der zellulären Regulationsmechanismen zur Sicherstellung einer korrekten Faltung und der Vermeidung von Missfaltungen von Proteinen (PQC). Der Pool ungefalteter und partiell gefalteter Polypeptide (Mitte) wird durch Chaperone und Degradationsmechanismen kontrolliert. *Holding Chaperones* steigern die Löslichkeit, *Folding Chaperones* unterstützen die Faltung und *Unfolding Chaperones* fördern die Entfaltung aggregierter Spezies (Gregersen *et al.*, 2006).

Die mit dem Auftreten aggregierter Proteine einhergehenden Krankheiten werden als Proteinmissfaltungs-Krankheiten bezeichnet. Die bekanntesten Proteinmissfaltungs-Krankheiten sind vermutlich die neurodegenerativen Erkrankungen der Alzheimerschen und Parkinsonschen Krankheit sowie die spongiformen Enzephalopathien. Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über die häufigsten Proteinmissfaltungs-Krankheiten. Einen Teil dieser Krankheiten bilden die so genannten Amyloidosen.

**Tabelle 1.1** Übersicht der Proteinmissfaltungs-Krankheiten (Chiti & Dobson, 2006; Herczenik & Gebbink, 2008)

Art der Krankheit	Krankheit	Involvierte Proteine
Neurodegenerative Krankheiten	Alzheimersche Krankheit	A $\beta$ -Peptide, Tau
	Spongiforme Encephalopathien	Prionprotein und Fragmente
	Parkinsonsche Krankheit	$\alpha$ -Synuclein
	Demenz mit <i>Lewy-bodies</i>	$\alpha$ -Synuclein
	Huntingtonsche Krankheit	Huntingtin
	Familiäre amyloide Polyneuropathien	TTR (Transthyretin)
Nicht-neuropathische systemische Amyloidosen	Primäre Systemische Amyloidosis	Leichte Ketten von Immunglobulin
	Sekundäre Systemische Amyloidosis	Fragmente des SAA ( <i>Serum Amyloid A Proteins</i> )
	Senile Systemische Amyloidosis	TTR (Transthyretin)
	Dialyse-assoziierte Amyloidosis	$\beta$ 2-Mikroglobulin
	Lysozym-Amyloidosis	Lysozym
Nicht-neuropathische lokale Amyloidosen	Injektions-assoziierte Amyloidosis	Insulin
	„Grauer Star“ (Katarakt)	$\gamma$ -Crystallin
	Vererbte renale Amyloidosis	Fibrinogen
Andere Krankheiten	Sichelzell-Anämie	Hämoglobin
	Arteriosklerose	LDL ( <i>Low Density Lipoproteins</i> )
	Diabetes Mellitus (Typ II)	Amylin oder IAPP ( <i>Islet Amyloid Polypeptide</i> )

## 1.2 Amyloide Fibrillen

### 1.2.1 Amyloidosen

Amyloidosen sind Proteinmissfaltungs-Krankheiten, welche durch die Bildung hoch geordneter Aggregatstrukturen, den amyloiden Fibrillen, gekennzeichnet sind (siehe auch Tabelle 1.1). Gemäß der ursprünglichen Definition handelt es sich bei den amyloiden Fibrillen um extrazelluläre Proteinablagerungen (Buxbaum, 2003; Westermarck *et al.*, 2005). Mittlerweile bezeichnet der Begriff „amyloid“ jedoch eher einen strukturellen Zustand mit charakteristischen Eigenschaften (siehe 1.2.2), weshalb auch intrazelluläre oder *in vitro* erzeugte Fibrillen häufig als amyloid oder amyloidartig bezeichnet werden (Chiti & Dobson, 2006). Zur Vereinfachung wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit nicht zwischen den Bezeichnungen amyloid und amyloidartig unterschieden.

Amyloidosen können einen erblichen Ursprung haben oder auch spontan auftreten. Sie können lokal oder systemisch sein (siehe Tabelle 1.1). Die spontan auftretenden Amyloidosen beginnen meist in der zweiten Lebenshälfte. Aufgrund des relativ späten Krankheitsbeginns wird der Einfluss von zellulären Alterungsprozessen bei den spontanen auftretenden Amyloidosen diskutiert (Geula *et al.*, 1998; Soti & Csermely, 2003; Gregersen *et al.*, 2006). Eine Folge der zellulären Alterung könnte ein überlastetes PQC sein, was den Beginn der Krankheiten begünstigen würde. Da die amyloide Fibrillenbildung ein nukleationsabhängiger Prozess ist (Harper & Lansbury, 1997), kann der Faktor Zeit, im Sinne einer fortwährenden, systematischen Ansammlung missgefalteter Spezies bis zu einer kritischen Konzentration, als Ursache für die spät einsetzenden Amyloidosen nicht ausgeschlossen werden (siehe *Review* (Golde *et al.*, 2006)). Die erblichen oder familiären Amyloidosen hingegen zeigen meist einen frühen Krankheitsbeginn. Ursache dieser Krankheiten sind häufig Punktmutationen in den betroffenen Proteinen, was in vielen Fällen eine thermodynamische Destabilisierung der Proteine zur Folge hat und eine erhöhte Missfaltungsrate nach sich zieht (siehe *Review* (Uversky & Fink, 2004)).

Trotz des für die Amyloidosen charakteristischen Merkmals der Bildung amyloider Fibrillen wird die Rolle der Fibrillen als pathogenes Agens kontrovers diskutiert (siehe *Review* (Golde *et al.*, 2006)). So wurde beispielsweise bei der Alzheimerschen Krankheit ursprünglich davon ausgegangen, dass die Fibrillen für die Cyto- und Neurotoxizität verantwortlich sind (Hardy & Allsop, 1991). Gestützt wurde diese Hypothese durch Erkenntnisse, dass Fibrillen aus A $\beta$ -Peptiden in neuronalen Zellen (*in vitro*) toxisch wirken (Pike *et al.*, 1991; Petkova *et al.*, 2005) und zu einer Veränderung der elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellmembranen führen (Hartley *et al.*, 1999). Außerdem konnte eine neurotoxische Wirkung von fibrillären A $\beta$ -

Peptiden nach Mikroinjektion in die Großhirnrinde von Rhesusaffen gezeigt werden (Geula *et al.*, 1998). In den letzten Jahren setzte sich jedoch, basierend auf Zellkulturexperimenten, vermehrt die Theorie der toxischen oligomeren Fibrillenvorläufer durch (Sousa *et al.*, 2001; Bucciantini *et al.*, 2002; Kaye *et al.*, 2003). Gestützt wird diese Theorie durch Erkenntnisse, dass die missgefalteten Mono- und Oligomere vieler amyloider Proteine eine Tendenz zur Interaktion mit Membranen und einer Ionenkanalbildung zeigen, was eine Destabilisierung der Membranen zur Folge hat (siehe *Review* (Kourie & Henry, 2002; Lashuel, 2005)). Derartige Membranwechselwirkungen wurden beispielsweise für humanes Amylin (Mirzabekov *et al.*, 1996; Janson *et al.*, 1999; Quist *et al.*, 2005), die A $\beta$ -Peptide (Arispe *et al.*, 1993, 1996; Kawahara *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 2001; Demuro *et al.*, 2005; Quist *et al.*, 2005) oder auch  $\alpha$ -Synuclein (Volles *et al.*, 2001; Volles & Lansbury, 2002; Quist *et al.*, 2005) gezeigt. Als Folge der Ionenkanalbildung wird ein unkontrollierter Ionenstrom, vor allem von Ca<sup>2+</sup>, in die Zelle diskutiert (Kawahara *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2001; Bucciantini *et al.*, 2004; Demuro *et al.*, 2005). Eine dauerhafte Störung des intrazellulären Gleichgewichts an Ca<sup>2+</sup>-Ionen zwischen Cytoplasma, Mitochondrien und ER führt zu Funktionsstörungen der Zelle und letztlich zur Apoptose (siehe *Review* (Berridge *et al.*, 1998; Mattson, 2000)). Ein gestörtes intrazelluläres Ca<sup>2+</sup>-Gleichgewicht wurde beispielsweise in Patientengeweben und Tiermodellen der Alzheimerschen Krankheit beobachtet (siehe *Reviews* (Mattson & Chan, 2001; Verkhratsky, 2005)).

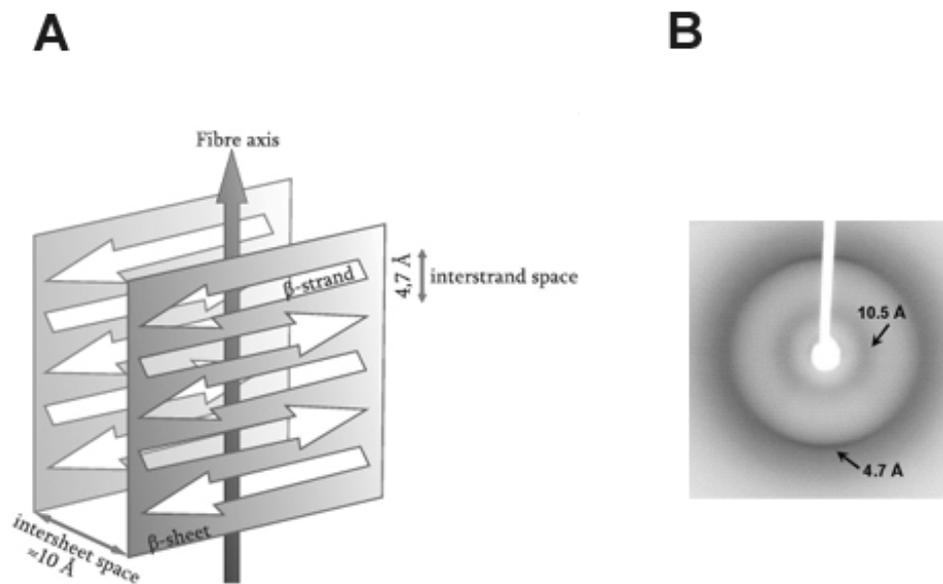
Trotz der intensiven experimentellen Analysen der letzten zwanzig Jahre ist bis heute die Pathogenese der Amyloidosen auf Proteinebene unklar. So wurden neben der Missfaltung und Anreicherung der amyloidogenen Proteine und dem angesprochenen gestörten intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Gleichgewicht Prozesse wie ER-Stress (siehe *Review* (Verkhratsky, 2005; Lindholm *et al.*, 2006)), oxidativer Stress (siehe *Reviews* (Emerit *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2007)), ein unzureichendes PQC (Bence *et al.*, 2001) (siehe *Reviews* (Gregersen *et al.*, 2006; Rubinsztein, 2006)) und entzündliche Reaktionen (Manuelidis *et al.*, 1997) (siehe *Reviews* (Wyss-Coray & Mucke, 2002; Williams & Nadler, 2007)) beobachtet. Aus dem komplexen Zusammenspiel der einzelnen zellulären Vorgänge und einem sich meist über Jahre entwickelnden Krankheitsverlauf ist ein zeitlicher Ablauf bzw. ein Ursache-Wirkungsprinzip jedoch nur schwer nachzuvollziehen. Des Weiteren ist offen, wie weit Amyloidosen einem universellen zellulären Krankheitsverlauf folgen.

## 1.2.2 Eigenschaften und Struktur amyloider Fibrillen

Unabhängig davon, ob es sich bei den amyloiden oder amyloidartigen Fibrillen um *in vivo* oder *in vitro* erzeugte, extra- oder intrazelluläre, krankheitsassoziierte oder nicht krankheitsassoziierte Fibrillen handelt, teilen alle amyloiden Fibrillen grundlegende charakteristische Eigenschaften.

Die fadenförmigen, unverzigten Makromoleküle, welche mittels AFM (*Atomic Force Microscopy*) oder der Transmissions-Elektronenmikroskopie sichtbar gemacht werden können, besitzen einen Durchmesser von ca. 7-13 nm (siehe *Reviews* (Sunde & Blake, 1997; Chiti & Dobson, 2006)). Es wird angenommen, dass eine Fibrille strukturell aus mehreren, helikal angeordneten Filamenten (Protofilamenten) aufgebaut ist (Serpell *et al.*, 2000) (siehe *Reviews* (Sunde & Blake, 1997; Chiti & Dobson, 2006)). Die Zahl der Protofilamente in der Fibrille variiert zwischen den amyloidogenen Proteinen (Jimenez *et al.*, 1999; Serpell *et al.*, 2000). Die amyloiden Fibrillen besitzen eine Affinität zu spezifischen Farbstoffen wie Kongo-Rot oder Thioflavin T (ThT) (Puchtler & Sweat, 1965; Scheibel & Serpell, 2005). Die Bindung von Kongo-Rot durch die Fibrillen erzeugt eine gelb-grüne Lichtdoppelbrechung unter kreuzpolarisiertem Licht (siehe *Reviews* (Sunde & Blake, 1997; Nilsson, 2004)). In der Regel besitzen die Fibrillen eine hohe Resistenz gegenüber SDS, Denaturierungsmitteln und proteolytischem Verdau (Brown *et al.*, 1990; Pepys *et al.*, 1993; Busch *et al.*, 2003; Scheibel *et al.*, 2003; Bocharova *et al.*, 2005).

Trotz unterschiedlicher nativer Struktur und variierender Aminosäuresequenz der amyloidogenen Proteine sind die amyloiden Fibrillen durch eine spezifische molekulare Grundstruktur, der  $\beta$ -Cross-Struktur, gekennzeichnet (siehe *Review* (Sunde & Blake, 1997)). Die  $\beta$ -Cross-Struktur ist vermutlich der Grundbaustein der Protofilamente und die maßgebliche Ursache für die charakteristischen Eigenschaften der Fibrillen. Wesentliches Merkmal der  $\beta$ -Cross-Struktur sind die im rechten Winkel zur Fibrillenachse verlaufenden  $\beta$ -Stränge, welche ein  $\beta$ -Faltblatt entlang der Fibrillenachse erzeugen (Geddes *et al.*, 1968) (siehe *Review* (Sunde & Blake, 1997)). Mehrere helikale  $\beta$ -Faltblätter bilden ein Protofilament, wobei die Faltblätter vermutlich über die Aminosäureseitenketten miteinander interagieren (Blake & Serpell, 1996; Jimenez *et al.*, 1999; Serpell *et al.*, 2000). Die  $\beta$ -Cross-Struktur ist schematisch in Abbildung 1.3 (A) gezeigt. Erste Hinweise für die Existenz einer solchen  $\beta$ -Cross-Struktur in amyloiden Fibrillen lieferten die Röntgenbeugungsmuster amyloider Ablagerungen aus Patientenproben (Eanes & Glenner, 1968; Bonar *et al.*, 1969). Die typischen Röntgenbeugungssignale bei 4.7 Å und ca. 10 Å entsprechen der Distanz der  $\beta$ -Stränge im Faltblatt bzw. dem Abstand der Faltblätter untereinander (siehe Abbildung 1.3 (B)). Die Existenz einer  $\beta$ -Faltblattstruktur und das charakteristische Röntgenbeugungsmuster gelten heute als ein wesentliches Charakteristikum amyloider Fibrillen.



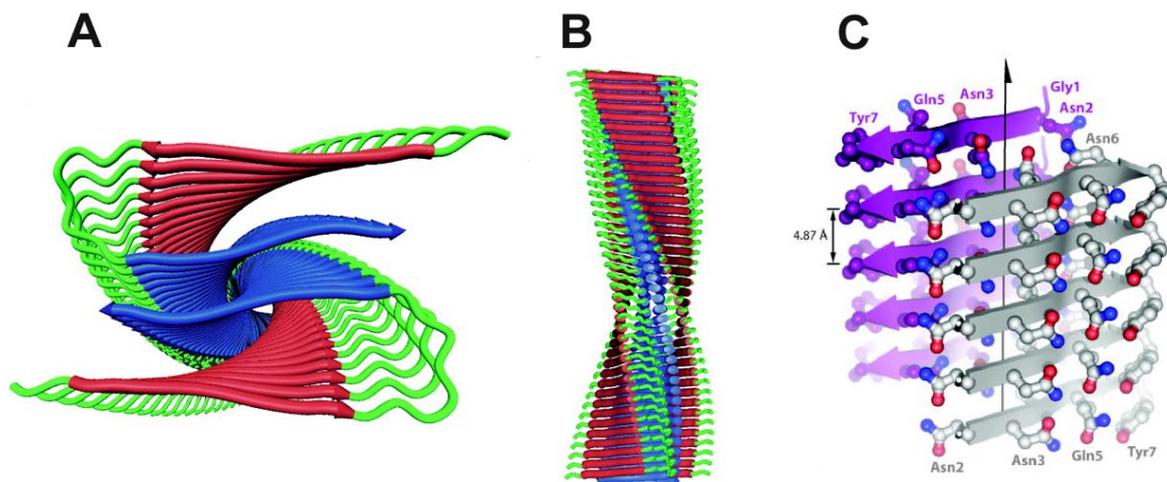
**Abbildung 1.3** Schematische Darstellung der  $\beta$ -Cross-Struktur (A) und typisches Röntgenbeugungsmuster einer amyloiden Fibrille (B). Die charakteristischen Abstände zwischen den  $\beta$ -Strängen und den  $\beta$ -Faltblättern (A) dominieren die Signale im Röntgenbeugungsmuster (B). (A) (Herczenik & Gebbink, 2008) und (B) Röntgenbeugungsmuster der amyloiden Fibrillen der T7 Endonuclease I (Guo & Eisenberg, 2006).

Da die amyloiden Fibrillen keine Kristalle bilden und aufgrund ihres unlöslichen Charakters für NMR-spektroskopische Analysen unzugänglich sind, entziehen sie sich den klassischen Methoden der Strukturaufklärung. Bis vor wenigen Jahren lieferten Techniken wie die Transmissions-Elektronenmikroskopie, AFM oder hochauflösende Röntgenbeugung die wesentlichen Informationen für die supramolekularen Strukturmodelle amyloider Fibrillen (siehe oben). Ergänzt wurden diese Methoden durch indirekte Techniken wie proteolytischem Verdau (Kheterpal *et al.*, 2001), H/D-Austausch-Experimenten (Kheterpal *et al.*, 2000) oder der Prolin-Mutagenese (Williams *et al.*, 2004), welche alle der Identifizierung der Aminosäuresequenzen der  $\beta$ -Cross-Struktur dienen. In den letzten Jahren jedoch stieg der Beitrag alternativer Methoden wie der Festkörper-NMR-Spektroskopie und der Röntgenbeugung an Mikrokristallen, welche aus amyloiden Peptiden aufgebaut sind und amyloide Eigenschaften besitzen, bei der Strukturaufklärung amyloider Fibrillen (siehe *Reviews* (Chiti & Dobson, 2006; Nelson & Eisenberg, 2006; Tycko, 2006)).

So entwickelte beispielsweise die Arbeitsgruppe von Tycko, schrittweise und im Wesentlichen auf Festkörper-NMR-Analysen basierend, ein Strukturmodell des Protofilaments von  $A\beta_{1-40}$  (siehe *Review* (Tycko, 2006)). Das entsprechende Modell ist in Abbildung 1.4 (A, B) gezeigt (Petkova *et al.*, 2006). Ein  $A\beta_{1-40}$ -Peptid bildet zwei  $\beta$ -Stränge, die jeweils Bestandteil eines  $\beta$ -

Faltblatts sind (Petkova *et al.*, 2002; Antzutkin *et al.*, 2003). Die  $\beta$ -Stränge sind parallel im Faltblatt angeordnet (Antzutkin *et al.*, 2000; Balbach *et al.*, 2002) und vier  $\beta$ -Faltblätter bilden ein Protofilament (Petkova *et al.*, 2006). Die  $\beta$ -Faltblätter interagieren intra- und intermolekular hauptsächlich über hydrophobe Wechselwirkungen und werden durch eine Salzbrücke, im Bereich zwischen den  $\beta$ -Strängen eines A $\beta_{1-40}$ -Peptids, stabilisiert (Petkova *et al.*, 2002; Antzutkin *et al.*, 2003; Petkova *et al.*, 2006). Das Strukturmodell bestätigt frühere Ergebnisse aus H/D-Austausch-Experimenten (Kheterpal *et al.*, 2000) und proteolytischem Verdau (Kheterpal *et al.*, 2001).

Anhand der Röntgenbeugung an Mikrokristallen amyloidogener Peptide entwickelte die Arbeitsgruppe von Eisenberg Strukturmodelle für die  $\beta$ -Cross-Struktur amyloider Fibrillen (Sawaya *et al.*, 2007). Die Grundlage der Analysen bildeten erste Experimente mit der amyloidogenen Sequenz GNNQQNY aus dem Hefepriion Sup35p (Balbirnie *et al.*, 2001; Diaz-Avalos *et al.*, 2003; Nelson *et al.*, 2005). Aus der Mikrokristallstruktur des Peptids wurde eine parallele Anordnung der  $\beta$ -Stränge postuliert (Diaz-Avalos *et al.*, 2003). Die Seitenketten verbinden die  $\beta$ -Faltblätter durch eine dichte sterische Verknüpfung, ohne Wassermoleküle in der Kontaktfläche, vermittelt über van der Waals-Wechselwirkungen („Dry Steric Zipper“) (Nelson *et al.*, 2005) (Abbildung 1.4 (C)). Da das Peptid im Wesentlichen aus Asparagin- und Glutamin-Resten aufgebaut ist, werden die  $\beta$ -Stränge innerhalb eines Faltblatts neben den Wasserstoffbrücken des Peptidrückgrats durch zusätzliche Wasserstoffbrücken der übereinander angeordneten Seitenketten verknüpft (Nelson *et al.*, 2005). Diese Form der Stabilisierung des Faltblatts wurde schon in früheren Arbeiten, im Besonderen für poly-glutamin-assoziierte amyloide Fibrillen, vorgeschlagen und als „Polar Zipper“ bezeichnet (Perutz *et al.*, 1994). Aufbauend auf der Analyse des Peptids GNNQQNY wurden andere amyloidogene Peptide, entsprechender amyloider Proteine, identifiziert und analysiert (Sawaya *et al.*, 2007). Aus den Untersuchungen wurden acht verschiedene Klassen eines „Dry Steric Zippers“ als Grundlage der  $\beta$ -Cross-Struktur amyloider Fibrillen postuliert. Die einzelnen Klassen unterscheiden sich in der Anordnung der  $\beta$ -Stränge im Faltblatt (parallel, antiparallel), der sich zwischen den Faltblättern gegenüberliegenden Seitenketten (gleich oder verschieden) und dem Verlauf der  $\beta$ -Stränge zwischen den Faltblättern (parallel oder antiparallel) (Sawaya *et al.*, 2007). Trotz vergleichbarer Eigenschaften der Mikrokristalle und der Fibrillen der Peptide ( $\beta$ -Cross-Struktur, gleiche Wachstumsbedingungen) basieren die Strukturmodelle jedoch lediglich auf der Struktur der Mikrokristalle und beinhalten eine relativ kurze Peptidsequenz des amyloidogenen Proteins (Sawaya *et al.*, 2007).



**Abbildung 1.4** Strukturmodelle amyloider Fibrillen von Aβ<sub>1-40</sub> (A) und (B) und des Peptids GNNQQNY (C). (A) Querschnitt und (B) Seitenansicht des Protofilaments von Aβ<sub>1-40</sub>. (C) Schematische Darstellung des „Dry Steric Zipper“ des amyloidogenen Peptids GNNQQNY aus Sup35p mit den Kohlenstoffatomen in grau oder lila, den Sauerstoffatomen in rot und den Stickstoffatomen in blau. (A) und (B) (Petkova *et al.*, 2006) und (C) (Nelson *et al.*, 2005).

Nahezu alle bisher ermittelten Strukturmodelle amyloider Fibrillen basieren auf *in vitro* erzeugten Fibrillen amyloidogener Peptidsequenzen. Bei diesen Modellen ist zu berücksichtigen, dass ein amyloidogenes Peptid oder Protein meist mehrere amyloide Strukturen ausbilden kann. Ein Phänomen, das als Polymorphismus bezeichnet wird und auch in den oben beschriebenen Beispielen der Strukturaufklärung der Fibrillen beobachtet wurde (Petkova *et al.*, 2005; Sawaya *et al.*, 2007). Des Weiteren sollte erwähnt werden, dass die *ex vivo*-Fibrillen aus Patientengewebe neben dem amyloiden Protein meist auch andere Bestandteile wie Glycosaminglycane, Proteoglycane, das Serum Amyloid Protein P (SAP), Metallionen und andere Substanzen beinhalten (siehe *Reviews* (Hirschfield & Hawkins, 2003; Alexandrescu, 2005)).

### 1.2.3 Amyloide Fibrillen als alternativer, funktioneller Faltungszustand

Die Entdeckung, dass auch nicht krankheitsassoziierte Proteine *in vitro* amyloide Fibrillen bilden können (Damaschun *et al.*, 2000; Fändrich *et al.*, 2001), führte zur Hypothese der amyloiden Struktur als universellem alternativen Faltungszustand (Dobson, 2004). Gestützt wird diese Hypothese durch Beobachtungen, dass amyloide Fibrillen in Bakterien, Pilzen, Insekten und sogar im Menschen funktionell sein können (siehe *Reviews* (Chiti & Dobson, 2006; Fowler *et al.*, 2007)).

Ein gut dokumentiertes Beispiel für funktionelle amyloide Strukturen sind die Curli-Fasern aus *E. coli* und verschiedenen *Salmonella*-Spezies (Chapman *et al.*, 2002). In einem hoch geordneten Prozess, der sechs verschiedene Proteine beinhaltet und von variierenden Umweltbedingungen reguliert wird, findet eine extrazelluläre Fibrillierung des Hauptbestandteils der Curli-Fasern, dem CsgA-Protein, statt (siehe *Review* (Barnhart & Chapman, 2006)). Die Curli-Fasern besitzen alle wesentlichen Eigenschaften amyloider Fibrillen (Chapman *et al.*, 2002; Cherny *et al.*, 2005) und bilden eine extrazelluläre Matrix, welche die Bindung an Wirtszellen und inerten Oberflächen sowie die Bildung von Biofilmen vermittelt (siehe *Review* (Barnhart & Chapman, 2006)).

Die Hydrophobine sind amyloidogene Proteine aus Pilzen und erlauben die Bildung von Sporen und Fruchtkörpern. Die Fibrillierung der amphipathischen Hydrophobine findet meist an Phasengrenzflächen statt (Butko *et al.*, 2001; Mackay *et al.*, 2001).

Die Fibrillen der Chorion-Proteine von Insekten und Fischen schützen aufgrund ihrer hohen Stabilität die Eischalen der Spezies vor physikalischen Einflüssen und proteolytischem Verdau (Iconomidou *et al.*, 2000; Podrabsky *et al.*, 2001).

Gut untersucht sind auch die Hefe-Prionen Sup35p und Ure2p aus *S. cerevisiae*. Beide Proteine fungieren als nicht chromosomale genetische Elemente und verschaffen den Organismen einen Wachstumsvorteil durch phänotypische Plastizität, bedingt durch die native und alternative amyloide Faltung der Proteine (siehe *Review* (Shorter & Lindquist, 2005; Chiti & Dobson, 2006)). Sup35p beispielsweise ist ein Translations-Terminationsfaktor (Stansfield *et al.*, 1995; Zhouravleva *et al.*, 1995). Die Fibrillierung von Sup35p führt zu einem vermehrten „Überlesen“ von Stop-Kodons in den Zellen, was ein verändertes Proteom zur Folge hat (Paushkin *et al.*, 1996; Eaglestone *et al.*, 1999; True & Lindquist, 2000).

In den letzten Jahren konnte eine erste funktionelle amyloide Struktur auch in Säugerorganismen gezeigt werden (siehe *Review* (Fowler *et al.*, 2007)). Die aus einer proteolytischen Spaltung des glykosylierten Transmembran-Proteins Pmel17 hervorgehende M $\alpha$ -Untereinheit ist Hauptbestandteil der amyloiden Strukturen in den Melanosomen von Melanocyten und dem Retinal-Pigment-Epithelium der Organismen (Berson *et al.*, 2001; Berson *et al.*, 2003; Fowler *et al.*, 2006). Die amyloiden Fibrillen fungieren als Matrix für die Polymerisierung der tyrosinbasierten Melaninvorläufer zu Melanin (Berson *et al.*, 2003; Fowler *et al.*, 2006). Die Verwendung variierender amyloider Strukturen *in vitro* zeigte, dass der amyloide Charakter der M $\alpha$ -Polymere die Melaninsynthese reguliert (Fowler *et al.*, 2006).

Neben den hier aufgeführten Beispielen funktioneller amyloider Strukturen in der Natur versucht zunehmend auch der Mensch, sich die Eigenschaften amyloider Fibrillen für technische Anwendungen zu Nutze zu machen. Die Fibrillen fungieren dabei meist als Matrix, um mit leit-

fähigen Materialien (Metall) dekoriert zu werden und dann als „Nanokabel“ zu fungieren (Reches & Gazit, 2003; Scheibel *et al.*, 2003; Baldwin *et al.*, 2006).

## 1.3 Poly-alanin-induzierte Proteinmissfaltungen

### 1.3.1 Poly-alanin-assoziierte Krankheiten

Trinukleotidexpansionen bilden die Ursache verschiedener Krankheiten, welche entsprechend ihrer Lage im Genom unterschieden werden. So gibt es einerseits Erkrankungen, bei denen nicht translatierte Bereiche von der Trinukleotidexpansion betroffen sind und andererseits Erkrankungen, bei denen die Trinukleotidexpansion die Erweiterung nativer Poly-Aminosäure-Sequenzen als Folge hat (siehe *Review* (Everett & Wood, 2004)). Die wohl bekannteste Gruppe der zweiten Form der Erkrankung sind die mit einer Expansion von Poly-Glutamin-Sequenzen assoziierten Erkrankungen. Die poly-glutamin-assoziierten Krankheiten sind neurodegenerative Erkrankungen, die den Proteinmissfaltungs-Krankheiten zuzuordnen sind und beispielsweise die Huntingtonsche Krankheit beinhalten (siehe *Reviews* unten). Die aus Poly-Glutamin-Sequenzen hervorgehenden Proteinablagerungen umfassen die wesentlichen Charakteristika amyloider Fibrillen, sind jedoch meist intranukleär lokalisiert (siehe *Reviews* (Kim *et al.*, 2005; Orr & Zoghbi, 2007; Shao & Diamond, 2007)).

Neben der Expansion von Poly-Glutamin-Sequenzen wurde auch die Erweiterung natürlicher Poly-Alanin-Sequenzen als Ursache für eine Reihe von Krankheiten beschrieben (siehe *Reviews* (Amiel *et al.*, 2004; Albrecht & Mundlos, 2005)). So wurden bis zum heutigen Zeitpunkt neun verschiedene poly-alanin-assoziierte Krankheiten gefunden. Bei acht der neun Krankheiten sind Transkriptionsfaktoren von der Poly-Alanin-Expansion betroffenen. Das Krankheitsbild dieser Krankheiten ist durch Entwicklungsstörungen und Missbildungen geprägt (siehe *Review* (Albrecht & Mundlos, 2005)).

Die Erweiterung einer N-terminalen Poly-Alanin-Sequenz im Transkriptionsfaktor HOXD13 beispielsweise führt zur Synpolydaktylie, einer Missbildung und Verwachsung von Zehen und Fingern (Muragaki *et al.*, 1996; Goodman *et al.*, 1997). Ein anderes Beispiel betrifft den Transkriptionsfaktor SOX3. Dieser wird überwiegend im fötalen Hirn und Rückenmark exprimiert. Eine Erweiterung der Poly-Alanin-Sequenz von SOX3 führt zu einer X-chromosomal rezessiv vererbten geistigen Fehlentwicklung und Kleinwüchsigkeit, welche auf einen Mangel an Wachstumshormonen zurückzuführen sind (Laumonier *et al.*, 2002).

Die im Wesentlichen in Zellkultur durchgeführten Analysen der letzten Jahre ergaben, dass es sich bei den poly-alanin-assoziierten Krankheiten vermutlich, wie im Fall der poly-glutamin-

assoziierten Krankheiten, um Proteinmissfaltungs-Krankheiten handelt und die Tendenz zur Missfaltung mit der Länge der Expansionen steigt (Albrecht *et al.*, 2004; Caburet *et al.*, 2004; Nasrallah *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2007). Über die Funktion der Poly-Alanin-Sequenzen ist bisher nichts bekannt. Erstaunlich ist jedoch, dass die Poly-Alanin-Sequenzen mit 10 bis maximal 20 Alaninen, im nicht krankheitsassoziierten Zustand, relativ kurz sind und eine Erweiterung von durchschnittlich nur 5 Alaninen genügt, um ein entsprechendes Krankheitsbild hervorzurufen. In Patienten wurden Poly-Alanin-Sequenzen mit maximal 33 Resten gefunden (siehe *Reviews* (Amiel *et al.*, 2004; Albrecht & Mundlos, 2005)). Dies steht im Gegensatz zu den polyglutamin-assoziierten Krankheiten. Die Zahl an Glutaminen umfasst bei den krankheitsassoziierten Proteinvarianten meist mehr als 40 Reste. Die in Patienten gefundenen Expansionen können bis zu 300 Glutamine aufweisen (siehe *Review* (Shao & Diamond, 2007)).

### 1.3.2 Die Krankheit OPMD und das assoziierte Protein PABPN1

Die einzige der neun bekannten poly-alanin-assoziierten Krankheiten, bei denen das betroffene Protein keinen Transkriptionsfaktor darstellt, ist die Okulopharyngeale Muskeldystrophie (OPMD). OPMD ist eine autosomal dominant vererbte Krankheit, die meist in der sechsten Lebensdekade beginnt. Der progressive Verlauf der Krankheit beinhaltet charakteristische Symptome wie hängende Augenlider, proximale Gliederschwäche und Aspirations- und Schluckbeschwerden, die meist eine künstliche Ernährung der Patienten im fortgeschrittenen Krankheitsstadium erfordern (siehe *Reviews* (Brais, 2003; Abu-Baker & Rouleau, 2007)). Als pathologisches Merkmal der Krankheit wurden in den 80er Jahren erstmals intranukleäre fibrilläre Ablagerungen in Muskelfasern gefunden (Tomé & Fardeau, 1980).

Das mit der OPMD assoziierte Protein ist das nukleäre Poly(A)-bindende Protein 1 (PABPN1). Trinukleotidexpansionen eines GCG-Tripletts führen zu einer Expansion einer N-terminalen Poly-Alanin-Sequenz von PABPN1. Während das unmutierte PABPN1 zehn aufeinander folgende Alanine besitzt, umfassen die krankheitsassoziierten Varianten 12 (homozygot auch 11) bis maximal 17 Alanine (Brais *et al.*, 1998).

Wildtyp-PABPN1 ist ein Multidomänen-Protein von 306 Aminosäuren. Die N-terminale Domäne des Proteins umfasst 124 Aminosäuren, hat einen isoelektrischen Punkt im sauren pH-Bereich und besitzt verhältnismäßig viele Prolin-Reste (20) (Nemeth *et al.*, 1995; Scheuermann *et al.*, 2003). Die Poly-Alanin-Sequenz befindet sich direkt hinter dem Start-Methionin. Die Reste 161-257 umfassen eine RNA-Binde-Domäne (RBD) (Nemeth *et al.*, 1995). Die basische C-terminale Domäne ist reich an dimethylierten Arginin-Resten und beinhaltet ein Kernlokali-

sations-Signal (NLS) (Nemeth *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1999; Calado *et al.*, 2000a). Die Reste 125-161 sind essentiell für die Stimulation der Poly(A)-Polymerase (Kerwitz *et al.*, 2003).

PABPN1 ist an der post-transkriptionellen Modifizierung der Prä-mRNA beteiligt (Wahle, 1991). Nach der Bindung des CPSF (*Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor*) an die RNA, vermittelt durch das Polyadenylierungssignal (AAUAAA), und einer endonukleolytischen Spaltung der Prä-mRNA bindet PABPN1 an die ersten Nukleotide des wachsenden Poly(A)-Schwanzes und rekrutiert, zusammen mit dem CPSF, die Poly(A)-Polymerase für eine effektive Synthese des Poly(A)-Schwanzes (Bienroth *et al.*, 1993; Kerwitz *et al.*, 2003). PABPN1 kontrolliert außerdem die Länge des Poly(A)-Schwanzes (ca. 250 Nukleotide) (Wahle, 1995) und bildet lineare und sphärische oligomere Strukturen an der mRNA (Keller *et al.*, 2000).

Analysen der intranukleären Ablagerungen von OPMD-Patienten ergaben, dass diese im Wesentlichen PABPN1 neben anderen Zellbestandteilen wie RNA, Ubiquitin und Proteasom-Untereinheiten beinhalten (Becher *et al.*, 2000; Calado *et al.*, 2000b; Uyama *et al.*, 2000). Die Expression von humanem PABPN1 in transgenen Mäusen führte zu einer poly-alanin-abhängigen Myopathie und intranukleären Ablagerungen des Proteins (Hino *et al.*, 2004). In Analogie zu anderen poly-alanin-assoziierten Krankheiten und den entsprechenden Proteinen konnte in Zellkultur eine cytoplasmatische und intranukleäre Aggregation von PABPN1, in Abhängigkeit der Länge der Poly-Alanin-Sequenz, gezeigt werden (Shanmugam *et al.*, 2000; Fan *et al.*, 2001; Bao *et al.*, 2002). *In vitro*-Analysen der N-terminalen Domäne von PABPN1 zeigten, dass sich in Abhängigkeit von der Anwesenheit der Poly-Alanin-Sequenz extrem stabile, fibrilläre Strukturen bilden, die alle wesentlichen Merkmale amyloider Fibrillen erfüllen (Scheuermann, 2003; Scheuermann *et al.*, 2003; Lodderstedt *et al.*, 2007).

### 1.3.3 Eigenschaften von Poly-Alanin-Peptiden

*In vitro*-Analysen von Poly-Alanin-Peptiden haben gezeigt, dass die löslichen Peptide eine Tendenz zur Ausbildung  $\alpha$ -helikaler Strukturen besitzen (Blondelle *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 2002). Jedoch ist aufgrund des aliphatischen Charakters der Alanine eine Analyse reiner Poly-Alanin-Peptide in wässriger Lösung nur schwer möglich. Die in den Experimenten verwendeten, flankierenden Löslichkeitsvermittelnden Aminosäuren beeinflussen somit die Tendenz für die Ausbildung einer helikalen Struktur (Miller *et al.*, 2001).

Es konnte schon früh gezeigt werden, dass die Tendenz der Poly-Alanine, sich gegenüber einem wässrigen Lösungsmittel abzuschirmen und höher molekulare Strukturen zu bilden, zur Ausbildung extrem stabiler makromolekularer  $\beta$ -Faltblattstrukturen führt (Forood *et al.*, 1995; Perez-

Paya *et al.*, 1996). Weiterführende Analysen zeigten, dass die aus den Poly-Alanin-Peptiden gebildeten makromolekularen Strukturen alle wesentlichen Eigenschaften amyloider Fibrillen, also  $\beta$ -Cross-Strukturen, aufweisen (Blondelle *et al.*, 1997; Shinchuk *et al.*, 2005). Die Bildung der Fibrillen ist abhängig von der Anzahl der Alanine im Peptid, der Peptidkonzentration und der Temperatur (Blondelle *et al.*, 1997; Shinchuk *et al.*, 2005). Die *in vitro*-Analysen wurden durch eine Reihe von MD-Simulationen (*molecular dynamics simulations*) bestätigt (Nguyen & Hall, 2004, 2006).

Entsprechend der Hypothese, dass es sich bei den poly-alanin-induzierten Krankheiten um Proteinmissfaltungs-Krankheiten handelt (siehe 1.3.1) konnte gezeigt werden, dass die Fusion von Poly-Alaninen mit einem „Reporter“-Protein (GFP) in Zellkultur zur Aggregation der Fusionen und einem erhöhten Zelltod führt (Rankin *et al.*, 2000; Bao *et al.*, 2002; Wang & Monteiro, 2007).

## 1.4 Zielstellung der Arbeit

### 1.4.1 Ausgangspunkt und Ziel der Arbeit

Wie unter 1.3.3 bereits erwähnt, zeigen Poly-Alanin-Peptide eine Tendenz zur Bildung makromolekularer Strukturen mit amyloiden Eigenschaften. Ähnliche Ergebnisse wurden von T. Scheuermann bei der biophysikalischen Charakterisierung der N-terminalen Domäne von PABPN1 erhalten (Scheuermann *et al.*, 2003). Die Analysen von Scheuermann basierten ausschließlich auf der N-terminalen Domäne von PABPN1 mit unterschiedlich langen Poly-Alanin-Sequenzen, da das Voll-Längen-Protein, vermutlich aufgrund seiner unterschiedlich geladenen Termini, zur Bildung von amorphen Aggregaten tendiert. Da für die N-terminale Domäne jedoch keine Tertiärstruktur nachgewiesen werden konnte, konnte der Einfluss einer gefalteten Domäne auf die amyloiden Eigenschaften der N-terminalen Domäne von PABPN1 nicht analysiert werden (Scheuermann, 2003; Lodderstedt *et al.*, 2007). So waren zu Beginn dieser Arbeit keine Beispiele zu *in vitro*-Analysen einer poly-alanin-abhängigen Fibrillenbildung eines stabil gefalteten Proteins verfügbar.

Ziel der Arbeit war deshalb die Analyse einer poly-alanin-abhängigen amyloiden Fibrillenbildung im Kontext eines stabil gefalteten Proteins. Da PABPN1, wie oben beschrieben, zur Bildung amorpher Strukturen tendiert und weder der Faltungsmechanismus noch die Struktur des Proteins bekannt ist, wurde der Einfluss einer benachbarten, stabil gefalteten Domäne auf die poly-alanin-induzierte amyloide Fibrillenbildung der N-terminalen Domäne von PABPN1 an-

hand einer Fusion mit einem gut charakterisierten Modellprotein untersucht. Als Modellprotein diente das Kälteschockprotein B (CspB) aus *Bacillus subtilis*.

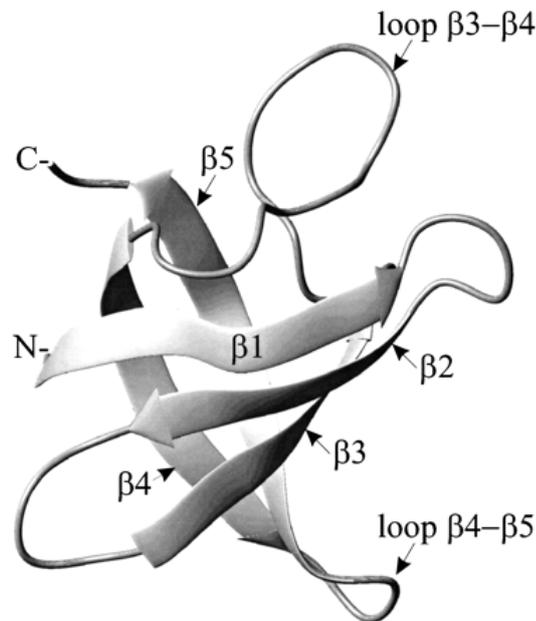
### 1.4.2 CspB als Modellprotein

Das Kälteschockprotein B (CspB) aus *Bacillus subtilis* ist ein Mitglied aus einer Familie von drei identifizierten Kälteschockproteinen (B, C, D) (Graumann *et al.*, 1996) des Bakteriums. Die Kälteschockproteine aus *B. subtilis* besitzen eine hohe Sequenzidentität (> 70 %) (Graumann *et al.*, 1996). Sie werden vermehrt bei niedrigen Temperaturen, aber auch bei optimalen Wachstumstemperaturen synthetisiert und sind in der Lage, sich gegenseitig zu komplementieren. Ihre Fähigkeit, einzelsträngige Nukleinsäuren zu binden, bestimmt vermutlich ihre Funktion als „RNA-Chaperone“. Es wird angenommen, dass die Csps mRNA-Moleküle binden und dadurch die Bildung von mRNA-Sekundärstrukturen unterdrücken. Das Ergebnis wäre eine effektivere Translation, besonders bei niedrigen Temperaturen (Graumann *et al.*, 1997). Analysen in einem zellfreien Expressionssystem ergaben jedoch, dass CspB sowohl die Transkription als auch die Translation blockiert (Hofweber *et al.*, 2005). Die Csps besitzen eine hohe Sequenzidentität (ca. 40%) zu den Kälteschock-Domänen (CSD) eukaryotischer Y-Box-Proteine (Graumann & Marahiel, 1996).

CspB ist ein Eindomänen-Protein bestehend aus 67 Aminosäuren. Das Protein ist mit 7.4 kDa vergleichsweise klein. Die Struktur des Proteins konnte sowohl über Kristallographie als auch über NMR-Spektroskopie bestimmt werden (Schindelin *et al.*, 1993; Schnuchel *et al.*, 1993). CspB ist aus einem fünfsträngigen, antiparallelen  $\beta$ -Barrel aufgebaut und besitzt einen OB-Fold (Oligonukleotid-Bindungs-Motiv). Der OB-Fold vermittelt die bereits angesprochene Bindung von einzelsträngigen Oligonukleotiden. Das Protein besitzt eine Präferenz für die Bindung von Polythymidin-Oligonukleotiden (Max *et al.*, 2006; Zeeb *et al.*, 2006).

CspB ist aus verschiedenen Gründen ein ausgezeichnetes Modellprotein. Wie oben bereits erwähnt, ist es ein vergleichsweise kleines Eindomänen-Protein (ohne Disulfidbrücken) mit bekannter Struktur. Der Faltungsmechanismus des Proteins ist gut charakterisiert. Eine Reihe thermodynamischer und kinetischer Analysen sprechen für eine Faltung nach einem Zwei-Zustands-Modell (Schindler *et al.*, 1995; Schindler & Schmid, 1996; Zeeb & Balbach, 2005; Garcia-Mira & Schmid, 2006), obgleich eine Arbeit von Sanchez und Kiefhaber die Existenz eines obligatorischen Faltungsintermediates für CspB postuliert (Sanchez & Kiefhaber, 2003). CspB besitzt eine geringe thermodynamische Stabilität und eine schnelle Faltung und Rückfaltung (Millisekunden), was zu einem dynamischen thermodynamischen Gleichgewicht führt (siehe Zitate oben). In den letzten Jahren erfolgte eine ausführliche Charakterisierung thermo-

dynamisch stabilisierter CspB-Varianten, welche mittels *in vitro*-Evolution identifiziert wurden (Martin *et al.*, 2002; Wunderlich *et al.*, 2005; Max *et al.*, 2007). Die korrekte Faltung von CspB kann über dessen Bindung zu einzelsträngigen Oligonukleotiden leicht nachgewiesen werden (Lopez *et al.*, 1999, 2001; Zeeb & Balbach, 2003; Zeeb *et al.*, 2006).

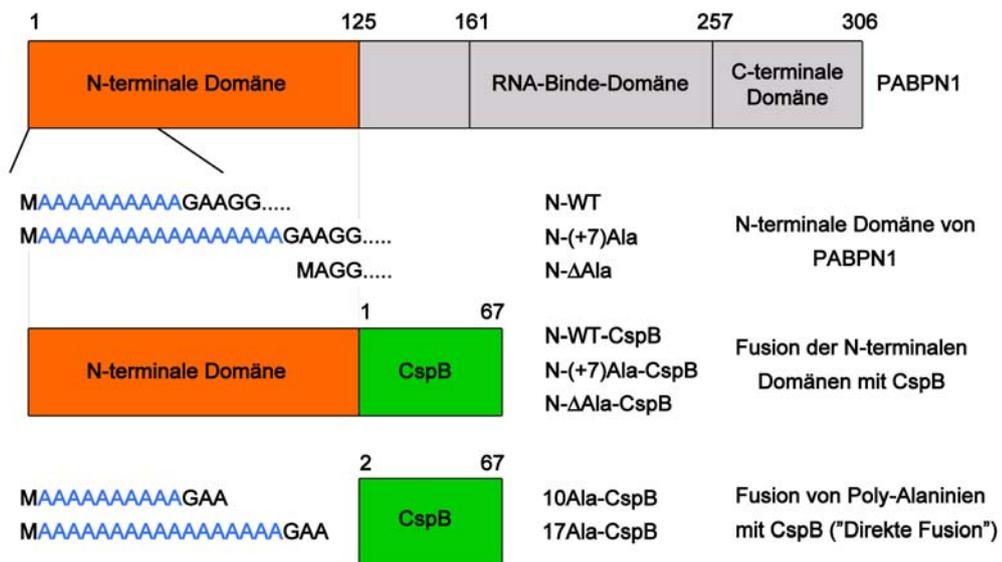


**Abbildung 1.5** Strukturmodell von CspB aus *B. subtilis*. Das Protein besteht aus fünf antiparallelen  $\beta$ -Strängen, wobei die Stränge 1-3 und 4 und 5 ein Faltblatt bilden (Zeeb & Balbach, 2003) gemäß der über Kristallographie bestimmten Struktur (Schindelin *et al.*, 1993).

### 1.4.3 Fusionskonstrukte

Um den Einfluss einer gefalteten Domäne auf die poly-alanin-abhängige Fibrillenbildung der N-terminalen Domäne von PABPN1 zu bestimmen, sollten drei verschiedene Fusionen aus N-terminaler Domäne und CspB rekombinant hergestellt und analysiert werden. Die Fusionen enthielten eine N-terminale Domäne mit einem Poly-Alanin-Segment einer Länge von 10 Alaninen, entsprechend dem Wildtyp von PABPN1, 17 Alaninen, entsprechend der krankheitsassoziierten Variante mit der extremsten Alaninzahl und ein deletiertes Poly-Alanin-Segment als Negativ-Kontrolle (siehe Abbildung 1.6). Nach einer biophysikalischen Charakterisierung der Fusionen sollten diese auf ihre amyloiden Eigenschaften untersucht werden.

Um zu zeigen, dass Poly-Alanin-Sequenzen generell einen amyloidogenen Charakter besitzen und diese amyloidogenen Eigenschaften auf ein beliebiges stabil gefaltetes Protein übertragbar sind, sollten auch direkte Fusionen aus Poly-Alanin-Sequenzen und CspB auf ihre amyloiden Eigenschaften untersucht werden (siehe Abbildung 1.6).



**Abbildung 1.6** Schematische Darstellung der verschiedenen, in dieser Arbeit analysierten Fusionen. Ausgehend vom Voll-Längen-PABPN1 wurden drei verschiedene Varianten der N-terminalen Domänen (N-WT, N-(+7)Ala und N-ΔAla) mit CspB fusioniert. Außerdem wurden Fusionen aus Poly-Alaninen und CspB (10Ala-, 17Ala-CspB) analysiert.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Acetonitril ( Rotisolv <sup>®</sup> HPLC gradient grade)	Roth (Karlsruhe)
Acrylamidstammlösung (30 %ig mit 0.8 % Bisacrylamid)	Roth (Karlsruhe)
Agarose	GERBU (Gaiberg)
Ampicillin	Sigma (St. Louis, USA)
ANS	Sigma (St. Louis, USA)
APS	Roth (Karlsruhe)
Bacitracin	Roche Diagnostics (Mannheim)
Bromphenolblau	Sigma (St. Louis, USA)
Coomassie brillant blau	Fluka (Buchs, CH)
EDTA	Applichem (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Applichem (Darmstadt)
GdmCl	NiGU Chemie (Waldkraiburg)
GdmCl ( <i>ultra pure</i> ) (für analytische Zwecke)	MP Biomedicals (Eschwege)
GdmSCN	Merck (Darmstadt)
Glycerin	Sigma (St. Louis, USA)
Harnstoff ( <i>ultra pure</i> )	Fluka (Buchs, CH)
Hefeextrakt	Roth (Karlsruhe)
Imidazol	Fluka (Buchs, CH)
IPTG	Applichem (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka (Buchs, CH)
Kanamycin	Fluka (Buchs, CH)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
2-Mercaptoethanol	Fluka (Buchs, CH)
Na-Azid	Merck (Darmstadt)
Na-Cacodylat Trihydrat	Roth (Karlsruhe)
NaDOC	VEB Berlin Chemie (Berlin)

PEG 35 000	Fluka (Buchs, CH)
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Roti®) (25 : 24 : 1)	Roth (Karlsruhe)
Proteaseinhibitormix ( <i>complete, EDTA free</i> )	Roche Diagnostics (Mannheim)
SDS	Roth (Karlsruhe)
Sucrose	Roth (Karlsruhe)
TCA	Roth (Karlsruhe)
TEMED	Roth (Karlsruhe)
Trifluoressigsäure	Roth (Karlsruhe)
Tris	MP Biomedicals (Eschwege)
Trypton/Pepton	Roth (Karlsruhe)
L-Tryptophan	Fluka (Buchs, CH)
Tween 20	Roth (Karlsruhe)
Uranylacetat	Plano (Wetzlar)

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

### 2.1.2 Säulenmaterialien

Ni-NTA ( <i>His-Bond Resin</i> ) (50 ml)	Novagen (Bad Soden)
Superdex™ 75 <i>prep grade Hi Load</i> ™ 16/60 (120 ml)	Amersham Biosciences (Freiburg)
EC125/4 Nucleosil 100-5 C18-Säule	Macherey-Nagel (Düren)
Nucleosil 5u C18 (125 x 4 mm 5 micron)	Phenomenex (Aschaffenburg)

### 2.1.3 Enzyme, Antikörper und Proteine

Alkalische-Phosphatase aus Kälberdarm	New England Biolabs (Schwalbach)
Anti-His <sub>6</sub> -Peroxidase	Roche Diagnostics (Mannheim)
Benzonase Reinheitsgrad II	Merck (Darmstadt)
CspB aus <i>Bacillus subtilis</i>	M. Wunderlich (Universität Bayreuth), R. Sachs (Universität Halle)
Lysozym aus Hühnereiweiß	Sigma (St. Louis, USA)
Proteinase K aus <i>Tritirachium album</i>	Sigma (St. Louis, USA)

Restriktionsenzyme <i>NdeI</i> und <i>BamHI</i>	New England Biolabs (Schwalbach)
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Thermolysin aus <i>Bacillus thermoproteolyticus</i>	Sigma (St. Louis, USA)
Thrombin-Agarose aus Rinderplasma	Sigma (St. Louis, USA)

## 2.1.4 Bakterienstämme und Plasmide

Für die Genexpression wurde folgender Bakterienstamm verwendet.

*E. coli* BL21 (DE3) Gold                      Stratagene (Heidelberg)  
 Genotyp:        B, F- *dcm*+ Hte *ompT hsdS*(r<sub>B</sub>- m<sub>B</sub>-) *gal l* (DE3) *endA Tet<sup>r</sup>*

Folgende Plasmide wurden verwendet.

pET15b	Novagen (Bad Soden)
pET11a	Novagen (Bad Soden)
pUBS520	Dr. Ulrich Brinkmann (Epidauros Biotechnology, Bernried) (Brinkmann <i>et al.</i> , 1989)

Für die Amplifizierung und Fusion der Fragmente der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB wurde der Vektor pET15b mit den kodierenden Sequenzen der N-terminalen Domänen von PABPN1 (Scheuermann, 2003) und der Vektor pET11a mit der Gensequenz von CspB (Wunderlich *et al.*, 2005) genutzt. Die kodierenden Sequenzen der Fusionen aus Poly-Alaninen und CspB befanden sich im Vektor pET15b (von Einem, 2006).

## 2.1.5 Kulturmedien

SOB-Medium:	2 g/l Trypton/Pepton; 0.5 g/l Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2.5 mM KCl
SOC-Medium:	SOB-Medium; 10 mM MgSO <sub>4</sub> ; 0.4 g/l Glucose
LB-Medium (modifiziert):	10 g/l Trypton/Pepton; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl
LB-Platten:	LB-Medium (modifiziert); 2 g/l Agar Agar

Antibiotika wurden in Endkonzentrationen von 0.1 mg/ml für Ampicillin und 0.05 mg/ml für Kanamycin eingesetzt.

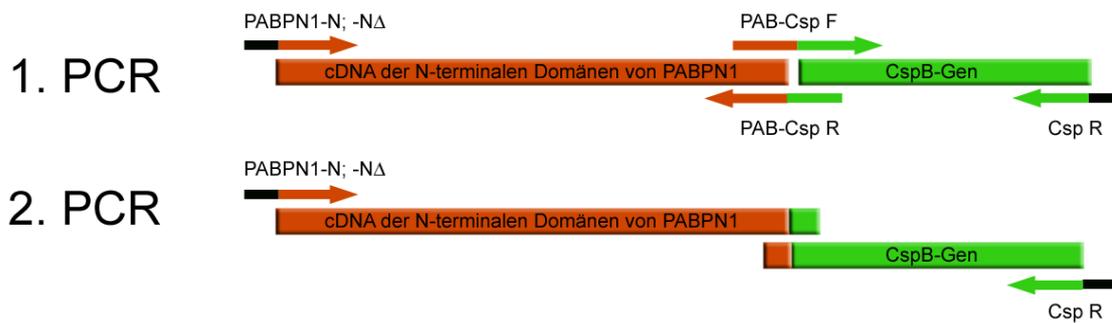
### 2.1.6 Primer und Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer und anderen Oligonukleotide sind in Tabelle 2.1 aufgelistet. Alle Oligonukleotide mit Ausnahme der Primer für die Sequenzierungen wurden von der Firma Thermo Electron (Ulm) in HPLC-gereinigter Form bezogen. Die Sequenzierungsprimer waren „IRD 800“-fluoreszenzmarkiert und wurden von MWG Biotech (Ebersberg), ebenfalls in HPLC-gereinigter Form, bezogen.

**Tabelle 2.1** Verwendete Primer und Oligonukleotide

Primer	Sequenz	Anwendung
PABPN1-N	5'-CCG CGC GGC AGC CAT ATG GCA GCA-3'	Primer für das 5'-Ende der cDNA von N-(+7)Ala und N-WT
PABPN1-NΔ	5'-CCG CGC GGC AGC CAT ATG GCA GGA-3'	Primer für das 5'-Ende der cDNA von N-ΔAla
PAB-Csp R	5'-CCA TTT TAC TTT ACC TTC TAA CAT TCG AGC TTT TAT TGC TTC TAA-3'	Primer für das 3'-Ende der cDNAs der N-terminalen Domänen von PABPN1
PAB-Csp F	5'-TTA GAA GCA ATA AAA GCT CGA ATG TTA GAA GGT AAA GTA AAA TGG-3'	Primer für das 5'-Ende der Gensequenz von CspB
Csp R	5'-CGG GAT CCT TAC GCT TCT TTA GTA ACG TT-3'	Primer für das 3'-Ende der Gensequenz von CspB
T7-Promotor	5'-CGA AAT TAA TAC GAC TCA C-3'	Primer für die Sequenzierung
T7-Terminator	5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG G-3'	Primer für die Sequenzierung
dT 7	5'-TTT TTT T-3'	CspB-Aktivitätsassay

Die Primer PAB-Csp R und PAB-Csp F sind revers-komplementär zueinander und dienen der Erweiterung der cDNA-Sequenzen der N-terminalen Domänen von PABPN1 um die 5'-Gen-Sequenz von CspB und der 5'-Gen-Sequenz von CspB mit der 3'-cDNA-Sequenzen der N-terminalen Domänen von PABPN1 (siehe Abbildung 2.1). Die resultierenden überlappenden Sequenzen der PCR-Produkte sollten eine Fusion der beiden ORFs in einer zweiten PCR ermöglichen (siehe Abbildung 2.1).



**Abbildung 2.1** Schematische Darstellung der Fusion der kodierenden Sequenzen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB. In der ersten PCR erfolgte eine Amplifizierung der einzelnen Fragmente, in der zweiten PCR die Fusion der kodierenden Sequenzen.

### 2.1.7 Kits und Standards

Folgende molekularbiologische *Kits* wurden verwendet.

<i>CycleReader™ Auto DNA Sequencing Kit</i>	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>ECL™ Western Blotting Detection Reagents</i>	Amersham Biosciences (Freiburg)
<i>Expand High Fidelity PCR System</i>	Roche Diagnostics (Mannheim)
<i>E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I + II</i>	Peqlab (Erlangen)
<i>Kodak™ Processing Chemicals</i>	Sigma (St. Louis, USA)
(Entwickler und Fixierer für Westernblots)	
<i>Qiaquick® Gel Extraction Kit</i>	Qiagen (Hilden)
<i>Qiaquick® PCR Purification Kit</i>	Qiagen (Hilden)
Sequagel XR Acrylamidlösung	Biozym Diagnostik (Hessisch Oldendorf)
Sequagel XR Komplettpuffer	Biozym Diagnostik (Hessisch Oldendorf)

Folgende Standards wurden verwendet.

<i>GeneRuler™ 1kb DNA-Leiter</i>	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
PeqGold Protein-Marker	Peqlab (Erlangen)
PeqGold Protein-Marker II	Peqlab (Erlangen)

### 2.1.8 Geräte

CD-Spektrapolarimeter J-810	Jasco Systems (Groß-Umstadt)
Chromatographieeinheit ÄKTA <i>Explorer</i>	Amersham Biosciences (Freiburg)
Fluoreszenzspektrometer Jobin Yvon Fluoromax 2 (mit temperierbarem Küvettenhalter)	SPEX Instruments (Edison, NJ, USA)

Gaulin Micron Lab 40 (Hochdruckhomogenisator)	APV (Lübeck)
<i>Gene Pulser</i> <sup>®</sup> II	Bio Rad (München)
HPLC-Anlage Gina 50	GynkoteK GmbH (Germering)
LiCor 4000 <i>DNA-Sequencer</i>	MWG Biotech (Ebersberg)
<i>Mastercycler Gradient</i>	Eppendorf (Hamburg)
Optima <sup>™</sup> TLX <i>Ultracentrifuge</i>	Beckman-Coulter (Palo Alto, USA)
<i>Power Supply</i> EPS 300, 600, 3500	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Semi-Phor Westernblotapparatur	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Ultrospec 4000 Photometer	Pharmacia Biotech (Freiburg)
UP 200S Ultraschallprozessor mit Mikrospritze S2	Hielscher Ultrasonics (Teltow)
V 560 Photometer	Jasco Systems (Groß-Umstadt)

### 2.1.9 Sonstige Materialien

Dialyseschläuche <i>MWCO</i> 3 000	Spectrum Laboratories (Rancho Dominguez, USA)
Kohlebeschichtete Kupfergrids	Plano (Wetzlar)
Lumi-Film <i>Chemiluminescent Detection Film</i>	Roche Diagnostics (Mannheim)
Nitrocellulosemembran (0.45 µM)	Peqlab (Erlangen)
Quarzküvetten für Absorption, CD und Fluoreszenz	Hellma (Müllheim)
SDS-Elektrophoresesystem <i>Mighty Small II</i>	Pharmacia Biotech (Freiburg)
<i>ZipTip</i> <sub>C4</sub> , <i>ZipTip</i> <sub>C18</sub>	Millipore (Billerica, USA)

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Agarosegele:	0.8-2 % (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer
TAE-Puffer (50 x):	2 M Tris/HCl; 1 M Eisessig; 100 mM EDTA; pH 8.5
DNA-Probenpuffer (6 x):	50 % (w/v) Sucrose; 10 mM Tris/HCl; 5 mM EDTA; 5 % (v/v) Glycerin; 0.25 % (w/v) Bromphenolblau

Die Ladung von Nukleinsäuren ermöglicht eine elektrophoretische Trennung. Die horizontale Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Trennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe genutzt. Sie wurde sowohl für analytische als auch für präparative Zwecke eingesetzt. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden Agarosegele von 0.8 oder 2%igem Gehalt verwendet. Die DNA-Proben wurden mit 20 % (v/v) DNA-Probenpuffer (6 x) versetzt, auf das Gel aufgetragen und in 1 x TAE-Puffer für 45 min bei 80 V elektrophoretisch getrennt. Anschließend folgte eine Färbung in Ethidiumbromid (1 µg/ml) und eine Visualisierung der Banden unter UV-Licht.

### 2.2.2 Plasmid-Präparationen

Alle Plasmidpräparationen wurden mit dem E.Z.N.A. *Plasmid Miniprep Kit I* oder *II* der Firma Peqlab durchgeführt.

### 2.2.3 PCR

Der Einsatz von thermostabilen DNA-Polymerasen und die Verwendung von einzelsträngigen flankierenden DNA-Fragmenten (Primern) ermöglicht die Vervielfältigung linearer DNA-Fragmente in einem bestimmten Temperaturzyklus. Solche PCRs (Polymerasekettenreaktionen) wurden zur Amplifizierung der kodierenden Sequenzen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und von CspB genutzt. Außerdem konnten beide DNA-Fragmente durch die Einführung überlappender Bereiche mittels PCR und nach Präparation (siehe 2.2.4) in einer zweiten PCR miteinander fusioniert werden (siehe auch Abbildung 2.1). Alle verwendeten Primer sind in Tabelle 2.1 aufgelistet. Als Matrizes fungierten Plasmide oder präparierte lineare DNA-Fragmente. Für alle Reaktionen wurde das *Expand High Fidelity PCR System* der Firma Roche genutzt. Vor Beginn der Reaktion erfolgte eine 5-minütige Denaturierung des Matrizen-DNA

und der zugegebenen Primer (Mix 1) bei 95 °C. Die Temperaturzyklen der Reaktionen sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

**Tabelle 2.2** Temperaturzyklen der verschiedenen PCRs

Reaktion	Wiederholung des Zyklus	Denaturierung	Anlagerung	Elongation
Amplifikation der Sequenz von N-PABPN1	2	95 °C; 45 s	60 °C; 50 s	72 °C; 40 s
	38	95 °C; 45 s	63 °C; 50 s	72 °C; 40 s
Amplifikation der Sequenz von CspB	2	95 °C; 45 s	56 °C; 50 s	72 °C; 40 s
	38	95 °C; 45 s	60 °C; 50 s	72 °C; 40 s
Fusionsreaktion	2	95 °C; 45 s	58 °C; 50 s	72 °C; 60 s
	38	95 °C; 45 s	60 °C; 50 s	72 °C; 60 s

## 2.2.4 Präparation der PCR-Produkte

Um PCR-Produkte für Klonierungen oder neue PCRs nutzen zu können, mussten sie von Primern, Nukleotiden und Enzym gereinigt werden. Dafür wurde im ersten Schritt eine Chloroform/Phenol-Extraktion mit anschließender DNA-Fällung und im zweiten Schritt eine Gelextraktion durchgeführt. Für die Chloroform/Phenol-Extraktion wurde der Reaktionsansatz mit einem Volumen Chloroform/Phenol/Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) versehen, gut vermischt und für 3 min bei 13 000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen, mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat und 3 Volumen reinem, gekühltem Ethanol versehen und für 2 h bei -80 °C gefällt. Anschließend wurde der Ansatz bei 4 °C für 30 min bei 13 000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach einer erneuten 15-minütigen Zentrifugation bei 4 °C und 13 000 rpm wurde das Pellet getrocknet. Anschließend wurde es in einem geringen Volumen sterilem, deionisiertem Wasser gelöst und auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe 2.2.1). Die Gelextraktion erfolgte mit dem *Qiaquick Gelextraction Kit* der Firma Qiagen.

## 2.2.5 Klonierung der Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB

Ein Restriktionsverdau der fusionierten Fragmente der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB mit zwei verschiedenen Endonukleasen sollte eine gerichtete Klonierung in den Expressionsvektor pET15b ermöglichen. Dafür wurden sowohl die gereinigten Fusionsfragmente

(siehe 2.2.4) als auch der Vektor mit *NdeI* und *BamHI* geschnitten. Der Restriktionsansatz hatte ein Volumen von 200  $\mu\text{l}$  und enthielt von jedem Restriktionsenzym je 5  $\mu\text{l}$  und außerdem 40  $\mu\text{l}$  präpariertes PCR-Produkt (siehe 2.2.4), 20  $\mu\text{l}$  Puffer *BamHI* (New England Biolabs) und 130  $\mu\text{l}$  steriles, deionisiertes Wasser. Die Restriktion erfolgte bei 37 °C über Nacht. Anschließend wurde der Restriktionsansatz wie unter 2.2.4 beschrieben gereinigt. Um in der folgenden Ligierungsreaktion eine Religierung des geschnittenen Vektors mit sich selbst zu unterdrücken, wurde der Vektor anschließend dephosphoryliert. Dafür wurde er 3 h bei 37 °C unter Zugabe von 1 % (v/v) alkalischer Phosphatase im Puffer 3 (New England Biolabs) inkubiert. Der verdaute, dephosphorylierte Vektor wurde mit dem *Qiaquick*<sup>®</sup> *PCR Purification Kit* der Firma Qiagen gereinigt. Für die Abschätzung der Nukleinsäurekonzentrationen wurden alle DNA-Fragmente auf ein Agarosegel (siehe 2.2.1) aufgetragen. Für die Ligierung wurde ein molares Verhältnis von ungefähr 1:10 zwischen Vektor und *Insert* gewählt. Die Ligierung erfolgte in einem Volumen von 25  $\mu\text{l}$  nach Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  Enzym und 2.5  $\mu\text{l}$  T4-DNA-Ligase-Puffer der Firma MBI Fermentas. Sie wurde bei 22 °C für 3 h durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung der Ligase für 5 min bei 65 °C. Um Salze aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, erfolgte eine 30-minütige Mikrodialyse gegen 10 % (v/v) Glycerin. Der gesamte Reaktionsansatz wurde bei 2.5 kV in elektrokompente *E. coli* BL21 (DE3) Gold-Zellen transformiert und auf LB-Platten mit zugegebenem Ampicillin ausplattiert. Es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C über Nacht. Aus den erhaltenen Klonen wurden die Plasmide präpariert (siehe 2.2.2). Es erfolgte eine analytische Restriktion der Plasmide mit *NdeI* und *BamHI* mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.1). Plasmide, die ein Insertionsfragment einer Größe von ca. 600 bp enthielten, wurden anschließend sequenziert.

## 2.2.6 Klonierung der Fusionen von Poly-Alaninen und CspB

Neben den Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB, wurden auch Fusionen aus Poly-Alaninen und CspB analysiert (siehe Abbildung 2.2).



**Abbildung 2.2 Vereinfachte Darstellung der Fusionen aus Poly-Alaninen und CspB (10-, 17Ala-CspB).** Das Poly-Alanin-Segment trägt 10 bzw. 17 aufeinander folgende Alanine und die Aminosäuresequenz GAA. CspB befindet sich C-terminal der Poly-Alanin-Sequenz.

Die Klonierung der beiden Fusionen aus Poly-Alaninen und CspB (10Ala- und 17Ala-CspB) in den Vektor pET15b wurde in der Diplomarbeit von S. von Einem unter meiner Anleitung durchgeführt (von Einem, 2006). Ausgangsprodukt waren die kodierenden Sequenzen der Fusi-

onen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB im Vektor pET15b. Durch die Verwendung des *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit* der Firma Stratagene (Heidelberg) konnten die cDNAs der N-terminalen Domänen von PABPN1 zwischen den für die Poly-Alanine und CspB kodierenden Sequenzen deletiert werden. Zur Vereinfachung werden die Fusionen aus Poly-Alaninen und CspB im Folgenden auch als „direkte Fusionen“ bezeichnet.

## 2.2.7 DNA-Sequenzierungen

Polyacrylamidgel: 30 ml Sequagel XR Acrylamidlösung; 7.5 ml Sequagel XR Komplettpuffer; 400 µl DMSO; 300 µl APS (10 % (w/v))  
 TBE-Puffer: 90 mM Tris/HCl; 90 mM Borsäure; 2 mM EDTA; pH 8

Durch DNA-Sequenzierungen wurde die Korrektheit der DNA-Sequenzen der Klonierungsprodukte überprüft. Grundlage der Sequenzierungen war die Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Bei dieser Methode werden pro Sequenzierung vier Reaktionsansätze präpariert. Alle Ansätze enthalten neben dem zu sequenzierenden DNA-Fragment eine thermostabile DNA-Polymerase, einen Primer, einen dNTP-Mix und je ein Didesoxynukleotid (ddNTP). Zur Synthese der DNA-Einzelstränge wird, wie in einer PCR, ein bestimmter Temperaturzyklus durchlaufen. Die Zugabe der ddNTPs kann statistisch einen Kettenabbruch der Polymerisation nach jedem Einbau des entsprechenden Nukleotides erzeugen. Die Auftrennung der unterschiedlich langen DNA-Einzelstränge aller vier Reaktionsansätze mittels einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese gibt Aufschluss über die DNA-Sequenz. Alle Sequenzierungsreaktionen wurden mit dem *CycleReader™ Auto DNA Sequencing Kit* der Firma MBI Fermentas präpariert. Die fluoreszenzmarkierten Primer sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Der Temperaturzyklus ist in Tabelle 2.3 gezeigt. Alle zu sequenzierenden Fragmente wurden in 5'- und 3'-Richtung sequenziert. Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese und die Detektion der Banden erfolgte am LiCor 4000 *DNA-Sequencer* der Firma MWG Biotech. Die Auswertung wurde mit der Software *Image Analysis 4200*, ebenfalls von der Firma MWG Biotech, durchgeführt. Sequenzvergleiche erfolgten mit den Softwareprogrammen *MACAW™* und *GeneRunner™*.

**Tabelle 2.3** Temperaturzyklus für Sequenzierungsreaktionen

Wiederholung des Zyklus	Denaturierung	Anlagerung	Elongation
1	94 °C; 5 min	-	-
30	94 °C; 30 s	55 °C; 30 s	72 °C; 1 min
1	70 °C; 3 min	-	-

## 2.3 Genexpression und Proteinreinigung

Sowohl die Fusionsproteine bestehend aus den N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB als auch die direkten Fusionen der Alanine mit CspB (10Ala-, 17Ala-CspB) wurden nach identischen Protokollen rekombinant hergestellt und gereinigt.

### 2.3.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-Trenngel (14 %):	7 ml Acrylamidstammlösung; 4 ml deionisiertes Wasser; 4 ml Trenngelpuffer; 50 µl TEMED; 100 µl APS (10 % (w/v))
SDS-Sammelgel (6 %):	1.2 ml Acrylamidstammlösung; 3.3 ml deionisiertes Wasser; 1.5 ml Sammelgelpuffer; 30 µl TEMED; 60 µl APS (10 % (w/v))
SDS-Trenngelpuffer (4 x):	3 M Tris/HCl; 0.4 % (w/v) SDS; pH 8.85
SDS-Sammelgelpuffer (4 x):	100 mM Tris/HCl; 0.4 % (w/v) SDS; pH 6.8
SDS-Laufpuffer (10 x):	250 mM Tris/HCl; 1 % (w/v) SDS; 1.87 M Glycin; pH 8.3
SDS-Probenpuffer (5 x):	100 mM Tris/HCl; 4.8 % (w/v) SDS; 16 % (v/v) Glycerin; 0.1 % (w/v) Bromphenolblau; 2 % (v/v) 2-Mercaptoethanol; pH 8
SDS-Gel-Färbelösung:	40 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 1 g/l Coomassie brillant blau
SDS-Gel-Entfärbelösung:	40 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Essigsäure

Um die Reinheit von Proteinlösungen zu analysieren, wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewandt. SDS ist ein anionisches Detergenz, das Proteine denaturiert und sich gleichmäßig an deren Oberfläche anlagert. Aufgrund dieser Eigenschaften sind bei SDS-Protein-Komplexen die Eigenladung und die ursprüngliche Struktur der Proteine weitgehend vernachlässigbar. Die mit SDS behandelten Proteine können entsprechend ihrer molekularen Masse im Trenngel der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt werden. Im Sammelgel werden, aufgrund des vom Trenngel verschiedenen pH-Wertes und der größeren Poren, die Proben in einem schmalen Bereich konzentriert.

Die oben angegebenen Volumina der Komponenten für Sammel- und Trenngel waren ausreichend für vier Gele. Nach dem Gießen des Sammelgels wurde dieses mit Ethanol überschichtet und mindestens 30 min polymerisiert. Anschließend wurde das Trenngel gegossen. Die zu analysierenden Proben wurden mit 20 % (v/v) des Probenpuffers (5 x) gemischt und für 2 min auf 90 °C erhitzt. Nachdem die Proben aufgetragen worden waren, erfolgte die elektrophoretische

Trennung bei 175 V für ca. 1 h. Die Gele wurden nach kurzzeitigem Erhitzen in der Färbelösung mindestens 2 h gefärbt und anschließend entfärbt.

### 2.3.2 Westernblot und Immundetektion

PBS-Tween:	8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 140 mM NaCl; pH 7.6; 0.1 % Tween 20 (v/v)
Westernblot-Puffer:	20 mM Tris/HCl; 150 mM Glycin; 0.05 % SDS (w/v); 20 % MeOH (v/v)

Mit Hilfe von Antikörpern können Proteine spezifisch detektiert werden. Dieses Prinzip der Immundetektion wird häufig mit einem Westernblot kombiniert. Die durch eine SDS-PAGE getrennten Proteine werden durch das Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Membran transferiert (*Blot*) und anschließend mittels spezifischer Antikörper detektiert. Die Verwendung eines markierten oder eines mit einem Enzym gekoppelten (Sekundär-) Antikörpers ermöglicht in der Folge die Visualisierung des Zielproteins bzw. des Antikörper-Protein-Komplexes. Ein enzymgekoppelter Antikörper kann durch die Umsetzung eines entsprechenden Substrates eine Chemilumineszenzreaktion hervorrufen. Der Westernblot wurde genutzt, um die rekombinante Expression der Fusionsproteine der N-terminalen Domänen und CspB nachzuweisen. Es wurde ein mit einer Peroxidase gekoppelter Anti-His<sub>6</sub>-Antikörper verwendet. Die Detektion des Antikörpers erfolgte durch die peroxidase-katalysierte Oxidationsreaktion eines auf Luminol basierenden Substrates mit Wasserstoffperoxid.

Die Proben von Zellen vor und nach der Induktion wurden zunächst mittels SDS-PAGE getrennt (siehe 2.3.1). Der *Blot* erfolgte bei 60 mA für 1 h. Die Membran wurde mit 2 % Ponceau-Rot (w/v); 3 % TCA (w/v) gefärbt und anschließend in 5 % Milchpulver (w/v); PBS-Tween über Nacht bei 4 °C geblockt. Es folgte eine Inkubation mit dem Antikörper (1 : 500) in 2.5 % Milchpulver (w/v); PBS-Tween für 2 h bei Raumtemperatur. Nach viermaligem Waschen der Membran in PBS-Tween erfolgte die Visualisierung der Immunkomplexe auf einem Röntgenfilm.

### 2.3.3 Genexpression

Alle Fusionsproteine wurden rekombinant in *E. coli* BL21 (DE3) Gold hergestellt. Da die für die N-terminalen Domänen von PABPN1 kodierenden Sequenzen Argininkodons enthalten, die in *E. coli* selten vorkommen, wurde zusätzlich das Plasmid pUBS 520 verwendet. Das Plasmid kodiert für die tRNAs dieser in *E. coli* seltenen Argininkodons und ermöglicht durch die zusätzlichen Kopien der tRNAs eine verbesserte rekombinante Expression eukaryotischer Gene in

*E. coli* (Brinkmann *et al.*, 1989). Die Überexpression der Proteine erfolgte in 5 l großen Schüttelkolben in je 1.5 l LB-Medium (modifiziert) nach Zugabe von 0.15 mg/ml Ampicillin und 0.05 mg/ml Kanamycin. Das Animpfen erfolgte aus einer Vorkultur, welche wiederum mit einem Klon einer frisch transformierten Kultur angeimpft worden war. Das Inokulum hatte ein Volumen von 10-15 ml. Die Vorkultur enthielt außer den Antibiotika zusätzlich 1 % Glucose. Sie wurde über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Kultur wurde bei 100 rpm und 37°C inkubiert und bei einer OD<sub>600</sub> von 0.5-0.8 mit 1 mM IPTG induziert. Danach wurden die Zellen unter den gleichen Bedingungen für weitere 4 h inkubiert und anschließend durch eine Zentrifugation bei 5 000 rpm für 15 min geerntet. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80 °C.

### 2.3.4 Zellaufschluss

Aufschlusspuffer: 50 mM Tris/HCl; pH 8; Proteaseinhibitormix (*complete, EDTA free*) (1 Tablette/50 ml)

Die eingefrorenen Zellen wurden in einem Verhältnis von 0.25 g pro Milliliter Aufschlusspuffer resuspendiert, mit Lysozym in einer Endkonzentration von 0.1 mg/ml versetzt und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen im Hochdruckhomogenisator aufgeschlossen. Der Zellaufschluss wurde bei einem Druck von 800-1200 bar in 2-3 Durchläufen durchgeführt. Die Zellsuspension wurde danach mit Benzonase in einer Endkonzentration von 0.4 µl/ml und MgCl<sub>2</sub> von 3 mM versehen und 45 min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 20 000 rpm für 30 min wurde der Überstand, welcher das lösliche Fusionsprotein enthielt, weiterverarbeitet.

### 2.3.5 Hitzefällung

Da sowohl das Protokoll der Reinigung der N-terminalen Domänen von PABPN1 (Scheuermann *et al.*, 2003) als auch das der Reinigung von CspB (Wunderlich *et al.*, 2005) als ersten Schritt eine Hitzefällung enthält, wurde der Überstand des Zellaufschlusses (siehe 2.3.4) einer Hitzefällung unterzogen. Dafür wurden die Fusionen der N-terminalen Domänen und CspB 30 min bei 55-60 °C und die Fusionen aus Poly-Alaninen und CspB („direkte Fusionen“) 30 min bei 45 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 20 000 rpm. Es wurde mit dem Überstand weitergearbeitet.

### 2.3.6 Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Denaturierungspuffer:	50 mM Tris/HCl; 6 M GdmCl; pH 8
Waschpuffer:	50 mM Tris/HCl; 20 mM Imidazol; pH 8
Elutionspuffer:	50 mM Tris/HCl; 250 mM Imidazol; pH 8

Durch die Genexpression mit dem Expressionsvektor pET15b enthielten die rekombinant hergestellten Fusionsproteine einen N-terminalen His-tag. Dies erlaubte eine Reinigung der Proteine mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Um eine bessere Bindung der Proteine an das Säulenmaterial zu ermöglichen und mögliche an CspB gebundene Nukleinsäuren zu entfernen, wurde das Protein vor der Chromatographie denaturiert und anschließend unter denaturierenden Bedingungen aufgetragen. Dafür erfolgte zuerst eine vierstufige Dialyse der Proteinlösung (80-120 ml) gegen insgesamt 6 l des Denaturierungspuffers. Dies geschah in einer Zeitspanne von mindestens 40 h. Anschließend wurde die Proteinlösung 30 min bei 25 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf die mit Denaturierungspuffer äquilibrierte Säule aufgetragen. Nach dem Erreichen eines stabilen UV-Absorptionssignals bei einer Wellenlänge von 280 nm (ca. 2 Säulenvolumen) wurde die Säule mit Waschpuffer gewaschen. Die Verwendung geringer Konzentrationen Imidazol sollte unerwünschte, gebundene Proteine entfernen. Außerdem wurde CspB durch den Wechsel auf einen Puffer ohne Denaturierungsmittel an der Säule zurückgefaltet. Die Säule wurde wiederum bis zum Erreichen eines stabilen Absorptionssignals bei einer Wellenlänge von 280 nm gewaschen (2-3 Säulenvolumen). Die Fusionsproteine wurden mit einem kontinuierlichen Gradienten von 20-250 mM Imidazol innerhalb zweier Säulenvolumen eluiert. Um die Proteine vor proteolytischem Verdau zu schützen, wurde den Elutionsfraktionen EDTA in einer Endkonzentration von 5 mM zugesetzt. Alle Chromatographieschritte erfolgten, abhängig vom Druck, bei einer Flussrate von ca. 1 ml/min.

### 2.3.7 Gelfiltration

Laufpuffer:	50 mM Tris/HCl; 5 mM EDTA; pH 8
Dialysepuffer:	5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 100 mM NaCl; pH 7.5

Im letzten Reinigungsschritt wurden die Fusionsproteine einer Gelfiltration, oder Größenausschluss-Chromatographie, unterzogen. Da die Elutionsfraktionen der Ni-NTA-Chromatographie mit rekombinantem Protein ein Gesamtvolumen von 40-70 ml umfassten und durch die Gelfiltration eine weitere Verdünnung der Proteinlösung zu erwarten war, erfolgte vor der Gelfiltration eine Konzentrierung der Proteinlösungen. Dafür wurden die entsprechenden Elutionsfraktionen aus 2.3.6 vereinigt und im Dialyseschlauch in PEG 35 000 gelegt. Das Endvolumen der

Konzentrierung betrug 10-20 ml. Die so aufkonzentrierte Proteinlösung wurde anschließend in maximal 6 ml großen Fraktionen auf einer Superdex™ 75 (Amersham Biosciences) chromatographisch getrennt. Es wurden Fraktionen mit einem Volumen von 5 ml gesammelt. Die Trennung erfolgte bei einem Fluss von 1 ml/min. Die Elutionsfraktionen mit rekombinantem Protein wurden vereinigt, gegen Dialysepuffer dialysiert und bei -80°C gelagert.

## 2.4 Spektroskopische Methoden

### 2.4.1 Konzentrationsbestimmung von Protein- und Nukleinsäurelösungen mittels UV-Absorption

Aufgrund der Absorptionsmaxima der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan besitzen Proteine die Fähigkeit, Licht in einem Wellenlängenbereich von 250-290 nm zu absorbieren. Diese Eigenschaft macht eine Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen mittels Lichtabsorption möglich. Die Extinktion kann mit dem Lambert-Beerschen Gesetz (2.1) beschrieben werden.

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (2.1)$$

$A$	Absorption bei einer definierten Wellenlänge
$\varepsilon$	molarer Extinktionskoeffizient [ $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ]
$c$	Konzentration [M]
$d$	Schichtdicke [cm]

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurden Absorptionsspektren unter denaturierenden Bedingungen in einem Wellenlängenbereich von 240-500 nm aufgezeichnet und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm untersucht. Die Extinktion oberhalb von 320 nm diente der Analyse der Lichtstreuung. Die Lichtstreuung gibt Hinweise auf mögliche höhermolekulare Spezies oder Aggregate. Bei einer Extinktion in diesem Wellenlängenbereich wurde das Signal doppelt-logarithmisch aufgetragen und die Lichtstreuung bei 280 nm über Extrapolation bestimmt. Die Extinktion bei 280 nm wurde dann um den Wert der Lichtstreuung korrigiert. Die molaren Extinktionskoeffizienten wurden nach Gill (Gill & von Hippel, 1989) mit Hilfe des *Tools* Protparam (<http://expasy.ch/tools/protparam.html>) bestimmt. Sie betragen  $6\,990 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  für die Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB und  $5\,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  für die Fusionen der Alanine und CspB.

Die Konzentrationen des Oligonukleotids dT7 wurden über die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Der molare Extinktionskoeffizient betrug für dT7  $58\,800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Wallace & Miyada, 1987).

### 2.4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen mittels Tryptophanfluoreszenz

Die delokalisierten  $\pi$ -Elektronensysteme der aromatischen Aminosäuren führen nicht nur zur Lichtabsorption von Proteinen im UV-Bereich, sondern auch zur Eigenfluoreszenz von Proteinen. Diese intrinsische Fluoreszenz kann ebenfalls zur Konzentrationsbestimmung genutzt werden. Da die Quantenausbeute und das Emissionsmaximum jedoch stark von der Umgebung der aromatischen Aminosäuren und damit von der Faltung des Proteins abhängig sind, ist eine allgemeine Konzentrationsbestimmung nur im denaturierten Zustand möglich. Die hier angewandte Methode basierte auf der von Pajot (Pajot, 1976). Die Proteine wurden in 2 ml 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 6 M GdmCl; 100 mM NaCl; pH 7.5 verdünnt und die Fluoreszenz bestimmt. Anschließend wurde eine konzentrierte Tryptophanlösung (0.9-1 mM) bekannter Konzentration in acht Schritten von je 1  $\mu\text{l}$  zugegeben. Nach jeder Zugabe wurde die Lösung 1 min in der Küvette gerührt und wiederum die Fluoreszenz bestimmt. Die Werte wurden pufferkorrigiert und gegen die Tryptophankonzentration aufgetragen. Die Auftragung ergab eine Gerade. Aus dem Anstieg der Geraden und des Ausgangswertes der Fluoreszenz konnte die ursprüngliche Konzentration an Tryptophan in der Lösung bestimmt werden. Da die analysierten Proteine nur einen einzigen Tryptophanrest enthielten, entsprach die anfängliche Tryptophankonzentration auch der ursprünglichen Proteinkonzentration. Alle Messungen wurden bei 20 °C durchgeführt. Die Anregungswellenlänge betrug 295 nm und die Spaltbreite 5 nm. Die Auswertung erfolgte am Emissionsmaximum von 361 nm. Die Spektren wurden dreifach akkumuliert.

Da zwischen der Konzentrationsbestimmung mittels UV-Absorption und Tryptophanfluoreszenz eine Diskrepanz bestand, die Ergebnisse der UV-Absorption jedoch durch Aminosäureanalytik (siehe 2.7) bestätigt werden konnten, mussten die hier bestimmten Konzentrationen noch mit einem Korrekturfaktor multipliziert werden. Dieser hatte einen Wert von 0.64 für die Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB und von 0.77 für die Fusionen aus Poly-Alaninen und CspB.

### 2.4.3 Fluoreszenzspektroskopie

Wie unter 2.4.2 bereits erwähnt, besitzen Proteine eine intrinsische Fluoreszenz, die vom Faltungszustand des Proteins abhängig ist. Dabei ist sowohl die Quantenausbeute als auch das Emissionsmaximum des nativen und denaturierten Zustands ein charakteristisches Merkmal jedes individuellen Proteins.

Fluoreszenzspektren wurden bei einer Proteinkonzentration von 3  $\mu\text{M}$  und einer Temperatur von 20 °C gemessen. Es wurden Spektren unter nativen Bedingungen (5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ;

100 mM NaCl; pH 7.5) und unter denaturierenden Bedingungen (5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 6 M GdmCl; 100 mM NaCl; pH 7.5) aufgenommen. Die Anregung erfolgte bei 280 und 295 nm. Die Spaltbreite betrug 5 nm. Die Spektren wurden dreifach akkumuliert und pufferkorrigiert.

#### 2.4.4 Analyse der nativen Faltung von CspB durch Fluoreszenztitration

CspB hat die Eigenschaft einzelsträngige DNA und RNA zu binden (Graumann & Marahiel, 1994). Dabei besitzt es eine Präferenz für die Bindung von Oligonukleotiden mit Pyrimidinbasen und bindet bevorzugt Polythymidin-Oligonukleotide (Lopez *et al.*, 1999, 2001). Die Wechselwirkung umfasst vermutlich sieben Nukleotide und hat zur Folge, dass das Oligonukleotid dT7 mit besonders hoher Affinität gebunden wird (Zeeb *et al.*, 2006). Da der einzige Tryptophan-Rest des Proteins (Trp 8) an der Bindung des Oligonukleotids beteiligt ist, wird die intrinsische Tryptophanfluoreszenz von CspB durch die Oligonukleotidbindung verringert (Lopez *et al.*, 1999, 2001; Zeeb *et al.*, 2006). Aus diesem Grund bietet sich eine Fluoreszenztitration mit dT7 zur Überprüfung der nativen Faltung von CspB an.

$$Q = Q_{\max} \frac{A - \sqrt{A^2 - 4 \cdot n \cdot [P]_0 \cdot [Y]_0}}{2 \cdot [P]_0} \quad (2.2)$$

$$A = K_D + [P]_0 + n \cdot [Y]_0$$

$Q$  Quenching

$Q_{\max}$  maximales Quenching bei einer Sättigung mit dT7

$n$  Bindungsstöchiometrie Protein/dT7

$[P]_0$  Proteinkonzentration [ $\mu$ M]

$[Y]_0$  dT7-Konzentration [ $\mu$ M]

$K_D$  Gleichgewichtsdissoziationskonstante [ $\mu$ M]

Alle Messungen wurden in einem Ausgangsvolumen von 2 ml in 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 100 mM NaCl; pH 7.5 bei einer Temperatur von 20 °C durchgeführt. Die zu analysierenden Proteine wurden in einer Konzentration von 1-3  $\mu$ M vorgelegt und dT7 aus einer konzentrierten Stammlösung (400  $\mu$ M) in 1  $\mu$ l-Schritten bis zu einer Endkonzentration von 7-8  $\mu$ M zugegeben. Nach jedem Schritt wurde die Lösung 1 min in der Küvette gerührt und anschließend die Fluoreszenz bestimmt. Die Anregungswellenlänge betrug 295 nm und die Spaltbreite 5 nm. Alle Spektren wurden dreifach akkumuliert und pufferkorrigiert. Die Spektren wurden bei einer Wellenlänge von 352 nm analysiert. Die sich ergebenden hyperbolen Bindungsisothermen wurden nach Gleichung (2.2) (Lohman & Bujalowski, 1991) ausgewertet.

### 2.4.5 ANS-Fluoreszenz-Messungen

ANS (1-Anilino-8-naphthalensulfonsäure) ist ein fluoreszierender Farbstoff der an hydrophobe Oberflächen von Proteinen bindet (Semisotnov *et al.*, 1991). Durch diese Wechselwirkung werden die spektroskopischen Eigenschaften von ANS verändert. Das Emissionsmaximum verschiebt sich zu niedrigeren Wellenlängen und die Fluoreszenzintensität wird erhöht. Da in gefalteten Proteinen hydrophobe Reste jedoch nur selten oberflächenexponiert sind, wird ANS meist zur Detektion von Proteinstrukturen mit exponierten hydrophoben Bereichen genutzt (Semisotnov *et al.*, 1991). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass ANS zur Detektion fibrillärer Strukturen (Kayed *et al.*, 1999; Baskakov *et al.*, 2002) und speziell zur Detektion polyalanin-induzierter amyloider Strukturen eingesetzt werden kann (Scheuermann *et al.*, 2003; Shinchuk *et al.*, 2005).

ANS-Fluoreszenzspektren wurden bei einer ANS-Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  in 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 100 mM NaCl; pH 7.5 und einer Temperatur von 20 °C aufgenommen. Es wurde zuerst das Spektrum ohne Protein und anschließend nach Zugabe von Protein mit einer Endkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  aufgezeichnet. Die Spektren wurden subtrahiert und die Fluoreszenz bei 480 nm analysiert. Die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 370 nm. Die Spaltbreite betrug 5 nm. Alle Spektren wurden dreifach akkumuliert.

### 2.4.6 Circular dichroismus

Da Proteine chirale Moleküle sind, können sie mittels Circular dichroismus (CD) analysiert werden. Dabei absorbieren sie links- und rechts-zirkulär polarisiertes Licht von linear polarisiertem Licht unterschiedlich stark. Die resultierenden Absorptionsspektren geben Auskunft über strukturelle Eigenschaften des Proteins. Während im Fern-UV-Bereich (190-250 nm) das Peptidrückgrat für die Absorption verantwortlich ist, dominieren im Nah-UV-Bereich (250-300 nm) die aromatischen Aminosäuren das Spektrum. CD-Spektren des Fern-UV-Bereiches geben daher Einblicke in die Sekundärstruktur, während Spektren des Nah-UV-Bereiches tertiäre Kontakte widerspiegeln.

Fern-UV-CD-Spektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 195-250 nm bei einer Schichtdicke von 0.01 cm und Nah-UV-CD-Spektren in einem Wellenlängenbereich von 250-300 nm bei einer Schichtdicke von 1 cm aufgenommen. Die Proteinkonzentrationen betragen 0.9-1.3 mg/ml. Die Spektren wurden bei einer Geschwindigkeit von 10 nm/min, einer Spaltbreite von 1 nm und einer Glättung von 1 s gemessen. Alle Spektren wurden zehnfach akkumuliert und pufferkorrigiert. Die gemessene Elliptizität wurde nach Gleichung (2.3) und (2.4) in die

molare oder mittlere residuelle Elliptizität umgerechnet. Additions- oder Differenzspektren wurden nach Gleichung (2.5) berechnet.

$$[\Theta] = \frac{\Theta \cdot 100 \cdot MW}{c \cdot d} \quad (2.3)$$

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{[\Theta]}{N} \quad (2.4)$$

$$[\Theta]_{MRW-Diff} = \frac{[\Theta]_1 - [\Theta]_2}{\Delta N} \quad (2.5)$$

$\Theta$	gemessene Elliptizität [deg]
$[\Theta]$	molare Elliptizität [deg cm <sup>2</sup> dmol <sup>-1</sup> ]
$[\Theta]_{MRW}$	mittlere residuelle Elliptizität [deg cm <sup>2</sup> dmol <sup>-1</sup> ]
$[\Theta]_{MRW-Diff}$	mittlere residuelle Elliptizität des Differenzspektrums [deg cm <sup>2</sup> dmol <sup>-1</sup> ]
$MW$	molekulare Masse [Da]
$c$	Proteinkonzentration [mg ml <sup>-1</sup> ]
$d$	Schichtdicke [cm]
$N$	Aminosäureanzahl des Proteins

## 2.4.7 Massenspektrometrie

Die Bestimmung der Massen der Fusionsproteine und Peptide wurde von Frau Dr. A. Schierhorn (Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“, Max-Planck-Gesellschaft, Halle) oder Herrn Dr. C. Ihling (Prof. A. Sinz, Fachbereich Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) durchgeführt. Die durch RP-HPLC oder *Zip-Tips* entsalzten Proben wurden durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie an einem REFLEX- oder Ultraflex 3-Spektrometer (Bruker-Franzen-Analytik, Bremen) analysiert. Für die Kokristallisation fungierten DHB, HCCA oder Sinapinsäure als Matrizes. Die Zuordnung der Peptidfragmente zu den ermittelten Massen erfolgte mit dem Programm FindPept (<http://expasy.ch/tools/protparam.html>). Es wurde eine Toleranz von 0.5 Da gewählt. Die so ermittelten Peptidfragmente wurden anschließend über eine MS/MS-Analyse (Tandem-Massenspektrometrie) bestätigt.

## 2.5 Analyse amyloider Strukturen und deren Bildung

### 2.5.1 Fibrillenbildung

Für die Verfolgung der Fibrillenbildung der verschiedenen Fusionen wurden die Proteine in 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 100 (250) mM NaCl; 0.1 % Na-Azid; pH 7.5 in Konzentrationen von 0.2-1 mM bei unterschiedlichen Temperaturen von 15-37 °C inkubiert. Die Bildung der Fibrillen wurde mittels ANS-Fluoreszenz (siehe 2.4.5) verfolgt und durch elektronenmikroskopische Messungen (siehe 2.5.3) bestätigt. Die Fibrillenbildung in Anwesenheit von dT7 wurde auf gleiche Art und Weise analysiert.

### 2.5.2 Fibrillenbildung mit *Seed*-Zugabe

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Bildung amyloider Strukturen ist die Bildung eines Nukleationskeims. Dies schlägt sich in der *Lag*-Phase einer Fibrillierungskinetik nieder. Durch die Zugabe fragmentierter Fibrillen, auch *Seeds* genannt, kann die *Lag*-Phase jedoch verkürzt oder sogar eliminiert werden. Die Nukleationskeimbildung wird auf diese Weise umgangen.

Für die Gewinnung von *Seeds* wurden die Fibrillen bei 50 000 rpm für 45-60 min zentrifugiert. Das Pellet der N-(+7)Ala-CspB-Ansätze wurde mit 6 M GdmCl und das der 10Ala-CspB-Ansätze mit 2 M GdmCl; 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 100 mM NaCl; pH 7.5 gewaschen. Der Überstand wurde für eine indirekte Konzentrationsbestimmung der *Seeds* zurückbehalten. Das gewaschene Pellet wurde wiederum zentrifugiert und in 600  $\mu\text{l}$  Puffer ohne GdmCl aufgenommen. Die Fragmentierung der Fibrillen erfolgte mittels Ultraschall bei einer Amplitude von 70 % und einem Intervall von 0.5 für 5 x (3 x 10 s). Anschließend wurden die präparierten *Seeds* bei 60 000 rpm 1 h zentrifugiert, in Puffer ohne GdmCl gewaschen, noch einmal zentrifugiert und letztlich in einem geringen Volumen (10-30  $\mu\text{l}$ ) Puffer ohne GdmCl aufgenommen. Die *Seed*-Konzentrationsbestimmung erfolgte indirekt durch die verbliebene Menge Protein im Überstand oder direkt über die *Seeds*. Den Fibrillierungsansätzen wurden *Seeds* in Konzentrationen von 0.05-0.1 % (w/v) zugesetzt. Die Fibrillenbildung erfolgte analog 2.5.1.

### 2.5.3 Elektronenmikroskopie

Das Vorhandensein amyloider Strukturen wurde mit Hilfe der Elektronenmikroskopie überprüft. Dafür wurde ein Aliquot des Fibrillierungsansatzes auf eine Proteinkonzentration von 2-3 mg/ml verdünnt und an einem kohlebeschichteten Kupfergrid für 3 min adsorbiert. Der Grid

war zuvor für 1 min mit Bacitracin (0.1 mg/ml) behandelt worden und wurde nach der Adsorption der Proteine mit Wasser gewaschen. Abschließend erfolgte eine Kontrastierung durch eine kurze Inkubation (15 s) in Uranylacetat (1 % (w/v)). Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurde der Grid getrocknet. Die Aufnahmen wurden an einem EM 600 (Zeiss, Jena) unter Hilfestellung von Herrn Dr. Gerd Hause (Biozentrum, Halle) angefertigt.

## 2.5.4 Proteolyse

In früheren Experimenten konnte gezeigt werden, dass Fibrillen bestehend aus den N-terminalen Domänen von PABPN1 eine hohe Resistenz gegenüber Proteasen und Denaturierungsmitteln besitzen (Scheuermann, 2003; Lodderstedt *et al.*, 2007). Diese Stabilität ist vermutlich in der  $\beta$ -Cross-Struktur der Fibrille begründet. Daher ist anzunehmen, dass bei einer Proteasebehandlung lediglich dieser strukturelle Teil proteolysegeschützt ist. Unter dieser Annahme sollte die Fibrille durch eine Proteasebehandlung mit unspezifisch schneidenden Proteasen auf ihre  $\beta$ -Cross-Struktur reduziert werden. Eine anschließende Auflösung der Reststruktur und die Analyse der Peptide sollte Aufschluss über die in der  $\beta$ -Cross-Struktur lokalisierte Aminosäuresequenz geben. Vergleichbare Analysen wurden in der Literatur bereits beschrieben (Bocharova *et al.*, 2005; Monti *et al.*, 2005; Frare *et al.*, 2006).

Die Proteolyse wurde mit Thermolysin und Proteinase K durchgeführt. Dazu wurden die Fibrillen wie für die Herstellung von *Seeds* präpariert (siehe 2.5.2). Anschließend wurden sie in 50 mM Tris/HCl; 100 mM NaCl; 2 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 8 in einer Endkonzentration von 1-5 mg/ml aufgenommen und mit der jeweiligen Protease in einem Massenkonzentrationsverhältnis von 1 : 50 versetzt. Die Proteolyse erfolgte für 2 h bei 37 °C. Die Reaktionen wurden mit PMSF (Proteinase K) und EDTA (Thermolysin) in einer Endkonzentration von 13 mM abgestoppt. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 70 000 rpm für 1 h. Das Pellet wurde einmal mit 6 M GdmCl (N-(+7)Ala-CspB) und 2 M GdmCl; 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 100 mM NaCl; pH 7.5 (10Ala-CspB) und zweimal mit Puffer ohne GdmCl gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 5 M GdmSCN; 0.1 % TFA aufgenommen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 70 000 rpm für 1 h. Der Überstand wurde mittels RP-HPLC (siehe 2.6) aufgetrennt und massenspektrometrisch (siehe 2.4.7) untersucht. Zur Kontrolle wurde monomeres Protein ebenfalls proteolytisch verdaut und analysiert.

## 2.5.5 Stabilitätsmessungen

Fibrillen der N-terminalen Domänen von PABPN1 können durch die Behandlung mit hohen Konzentrationen an GdmCl nicht aufgelöst werden. Erst die Verwendung hoher Konzentratio-

nen GdmSCN führt zur partiellen Auflösung der Fibrillen (Lodderstedt *et al.*, 2007). Um die Stabilität der aus N-(+7)Ala-CspB und 10Ala-CspB gebildeten Fibrillen zu testen, wurden diese einer Behandlung mit GdmCl unterzogen.

Es wurden Fibrillierungsansätze mit einer Ausgangsproteinkonzentration von 0.3 mM für N-(+7)Ala-CspB und 0.6 mM für 10Ala-CspB verwendet. Der Fibrillierungsansatz wurde in 40  $\mu$ l große Ansätze aliquotiert und die Fibrillen 1 h bei 50 000 rpm pelletiert. Die Überstände wurden vereinigt und aufbewahrt. Anschließend wurden die Pellets mit 40  $\mu$ l 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 100 mM NaCl; pH 7.5 und variierenden Mengen an GdmCl (0-6 M), in 1.5 M-Schritten für N-(+7)Ala-CspB und 1 M-Schritten für 10Ala-CspB, gewaschen und 1 h bei 25 °C inkubiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation. Die Überstände wurden zurückbehalten und die verbliebenen Pellets in 25  $\mu$ l 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 100 mM NaCl, pH 7.5 aufgenommen. Die Proteinkonzentration aller Überstände und Pellets wurde mittels Tryptophanfluoreszenz (siehe 2.4.2) bestimmt. Außerdem erfolgte eine elektronenmikroskopische Analyse (siehe 2.5.3).

### 2.5.6 Analyse der Faltung von CspB durch Ultrazentrifugation

Da Fluoreszenzmessungen höhermolekularer Strukturen, wie Fibrillen, durch Lichtstreuungseffekte beeinflusst werden können und der quantitative Anteil dieser Effekte nicht zu ermitteln ist, wurde ein zu 2.4.4 ergänzender dT7-Bindungstest genutzt, um die Faltung von CspB in den Fibrillen zu analysieren. Dieser nutzt die Pelletierbarkeit der Fibrillen. Aliquots mit definierten Konzentrationen an Fibrillen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an dT7 versetzt und inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert und die verbliebene Menge an ungebundenem dT7 im Überstand photometrisch bestimmt.

Es wurden 8 Ansätze mit einem Volumen von je 145  $\mu$ l und einer Fibrillenkonzentration von 7  $\mu$ M mit dT7 in einem Konzentrationsbereich von 0-13.6  $\mu$ M für 30 min bei 20 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Fibrillen bei 35 000 rpm für 30 min zentrifugiert und die Konzentration des im Überstand verbliebenen dT7 photometrisch bestimmt.

## 2.6 RP-HPLC

Die RP-HPLC (*Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography*) basiert auf der unterschiedlichen Hydrophobizität von Proteinen. Durch die hydrophoben Aminosäuren der Proteine kommt es zu einer Wechselwirkung mit der unpolaren Oberfläche einer Säulenmatrix. Je nach Struktur, Sequenz und Größe werden die Proteine unterschiedlich stark an der Säule zurückgehalten. Die Elution erfolgt mit einem steigenden Gradienten eines organischen Lö-

sungsmittels. Die RP-HPLC kann sowohl für präparative als auch für analytische Zwecke eingesetzt werden.

Alle in dieser Arbeit gezeigten Experimente wurden mit C<sub>18</sub>-(n-Octadecyl-)Säulen durchgeführt. Als Laufmittel wurde H<sub>2</sub>O; 0.05 % TFA (v/v) verwendet. Es wurde mit einem linear steigenden Gradienten von ACN; 0.05 % TFA (v/v) eluiert. Der Fluss betrug 0.7 ml/min. Es wurde Protein in einem Bereich von 0.002-0.1 mg in einem Volumen von 40-80 µl aufgetragen. Nach der Injektion wurde 3 min mit Laufmittel gespült. Anschließend wurde die Konzentration des Elutionsmittels innerhalb von 70 min auf 50 % (v/v) erhöht, entsprechend einem Gradienten von 1 %/ml. Am Ende wurde die Konzentration des Elutionsmittels innerhalb von 17 min von 50 auf 100 % erhöht. Die Chromatogramme wurden mithilfe der Lichtabsorption bei verschiedenen Wellenlängen von 205-280 nm aufgezeichnet.

## 2.7 Aminosäureanalytik

Die Aminosäureanalytik wurde als weitere Methode der Konzentrationsbestimmung von Proteinen verwendet. Sie diente als Eichmethode für die Konzentrationsbestimmung von N-(+7)Ala-CspB. Bei der Aminosäureanalytik wird das zu analysierende Protein durch Hydrolyse in seine Aminosäuren gespalten. Anschließend erfolgt eine quantitative Analyse einzelner Aminosäuren mittels RP-HPLC.

Die Aminosäureanalytik wurde durch das Labor von Herrn Prof. Dr. E. Reh (Zentrum für Proteinanalytik, Fachhochschule Bingen) durchgeführt. Es erfolgte eine saure Hydrolyse in 6 M GdmCl bei 150 °C für 20 min mit anschließender chromatographischer Trennung an einer AA511-Säule (Interaction Chemicals). An die Säule wurde eine Nachsäulen-Derivatisierung der Aminosäuren mit OPA-Reagenz (ortho-Phthalaldehyd) geschaltet. Die Detektion der Aminosäuren erfolgte durch Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm und einer Emissionswellenlänge von 475 nm. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde Phenylalanin gewählt. Es erfolgte ein Abgleich mit einem Standard.

## 2.8 Chemisch-induzierte De- und Renaturierungen

Durch die Denaturierung von Proteinen unter der Verwendung von Denaturierungsmitteln, mechanischer Kräfte oder Hitze können die thermodynamischen Parameter der Entfaltung bzw. die thermodynamische Stabilität des Proteins bestimmt werden. Die chemisch-induzierte Denaturierung wird meist mit Denaturierungsmitteln wie Harnstoff oder Guanidiniumchlorid (GdmCl) erreicht. Bei definierten Denaturierungsmittelkonzentrationen wird im Gleichgewichtszustand

der Anteil nativer und denaturierter Spezies ermittelt. Aus der sich ergebenden Übergangskurve kann die thermodynamische Stabilität des entsprechenden Proteins unter den gegebenen Bedingungen bestimmt werden. Voraussetzung für die Analyse ist die Reversibilität des Prozesses.

Für die Analysen wurden die Fusionen der N-terminalen Domänen und CspB in 0.1 M Na-Cacodylat; pH 7 und die Fusionen aus Alaninen und CspB in 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 100 mM NaCl; pH 7.5 bei variierenden Harnstoffkonzentrationen und einer Temperatur von 25 °C über Nacht inkubiert. Die Proteinkonzentration betrug 3 µM. Die Bestimmung des Anteils nativer bzw. denaturierter Spezies geschah durch Fluoreszenzmessungen bei einer Temperatur von 25 °C. Die Anregungswellenlänge betrug 295 nm und die Spaltbreite 5 nm. Der Wert der Emission bei 345 nm wurde für 90 s aufgezeichnet und anschließend gemittelt. Die Denaturierungsmittelkonzentrationen wurden refraktrometrisch nach (2.6) (Pace, 1986) bestimmt.

$$[Harnstoff] = 117.66(\Delta N) + 29.753(\Delta N)^2 + 185.56(\Delta N)^3 \quad (2.6)$$

[Harnstoff] Harnstoffkonzentration [M]  
 $\Delta N$  Änderung des Brechungsindex

Da die Entfaltung von CspB vermutlich einem Zwei-Zustands-Modell entspricht (Schindler *et al.*, 1995), wurden die Daten nach diesem Modell ausgewertet. Dabei kann die thermodynamische Stabilität des Proteins bei jeder Harnstoffkonzentration im Gleichgewicht nach Gleichung (2.7) beschrieben werden.

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln K \quad (2.7)$$

$\Delta G$  thermodynamische Stabilität [J/mol]  
 $R$  allgemeine Gaskonstante [J/K mol]  
 $T$  absolute Temperatur [K]  
 $K$  Gleichgewichtskonstante

Im Übergangsbereich existiert eine lineare Abhängigkeit zwischen der thermodynamischen Stabilität und der Harnstoffkonzentration. Diese Abhängigkeit wird durch die Kooperativität charakterisiert und kann nach Gleichung (2.8) beschrieben werden.

$$\Delta G = \Delta G_{H_2O} - m \cdot [Harnstoff] \quad (2.8)$$

$\Delta G_{H_2O}$  thermodynamische Stabilität bei 0 M Harnstoff [J/mol]  
 $m$  Kooperativität [J/mol M]  
[Harnstoff] Harnstoffkonzentration [M]

Bei der Konzentration an Denaturierungsmittel, bei der der Anteil nativer und denaturierter Spezies gleich ist, hat die thermodynamische Stabilität nach Gleichung (2.7) einen Wert von 0 J/mol. Die entsprechende Harnstoffkonzentration wird als Übergangsmittelpunkt bezeichnet und kann durch Umformen von Gleichung (2.8) mit Gleichung (2.9) beschrieben werden.

$$[\text{Harnstoff}]_{1/2} = \frac{\Delta G_{\text{H}_2\text{O}}}{m} \quad (2.9)$$

$[\text{Harnstoff}]_{1/2}$  Übergangsmittelpunkt [M]

Die relative Menge nativer Spezies bei variierenden Harnstoffkonzentrationen ( $\alpha$ ) wurde unter Berücksichtigung der Änderung der Fluoreszenz im vollständig nativen bzw. denaturierten Zustand nach Gleichung (2.10) bestimmt und gegen die Harnstoffkonzentration aufgetragen. Durch Kombination von Gleichung (2.7) und (2.8) und der Berücksichtigung von  $\alpha$  erhält man Gleichung (2.11). Die Auswertung der Übergangskurve und die Bestimmung der thermodynamischen Parameter erfolgte unter Anwendung von Gleichung (2.11).

$$\alpha = \frac{F - (F_d + a_d \cdot [\text{Harnstoff}])}{(F_n + a_n \cdot [\text{Harnstoff}]) - (F_d + a_d \cdot [\text{Harnstoff}])} \quad (2.10)$$

$$\alpha = \frac{1}{1 + \exp(-((\Delta G_{\text{H}_2\text{O}} - m \cdot [\text{Harnstoff}]) / R \cdot T))} \quad (2.11)$$

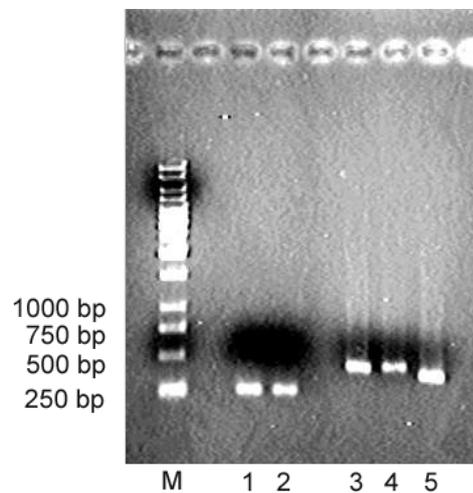
$\alpha$	relativer Anteil nativer Spezies
$F$	Fluoreszenz
$F_n + a_n \cdot [\text{Harnstoff}]$	Geradengleichung zur Berechnung der Fluoreszenz im vollständig nativen Zustand
$F_d + a_d \cdot [\text{Harnstoff}]$	Geradengleichung zur Berechnung der Fluoreszenz im vollständig denaturierten Zustand

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Rekombinante Herstellung der Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB

#### 3.1.1 Klonierung der Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB

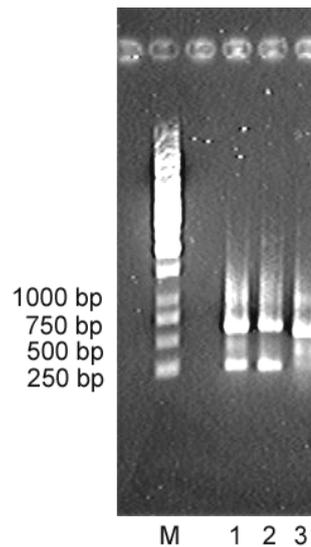
Um die kodierenden Sequenzen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB miteinander verknüpfen zu können, erfolgte zuerst eine Amplifizierung der einzelnen Fragmente mittels PCR. In dieser Reaktion wurden die cDNAs der N-terminalen Domänen von PABPN1 am 3'-Ende um 24 Nukleotide mit der für CspB kodierenden Sequenz erweitert. Umgekehrt wurde das 5'-Ende der für CspB kodierenden Sequenz um 21 Nukleotide des 3'-Endes der für die N-terminalen Domänen kodierenden Sequenzen verlängert (siehe auch Abbildung 2.1). Die durch PCR erzeugten und nach 2.2.4 präparierten Fragmente wurden in einer Agarose-Gelelektrophorese getrennt und sind in Abbildung 3.1 gezeigt.



**Abbildung 3.1** Agarose-Gelelektrophorese der amplifizierten Fragmente der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB. M Marker; 1 + 2 CspB kodierende DNA; 3, 4, 5 cDNA von N-WT-; 4 N-(+7)Ala-; 5 N- $\Delta$ Ala. Die PCR-Produkte wurden in einem 2%igen Agarosegel getrennt.

Anschließend erfolgte mittels PCR eine Verknüpfung der beiden Amplifikationsprodukte. Die Analyse der Fusion erfolgte zunächst durch eine Agarose-Gelelektrophorese und ist in Abbildung 3.2 gezeigt. Die Existenz von Banden knapp oberhalb von 500 bp in allen drei Fusionsansätzen ließ auf eine erfolgreiche Fusion schließen. Bei den Fusionen der für N-WT- und

N-(+7)Ala- mit der für CspB-kodierenden Sequenz, sind jedoch auch Banden bei ca. 250 bp zu sehen. Da für beide Fusionen die gleichen Primer benutzt wurden, ist davon auszugehen, dass eine unspezifische Primeranlagerung der PABPN1-N-Primer der Grund für diese PCR-Produkte war. Die Bildung dieser unspezifischen PCR-Produkte blieb unberücksichtigt, da die Präparation der Fragmente für die spätere Ligation eine Isolierung der Fragmente durch Gelextraktion einschloss.

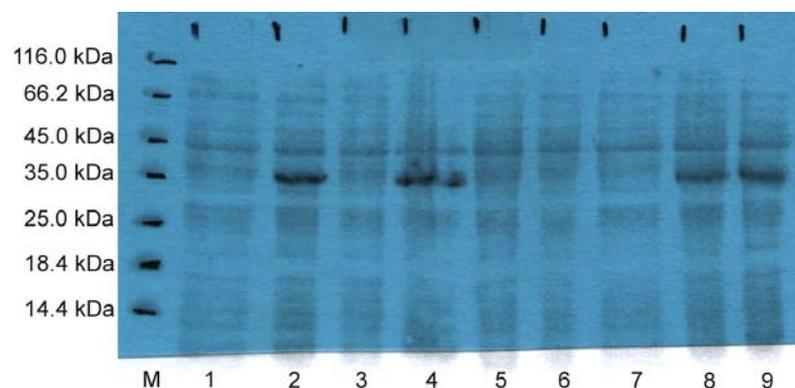


**Abbildung 3.2** Agarose-Gelelektrophorese der fusionierten Fragmente der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB. M Marker; 1, 2, 3 Fusionsfragmente der cDNAs von N-WT; N-(+7)Ala und N- $\Delta$ Ala mit der für CspB kodierenden DNA. Die PCR-Produkte wurden in einem 0.8%igen Agarosegel getrennt.

Die Präparation der PCR-Produkte für die Ligation mit dem Expressionsvektor pET15b erfolgte wie unter 2.2.4 beschrieben. Durch die Klonierung wurden 4, 52 und 32 Klone mit potentiell fusionierter Gensequenz von N-WT, N-(+7)Ala und N- $\Delta$ Ala mit CspB erhalten. Eine analytische Restriktion der präparierten Plasmide mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Nde*I zeigte Klone, deren Plasmide ein *Insert* trugen. Die Plasmide dieser Klone wurden abschließend sequenziert. Es konnten für alle drei Fusionen Klone mit korrekter Sequenz des *Inserts* gefunden werden. Klone, deren Plasmide die korrekte Sequenz besaßen, wurden anschließend für einen Test der Genexpression genutzt. Die Synthese der Fusionsproteine wurde mittels Westernblot und anschließender Immundetektion überprüft.

### 3.1.2 Genexpression der Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB

Die Genexpression wurde mit einer Kultur im kleinen Maßstab (20 ml) getestet. Da die DNA-Sequenzen der N-terminalen Domänen von PABPN1 eine Reihe in *E. coli* seltener Argininkodons enthalten, erfolgte die Expression in Anwesenheit des Plasmids pUBS 520. Dieses Plasmid kodiert für die tRNAs der in *E. coli* seltenen Argininkodons AGA und AGG und verbessert somit die rekombinante Genexpression eukaryotischer Gene in *E. coli* (Brinkmann *et al.*, 1989). Eine SDS-PAGE des Gesamtzellextraktes, vor und nach der Induktion, konnte keine eindeutige Aussage über eine Expression der Fusionen geben. Aus diesem Grund wurde ein Westernblot mit anschließender Immundetektion zur Analyse der Expression herangezogen (siehe Abbildung 3.3). Während auf dem mit Ponceau-Rot gefärbten Blot noch keine eindeutigen Expressionsbanden sichtbar waren, zeigte die im Anschluss durchgeführte Immundetektion (Anti-His<sub>6</sub>-Antikörper) einzelne Banden, die ausschließlich in den Extrakten nach Induktion zu finden waren. Die detektierten Proteine zeigten in der SDS-PAGE ein Laufverhalten mit einer Größe von ca. 35 kDa. Die molekulare Masse der Fusionen beträgt jedoch nur ca. 23 kDa. Diese Differenz war nicht unerwartet, da auch die N-terminalen Domänen von PABPN1, vermutlich auf Grund ihres niedrigen isoelektrischen Punktes von 4,6, ein abnormales Laufverhalten in der SDS-PAGE zeigten (Scheuermann, 2003).



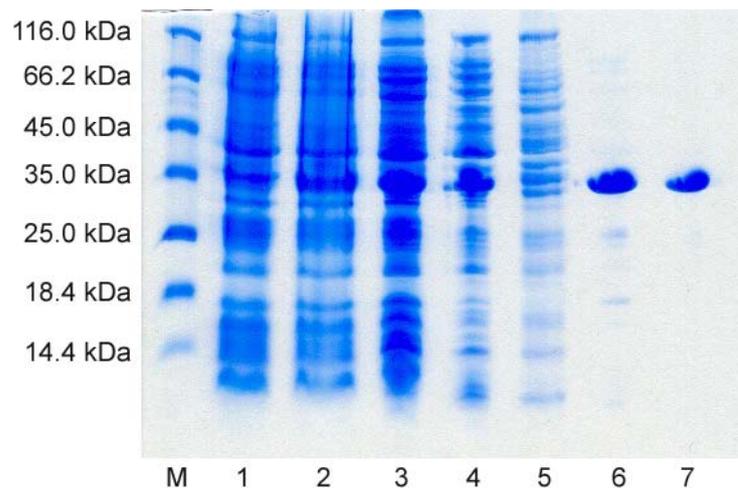
**Abbildung 3.3** Westernblot der Zellextrakte vor und nach Induktion der Genexpression der Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB. M Marker; 1-4 N-WT-CspB mit 1, 3 vor und 2, 4 nach Induktion; 5, 6 pET15b ohne *Insert* vor und nach Induktion; 7, 8 N- $\Delta$ -Ala-CspB vor und nach Induktion; 9 N-(+7)Ala-CspB nach Induktion. Der Blot wurde zuerst mit Ponceau-Rot gefärbt und anschließend einer Immundetektion unterzogen. Die Detektion der Fusionsproteine geschah mit einem Anti-His<sub>6</sub> Antikörper.

Alle Klone mit einem Plasmid mit korrekter DNA-Sequenz zeigten ähnlich starke Expressionsbanden. Daher wurde pro Fusionskonstrukt jeweils ein Klon ausgewählt, mit dem alle folgenden Expressionen durchgeführt wurden. Die Genexpression führte zu löslich exprimiertem Protein.

### 3.1.3 Reinigung der Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB

Basierend auf den Reinigungsprotokollen der einzelnen Fusionspartner (Scheuermann *et al.*, 2003; Wunderlich *et al.*, 2005) wurde ein Reinigungsverfahren für die Fusionsproteine der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB entwickelt.

Beide Reinigungsprotokolle beinhalten als ersten Schritt eine Hitzefällung. Da die N-terminalen Domänen keine tertiären Kontakte besitzen und damit per Definition „nativ ungefaltete“ Proteine sind (Scheuermann, 2003; Lodderstedt *et al.*, 2008), können sie extremeren Bedingungen ausgesetzt werden als ein gefaltetes Protein wie CspB. Aus diesem Grund wurden für die Reinigung der Fusionen die Bedingungen der Hitzefällung des Protokolls für CspB verwendet. Eine Isopropanolfällung, wie sie bei der Reinigung der N-terminalen Domänen genutzt wird, konnte nicht angewandt werden. Sie hätte einen nahezu vollständigen Verlust der Fusionen zur Folge gehabt. Da eine erfolgreiche Expression der N-terminalen Domänen von PABPN1 nur in Anwesenheit eines His-tags möglich ist (Scheuermann, 2003), wurde auch hier eine Expression mit N-terminalem His-tag (pET15b) durchgeführt. Daher bot sich als weiterer Reinigungsschritt eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie an. Es wurde beobachtet, dass der Reinigungsgrad der Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen deutlich höher war als unter nativen Bedingungen. Außerdem hatte eine Reinigung unter denaturierenden Bedingungen den Vorteil, dass durch die Entfaltung von CspB dessen Bindung an Nukleinsäuren unterdrückt wurde. Störende, an CspB gebundene Nukleinsäuren konnten so beseitigt werden. CspB wurde während der Ni-NTA-Affinitätschromatographie an der Säule rückgefaltet und die Fusionen anschließend eluiert. Da eine Anionenaustauschchromatographie, wie sie sowohl bei der Reinigung der N-terminalen Domänen von PABPN1 als auch bei der Reinigung von CspB verwandt wird, im Vergleich zur Ni-NTA-Affinitätschromatographie keinen weiteren Reinigungseffekt zeigte, wurde hierauf verzichtet. Nach der Ni-NTA-Affinitätschromatographie waren nur noch wenige Verunreinigungen auf dem SDS-Gel sichtbar. Diese konnten nahezu vollständig durch eine abschließende Gelfiltration beseitigt werden. Die Ergebnisse der einzelnen Schritte der Reinigung sind in Abbildung 3.4 gezeigt. Es ist exemplarisch der Verlauf einer Reinigung von N-(+7)Ala-CspB abgebildet. Alle drei Fusionsproteine wurden nach einem identischen Protokoll gereinigt.



**Abbildung 3.4 SDS-PAGE der Reinigungsschritte von N-(+7)Ala-CspB.** M Marker; 1, 2 Gesamtzellextrakt vor bzw. nach Induktion; 3 Überstand des Zellaufschlusses; 4 Überstand der Hitze-fällung; 5, 6 Durchlauf bzw. Elution der Ni-NTA-Affinitätschromatographie; 7 Elution der Gelfiltration.

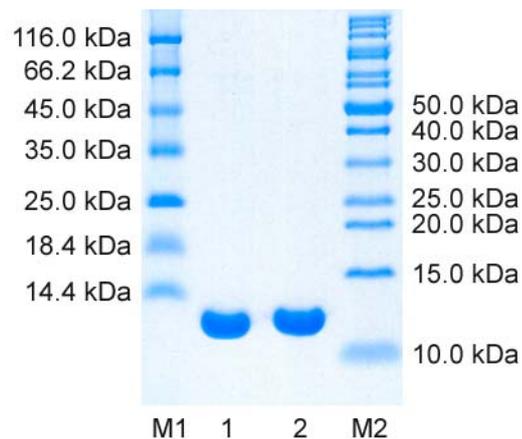
Die Identität und Homogenität der gereinigten Fusionsproteine konnte mittels massenspektrometrischer Analyse und RP-HPLC bestätigt werden.

## 3.2 Rekombinante Herstellung der „direkten Fusionen“

Der Ausdruck „direkte Fusionen“ bezeichnet die Fusionen aus Poly-Alaninen und CspB (10Ala-CspB, 17Ala-CspB). Zur Vereinfachung wird er im weiteren Verlauf der Arbeit häufiger verwendet werden. Die Klonierung der Fusionskonstrukte für die „direkten Fusionen“ wurde von S. von Einem in einer von mir betreuten Diplomarbeit durchgeführt (von Einem, 2006).

### 3.2.1 Reinigung der „direkten Fusionen“

Die Reinigung der „direkten Fusionen“ erfolgte auf Grundlage des Protokolls von S. von Einem (von Einem, 2006). Da von Einem zeigte, dass die Fusionen aus Poly-Alaninen und CspB eine im Vergleich zu CspB geringere thermodynamische Stabilität besitzen, wurde die Hitze-fällung bei einer, im Vergleich zum Protokoll von S. von Einem, um 10 °C geringeren Temperatur durchgeführt. Auf die Anionenaustauschchromatographie wurde verzichtet, da kein verbesserter Reinigungseffekt beobachtet werden konnte. Die Ergebnisse der Reinigung der „direkten Fusionen“ sind in Abbildung 3.5 zusammenfassend dargestellt.



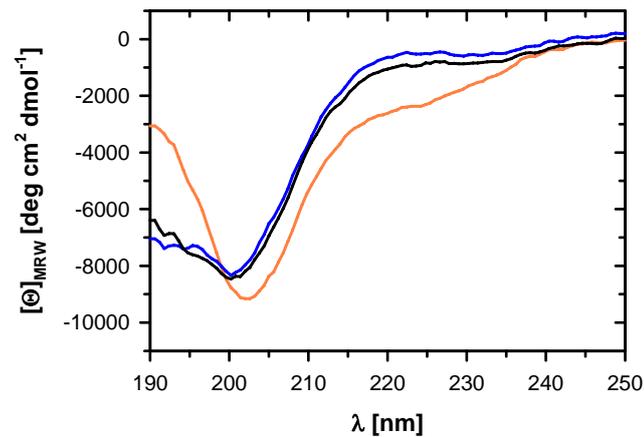
**Abbildung 3.5** SDS-PAGE der gereinigten „direkten Fusionen“. M1 und M2 Marker; 1, 2 10-Ala-CspB und 17Ala-CspB.

Analog der Reinigung der Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB wurde die Identität und Homogenität der gereinigten Proteine mittels massenspektrometrischer Analyse und RP-HPLC bestätigt.

### 3.3 Biophysikalische Charakterisierung der Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB

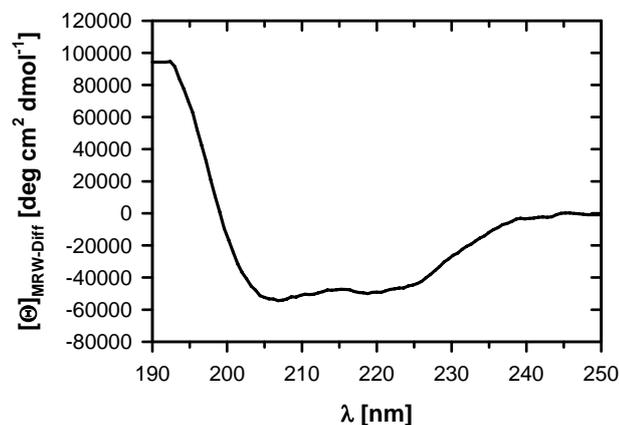
#### 3.3.1 Geringe Sekundärstrukturanteile der Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB

Mit Hilfe der Fern-UV-CD-Spektroskopie wurden die Sekundärstrukturanteile der Fusionsproteine der N-terminalen Domänen und CspB analysiert. Die Strukturanteile sollten mit denen der nicht fusionierten Proteine verglichen werden, um einen Einfluss der Fusion auf die Struktur beider Proteine zu analysieren. In Abbildung 3.6 sind die Fern-UV-CD-Spektren der drei Fusionen gezeigt. Trotz der Differenz von 10 Alaninen ist zwischen den Spektren von N-WT-CspB und N- $\Delta$ Ala-CspB faktisch kein Unterschied sichtbar. Beide Spektren zeigen signifikante Merkmale einer *random-coil*-Struktur. Dies spiegelt sich in dem absoluten Minimum bei ca. 200 nm bzw. dem absoluten Maximum bei 220 nm wider. Das Spektrum von N-(+7)Ala-CspB dagegen zeigt ein um mehrere Nanometer zu höheren Wellenlängen verschobenes absolutes Minimum. Außerdem ist ein starker Anstieg des Signals zwischen 200 und 190 nm zu beobachten. Beides lässt einen höheren Anteil an  $\alpha$ -helikaler Struktur in diesem Protein vermuten. Diese Vermutung konnte durch die Bildung des Differenzspektrums von N-(+7)Ala- und N-WT-CspB (siehe Abbildung 3.7) bestätigt werden.



**Abbildung 3.6 Fern-UV-CD-Spektren der Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB.** N- $\Delta$ Ala-CspB in blau; N-WT-CspB in schwarz und N-(+7)Ala-CspB in orange. Die Spektren wurden in 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 100 mM NaCl; pH 7.5 bei einer Proteinkonzentration von 0.8-1.3 mg/ml und einer Temperatur von 25 °C gemessen.

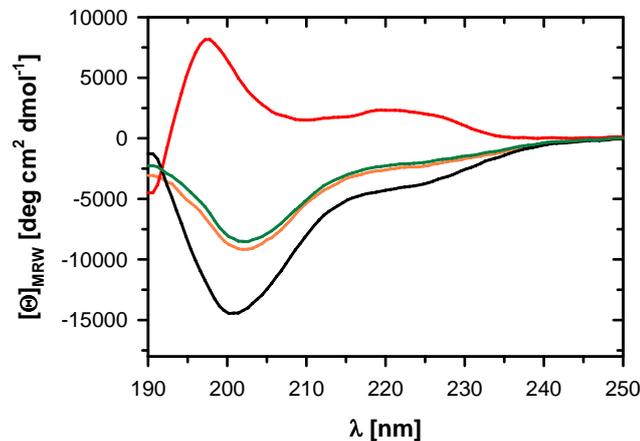
Ein erhöhter Anteil  $\alpha$ -helikaler Struktur, hervorgerufen durch erweiterte Alaninsequenzen, war nicht unerwartet. So wurden bereits bei Sekundärstrukturanalysen von Poly-Alanin-Peptiden signifikante  $\alpha$ -helikale-Strukturen nachgewiesen (Miller *et al.*, 2001, 2002). Des Weiteren wurden ähnliche Beobachtungen bei der Analyse der N-terminalen Domänen von PABPN1 gemacht (Scheuermann *et al.*, 2003).



**Abbildung 3.7 CD-Differenzspektrum von N-(+7)Ala-CspB und N-WT-CspB.** Es gelten die gleichen Bedingungen wie unter Abbildung 3.6.

Die hier aufgezeichneten Spektren der Fusionen ähneln im Verlauf, jedoch nicht in der Intensität, sehr den Spektren der nicht fusionierten N-terminalen Domänen. Die Spektren zeigen keine offensichtlichen  $\beta$ -Faltblatt-Strukturanteile, die auf CspB schließen lassen könnten. Um die Existenz von Sekundärstrukturanteilen von CspB in den Fusionen nachzuweisen, wurde das Spektrum der nicht-fusionierten Partner, N-(+7)Ala und CspB, vermessen, ein Additionsspekt-

rum gebildet und mit dem Spektrum der Fusion verglichen. Die N-terminale Domäne wurde von G. Lodderstedt und CspB von M. Wunderlich (Universität Bayreuth) zur Verfügung gestellt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.8 gezeigt.



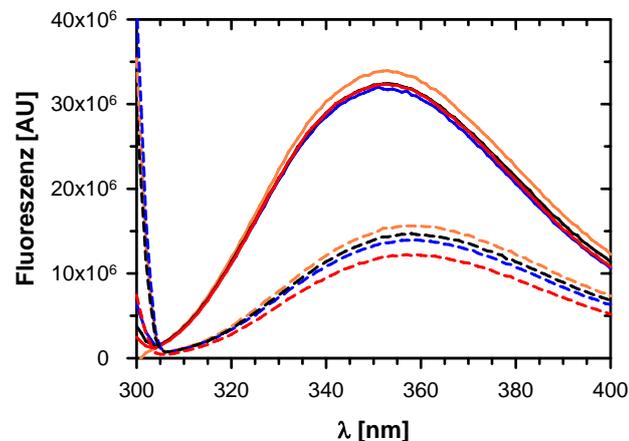
**Abbildung 3.8** Gemessenes und kalkuliertes CD-Spektrum von N-(+7)Ala-CspB und die CD-Spektren der nicht-fusionierten Partner. N-(+7)Ala-CspB gemessen und berechnet in orange bzw. grün; CspB in rot und N-(+7)Ala in schwarz. Die Spektren wurden in 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 100 mM NaCl; pH 7.5 bei einer Proteinkonzentration von 0.8-1.3 mg/ml und einer Temperatur von 25 °C gemessen.

Es ist deutlich erkennbar, dass das berechnete Spektrum der Fusion dem tatsächlichen Spektrum entspricht. Dies lässt den Schluss zu, dass beide Fusionspartner strukturell unabhängig voneinander in der Fusion vorliegen. Trotz des offensichtlich geringen Sekundärstrukturanteils der Fusionen scheint die Sekundärstruktur des fusionierten CspB gleich der des nicht fusionierten CspB zu sein.

### 3.3.2 Ähnliche spektroskopische Eigenschaften von CspB und den Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB

Die Ergebnisse der Fern-UV-CD-Spektroskopie (siehe 3.3.1) lassen vermuten, dass die Partner der Fusionen der N-terminalen Domänen und CspB strukturell unabhängig voneinander in den Fusionen vorliegen. Da die N-terminalen Domänen von PABPN1 keine tertiären Kontakte besitzen und daher keinen kooperativen Entfaltungsübergang zeigten (Scheuermann, 2003; Lodderstedt *et al.*, 2008), müsste allein CspB für die tertiären Kontakte in den Fusionen verantwortlich sein. So sollte ein direkter Vergleich der, durch die Tertiärstruktur geprägten, spektroskopischen Eigenschaften von CspB mit denen der Fusionen Aufschluss über den Faltungszustand von CspB in den Fusionen geben.

Zur Bestimmung von tertiären Kontakten bieten sich Fluoreszenzmessungen an. Sowohl die Quantenausbeute als auch das Emissionsmaximum der intrinsischen Fluoreszenz sind charakteristische Größen jedes Proteins. Beide werden durch die molekulare Umgebung der aromatischen Aminosäuren und damit dem Faltungszustand des Proteins bestimmt. Das einzige in den Fusionen vorhandene Tryptophan befindet sich im CspB. Daher konnte es durch eine spezifische Anregung als Sonde für den Faltungszustand von CspB genutzt werden. Es wurde die Fluoreszenz der Fusionen und von CspB unter nativen und denaturierenden Bedingungen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.9 gezeigt.

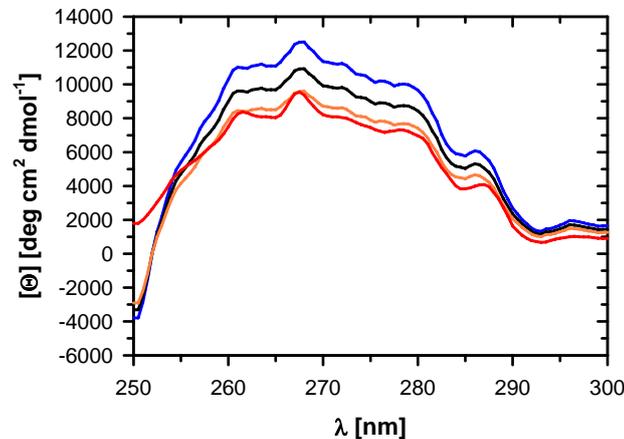


**Abbildung 3.9** Fluoreszenzspektren von CspB und den Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB unter nativen und denaturierenden Bedingungen. CspB in rot; N- $\Delta$ Ala-CspB in blau; N-WT-CspB in schwarz und N-(+7)Ala-CspB in orange; native Bedingungen durchgezogene und denaturierende Bedingungen gestrichelte Linien. Die Spektren wurden in 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 100 mM NaCl; pH 7.5 (mit oder ohne 6 M GdmCl) bei einer Proteinkonzentration von 3  $\mu\text{M}$  und einer Temperatur von 20  $^\circ\text{C}$  gemessen. Es erfolgte eine Anregung bei 295 nm.

Es ist klar erkennbar, dass CspB und die Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB die gleichen optischen Eigenschaften bezüglich der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz besitzen. Unter nativen Bedingungen weisen die Proteine ein Emissionsmaximum von 353 nm auf. Eine Denaturierung der Proteine führt zu einer Rotverschiebung des Emissionsmaximums zu ca. 359 nm. Dieses Emissionsmaximum entspricht ungefähr dem von Tryptophan in wässriger Umgebung. Außerdem wird durch die Denaturierung die Fluoreszenzintensität um ca. 50 % verringert.

Neben Fluoreszenzmessungen wurden auch Nah-UV-CD-Messungen zur Bestimmung von tertiären Kontakten genutzt. Im Gegensatz zu Fern-UV-CD-Messungen werden die Absorptionsspektren im Nah-UV-Bereich, ähnlich den Fluoreszenzspektren, durch die molekulare Umgebung der aromatischen Aminosäuren geprägt. Die resultierenden komplexen Nah-UV-CD-Spektren gefalteter Proteine sind somit ein exaktes Kriterium für den korrekten Faltungszustand

jedes Proteins und fungieren quasi als „Fingerabdruck“ der Proteine (Greenfield, 1996; Kelly & Price, 2000). Die Ergebnisse der Bestimmung der Nah-UV-CD-Spektren sind in Abbildung 3.10 gezeigt.



**Abbildung 3.10** Nah-UV-CD-Spektren von CspB und den Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB. CspB in rot; N- $\Delta$ Ala-CspB in blau; N-WT-CspB in schwarz und N-(+7)Ala-CspB in orange. Die Spektren wurden in 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 100 mM NaCl; pH 7.5 bei einer Proteinkonzentration von 1.0-1.3 mg/ml und einer Temperatur von 25 °C gemessen.

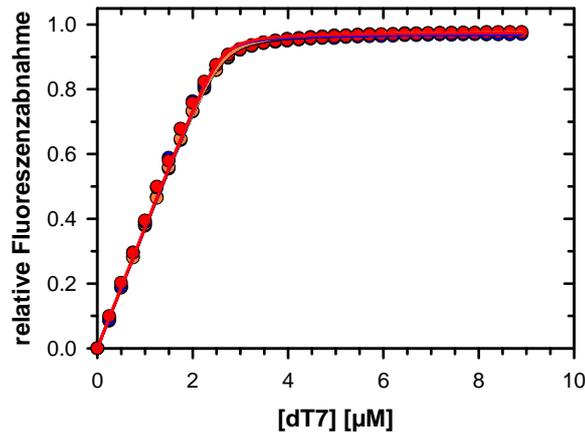
Der Verlauf der Nah-UV-CD-Spektren von CspB und den Fusionen ist nahezu identisch. Dies lässt eine identische molekulare Umgebung des Tryptophans von CspB in CspB und den Fusionen vermuten und bestätigt die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen. Es bleibt allerdings zu erwähnen, dass die Intensitäten der Spektren schwanken, was im Kontext der gesamten spektroskopischen Charakterisierung der Fusionen nicht erklärt werden kann und somit vermutlich auf Messungenauigkeiten zurückzuführen ist.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Ergebnisse der spektroskopischen Analysen (Fern-UV-, Nah-UV-CD-Spektroskopie und Fluoreszenz) der Fusionen der N-terminalen Domänen und CspB strukturell unabhängige Fusionspartner zeigen. Daher ist anzunehmen, dass CspB in den Fusionen nativ vorliegt.

### 3.3.3 Natives CspB in den Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB

Die native Struktur von CspB in den Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB wurde über die Bindung von Nukleinsäuren nachgewiesen. CspB ist in der Lage einzelsträngige DNA oder RNA zu binden (Graumann & Marahiel, 1994). Es konnte eine präferentielle Bindung von Poly-Thymidin-Oligonukleotiden nachgewiesen werden (Lopez *et al.*, 1999, 2001). Mit besonders hoher Affinität wird das Oligonukleotid dT7 gebunden (Zeeb *et al.*, 2006).

Durch die Nukleinsäurebindung wird die Intensität der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz von CspB verringert. Daher wurden die Nukleinsäurebindungseigenschaften der Fusionen mittels Fluoreszenztitration untersucht. Die ermittelten Bindungsisothermen sind in Abbildung 3.11 und die dazugehörigen  $K_D$ -Werte in Tabelle 3.1 gezeigt.



**Abbildung 3.11** dT7-Bindungsisothermen von CspB und den Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB. CspB in rot; N- $\Delta$ Ala-CspB in blau; N-WT-CspB in schwarz und N-(+7)Ala-CspB in orange. Die Messungen wurden in 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 100 mM NaCl; pH 7.5 bei einer Proteinkonzentration von 3  $\mu\text{M}$  und einer Temperatur von 20  $^\circ\text{C}$  durchgeführt. Die Anregung erfolgte bei 295 nm. Die Fluoreszenzabnahme wurde bei 352 nm gemessen.

Die Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB zeigen ein im Vergleich zum nicht fusionierten CspB identisches dT7-Bindungsverhalten. Dies wird an den übereinander liegenden Bindungsisothermen deutlich. Die Bindungsstöchiometrie beträgt etwa 0.86 (dT7 : Protein) und die Affinitäten liegen zwischen 20 und 35 nM.

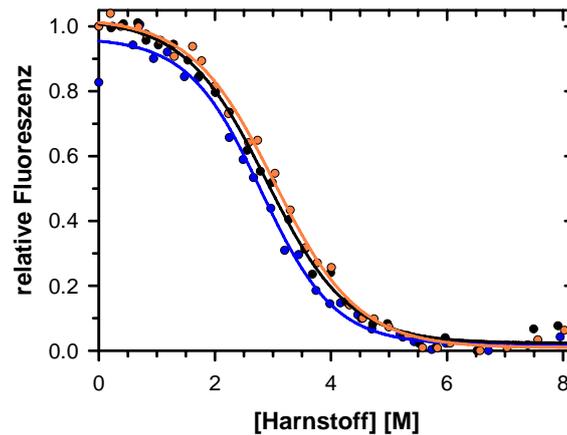
**Tabelle 3.1**  $K_D$ -Werte der Bindung von dT7 durch CspB und den Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB

Protein	$K_D$ [nM]
CspB	$23.4 \pm 5.2$
N- $\Delta$ Ala-CspB	$20.7 \pm 5.2$
N-WT-CspB	$34.0 \pm 1.8$
N-(+7)Ala-CspB	$35.0 \pm 2.0$

Die Ergebnisse der Analyse der dT7-Bindung und die Resultate der spektroskopischen Analysen (siehe 3.3.1 und 3.3.2) belegen zweifelsfrei, dass CspB in den Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB im korrekt gefalteten, nativen Zustand vorliegt.

### 3.3.4 Die thermodynamische Stabilität von CspB in den Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB

Die bisher gezeigten Ergebnisse zur biophysikalischen Charakterisierung der Fusionen der N-terminalen Domänen und CspB (siehe 3.3.1 bis 3.3.3) zeigen, dass die Bindungspartner strukturell unabhängig im Fusionskonstrukt vorliegen. Die Fusionen enthalten nativ gefaltetes CspB. Unklar blieb jedoch, inwiefern die Fusion die thermodynamische Stabilität von CspB beeinflusst. Aus diesem Grund wurden chemisch-induzierte De- und Renaturierungen der Fusionen gemessen und die thermodynamischen Parameter der Gleichgewichtsübergänge bestimmt. Als Denaturierungsmittel wurde Harnstoff verwendet. Die im Gleichgewicht vorhandenen Anteile an nativem und denaturiertem Protein wurden mittels Fluoreszenz bestimmt. Abbildung 3.12 zeigt die kooperativen Entfaltungsübergänge der drei Fusionen der N-terminalen Domänen und CspB. In Tabelle 3.2 sind die thermodynamischen Parameter aufgelistet. Alle Denaturierungen waren reversibel.



**Abbildung 3.12** Chemisch-induzierte Denaturierung der Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB. N- $\Delta$ Ala-CspB in blau; N-WT-CspB in schwarz und N-(7)Ala-CspB in orange. Die Messungen wurden in 0.1 M Na-Cacodylat/HCl; pH 7.0 bei einer Proteinkonzentration von 3  $\mu$ M und einer Temperatur von 25 °C durchgeführt. Die Anregung erfolgte bei 295 nm. Es wurde die Emission bei 345 nm bestimmt.

Die Entfaltungsübergänge der einzelnen Fusionen sind nahezu identisch. Dies schlägt sich in vergleichbaren thermodynamischen Größen nieder.

**Tabelle 3.2** Thermodynamische Parameter bestimmt aus den Entfaltungsübergängen der Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB

Protein	$\Delta G_{H_2O}$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]	$m$ [kJ mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> ]
N- $\Delta$ Ala-CspB	11.0 $\pm$ 1.0	3.9 $\pm$ 0.3
N-WT-CspB	10.1 $\pm$ 0.6	3.5 $\pm$ 0.2
N-(+7)Ala-CspB	10.4 $\pm$ 0.6	3.4 $\pm$ 0.2

Die Daten zeigen eine identische thermodynamische Stabilität von CspB in den Fusionen. Aus dem Vergleich zu den aus der Literatur bekannten Daten, in denen die thermodynamische Stabilität mit einem Wert von 12.4 kJ/mol und die Kooperativität mit einem Wert von 3.2 kJ/(mol M) angegeben wird (Schindler *et al.*, 1995), bleibt jedoch festzuhalten, dass die Fusion von CspB mit den N-terminalen Domänen von PABPN1 einen leicht destabilisierenden Effekt auf CspB ausübt.

### 3.4 Biophysikalische Charakterisierung der „direkten Fusionen“

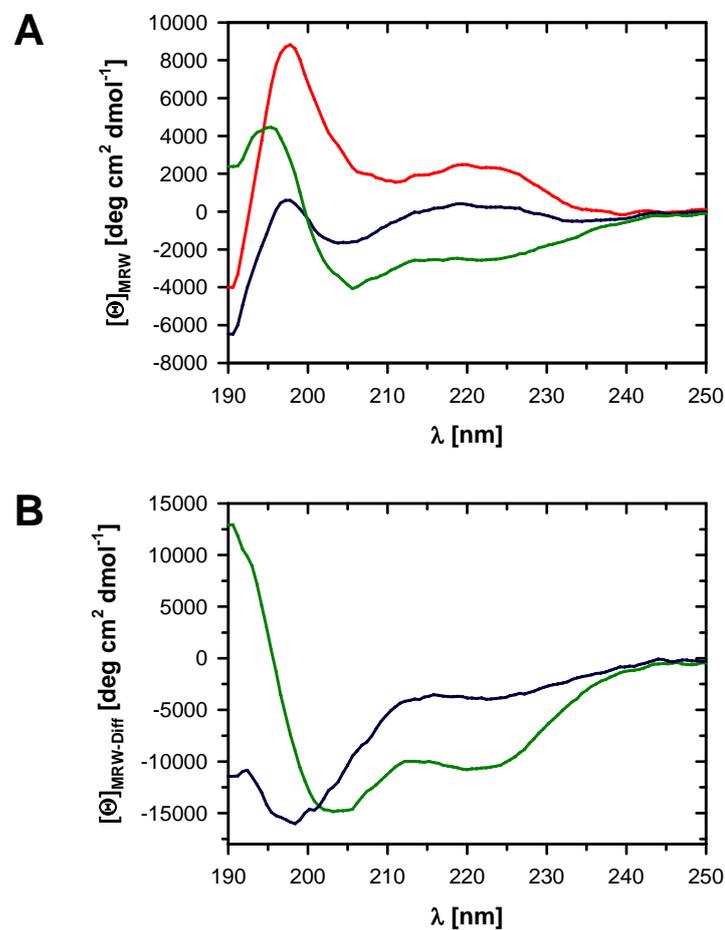
Erste Untersuchungen zu den biophysikalischen Eigenschaften der „direkten Fusionen“ wurden bereits in der Diplomarbeit von S. von Einem durchgeführt (von Einem, 2006). Da jedoch nicht alle Ergebnisse im Rahmen der Diplomarbeit reproduziert werden konnten und aus diesem Grund einige offene Fragen nicht geklärt werden konnten, wurde eine umfassende biophysikalische Charakterisierung der Fusionen durchgeführt.

#### 3.4.1 Sekundärstrukturanteile der „direkten Fusionen“

Die Sekundärstrukturanteile der Fusionen aus Poly-Alaninen und CspB wurden ebenfalls mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie untersucht. Die entsprechenden Spektren der Fusionen und die Differenzspektren zu CspB sind in Abbildung 3.13 gezeigt.

Das für CspB bestimmte Fern-UV-CD-Spektrum entspricht den in der Literatur beschriebenen Daten (Schindler *et al.*, 1995). Das Spektrum wird im Wesentlichen durch  $\beta$ -Faltblatt- und *random-coil*-Strukturanteile, entsprechend der Struktur von CspB (Schindelin *et al.*, 1993; Schnuchel *et al.*, 1993), geprägt. Die Fusion von zehn Alaninen mit CspB führt zu einer Verringerung der Intensität des CD-Signals und zur Verschiebung der Minima und Maxima des Spektrums. Das Differenzspektrum von 10Ala-CspB und CspB deutet auf einen höheren Anteil an *random-coil*-Struktur in der Fusion hin. Ein deutlicher Hinweis darauf ist das absolute Minimum unter-

halb von 200 nm. Die Erweiterung des N-terminalen Alaninbereiches von 10Ala-CspB um zusätzliche sieben Alanine führt zu einer weiteren deutlichen Veränderung des CD-Signals. Das Spektrum von 17Ala-CspB zeigt im Vergleich zu den Spektren von CspB und 10Ala-CspB eine signifikante Verschiebung des absoluten Maximums zu einer Wellenlänge unterhalb von 200 nm. Außerdem ist ein neues absolutes Minimum bei ca. 205 nm und ein lokales Minimum bei ca. 222 nm zu beobachten. Aus dem Differenzspektrum von 17Ala-CspB und CspB ist klar zu erkennen, dass das veränderte Spektrum von 17Ala-CspB aus einer Zunahme an  $\alpha$ -helikaler Struktur resultiert. Die in dem Spektrum von 17Ala-CspB auftretenden Minima sind im Differenzspektrum noch ausgeprägter. Außerdem ist in dem Differenzspektrum ein absolutes Maximum bei 190 nm sichtbar. All diese Merkmale sind Charakteristika  $\alpha$ -helikaler Strukturanteile.



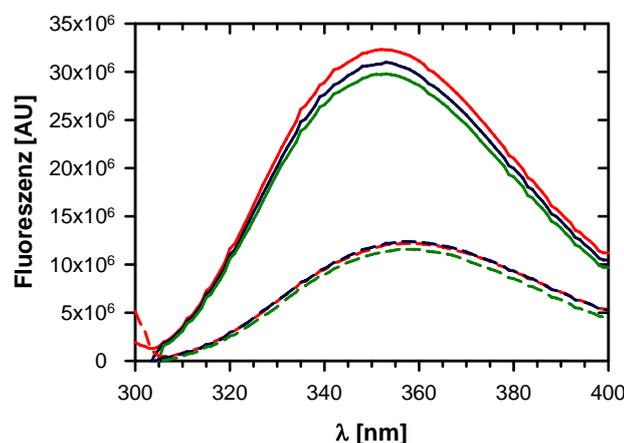
**Abbildung 3.13** (A) Fern-UV CD-Spektren der „direkten Fusionen“ und von CspB. CspB in rot; 10Ala-CspB in blau und 17Ala-CspB in grün. (B) Differenzspektren der „direkten Fusionen“ und CspB. Differenzspektrum von 10Ala-CspB und CspB in blau und Differenzspektrum von 17Ala-CspB und CspB in grün. Die Spektren wurden in 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 100 mM NaCl; pH 7.5 bei einer Proteinkonzentration von 1.0-1.3 mg/ml und einer Temperatur von 25 °C gemessen.

Ähnlich der Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 nimmt auch bei den „direkten Fusionen“ der Anteil  $\alpha$ -helikaler Struktur mit zunehmender Zahl an aufeinander folgenden Alaninen zu. Diese Beobachtung wurde für Peptide aus Poly-Alaninen bereits beschrieben (Miller *et al.*, 2001, 2002). Es bleibt jedoch festzuhalten, dass die Zunahme an  $\alpha$ -helikaler Struktur erst in der Fusion aus 17 Alaninen und CspB signifikant ist. Die Erweiterung von CspB um 10 Alanine führt eher zur Zunahme an *random-coil*-Strukturanteilen. Dies ist möglicherweise auf den N-terminalen His-tag der Fusionen zurückzuführen.

### 3.4.2 Ähnliche spektroskopische Eigenschaften der „direkten Fusionen“ und CspB

Einen ersten Hinweis, ob CspB auch in den „direkten Fusionen“ korrekt gefaltet vorliegt, sollten wiederum Fluoreszenz- und Nah-UV-CD-Messungen liefern.

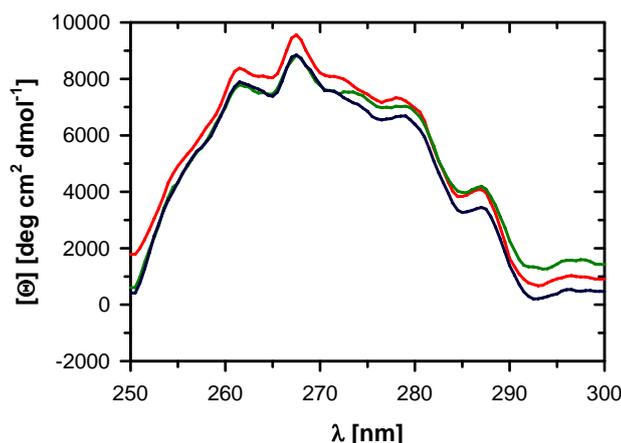
In der Diplomarbeit von S. von Einem wurden für die „direkten Fusionen“ unter nativen und denaturierenden Bedingungen gleiche Fluoreszenzemissionsmaxima gezeigt. Die Fluoreszenzintensitäten der verschiedenen Proteine zeigten jedoch deutliche Schwankungen (von Einem, 2006). Aus diesem Grund wurden die Fluoreszenzeigenschaften der „direkten Fusionen“ erneut bestimmt. In Abbildung 3.14 sind die Fluoreszenzspektren der Fusionen und von nicht fusioniertem CspB, gemessen unter nativen und denaturierenden Bedingungen, dargestellt.



**Abbildung 3.14** Fluoreszenzspektren der „direkten Fusionen“ und CspB. CspB in rot; 10Ala-CspB in blau und 17Ala-CspB in grün; native Bedingungen durchgezogene und denaturierende Bedingungen gestrichelte Linien. Die Spektren wurden in 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 100 mM NaCl; pH 7.5 (mit oder ohne 6 M GdmCl) bei einer Proteinkonzentration von 3  $\mu\text{M}$  und einer Temperatur von 20 °C gemessen. Es erfolgte eine Anregung bei 295 nm.

Die Fluoreszenzspektren der Fusionen und CspB zeigen sowohl unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen einen ähnlichen Verlauf. Analog der Analyse der Fluoreszenzeigenschaften der Fusionen der N-terminalen Domänen und CspB (siehe 3.3.2) und der Analyse

von S. von Einem (von Einem, 2006) besitzen die Spektren der nativen Proteine ein Emissionsmaximum bei ca. 353 nm, während die Denaturierung der Proteine zu einer Verschiebung des Emissionsmaximums zu 359 nm und einem Intensitätsverlust von ca. 50 % führt. Die Spektren der nativen Proteine zeigen nahezu identische Intensitäten. Um den Faltungszustand von CspB in den „direkten Fusionen“ näher zu charakterisieren, wurden Nah-UV-CD-Messungen durchgeführt (siehe Abbildung 3.15).



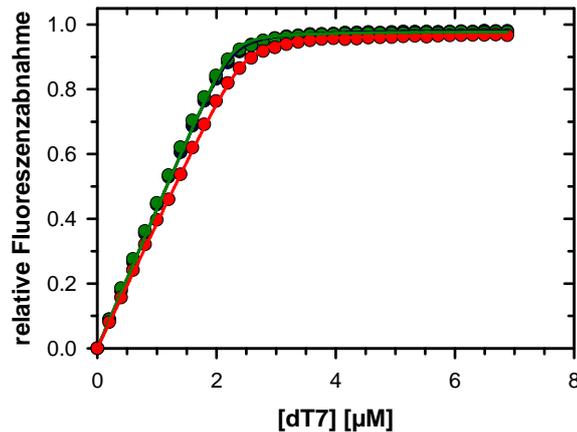
**Abbildung 3.15** Nah-UV-CD-Spektren der „direkten Fusionen“ und CspB. CspB in rot; 10Ala-CspB in blau und 17Ala-CspB in grün. Die Spektren wurden in 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 100 mM NaCl; pH 7.5 bei einer Proteinkonzentration von 1.0-1.3 mg/ml und einer Temperatur von 25 °C gemessen.

Die Nah-UV-CD-Spektren der „direkten Fusionen“ und das Spektrum von CspB haben einen ähnlichen Verlauf und nahezu identische Intensitäten. Nur in einem geringen Wellenlängenbereich (272-282 nm) besitzt das Spektrum von 17Ala-CspB einen leicht unterschiedlichen Verlauf. Eine Abweichung in diesem Wellenlängenbereich könnte eine geringfügig veränderte molekulare Umgebung des Tryptophans von CspB als Ursache haben. Ob eine solche strukturelle Veränderung tatsächlich vorliegt bzw. für die native Struktur von CspB relevant ist, sollte durch die Nukleinsäurebindungseigenschaften der Fusionen nachweisbar sein. Die hier aus Fluoreszenz- und Nah-UV-CD-Messungen gewonnenen Daten weisen jedoch eher auf korrekt gefaltetes, natives CspB in den „direkten Fusionen“ hin.

### 3.4.3 Natives CspB in den „direkten Fusionen“

Der Nachweis der nativen Struktur von CspB in den „direkten Fusionen“ erfolgte auch hier über die Analyse der Nukleinsäurebindungseigenschaften von CspB. Zwar ließen die Fluoreszenz- und Nah-UV CD-Eigenschaften der direkten Fusionen natives CspB vermuten, dennoch wurde in der Arbeit von S. von Einem eine fünffach schlechtere Nukleinsäurebindung ( $K_D$ ) für 10Ala-

CspB ermittelt (von Einem, 2006). Aus diesem Grund wurden die Analysen wiederholt. Analog 3.3.3 wurde das Bindungsverhalten von fusioniertem und freiem CspB gegenüber dem einzelsträngigen Poly-Thymin-Oligonukleotid dT7 getestet. Die Bindungsisothermen sind in Abbildung 3.16 und die dazugehörigen  $K_D$ -Werte in Tabelle 3.3 dargestellt.



**Abbildung 3.16** dT7-Bindungsisothermen von CspB und den „direkten Fusionen“. CspB in rot; 10Ala-CspB in blau und 17Ala-CspB in grün. Die Messungen wurden in 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 100 mM NaCl; pH 7.5 bei einer Proteinkonzentration von 3  $\mu\text{M}$  und einer Temperatur von 20 °C durchgeführt. Die Anregung erfolgte bei 295 nm. Die Fluoreszenzabnahme wurde bei 352 nm gemessen.

Der nahezu identische Verlauf der Bindungsisothermen von CspB und der Fusionen aus Poly-Alaninen und CspB ist der Beweis für eine vergleichbare Bindung von dT7 durch die Proteine. Dies wird durch die ermittelten Affinitäten bestätigt. Lediglich die Stöchiometrie der Bindung von dT7 zeigt eine geringfügige Abweichung zwischen CspB und den Fusionen aus Poly-Alaninen und CspB. CspB bindet dT7 mit einer Stöchiometrie von ca. 0.86 (dT7 : Protein). Die Fusionen, welche eine Bindungsstöchiometrie von ca. 0.75 besitzen, binden also marginal weniger dT7 pro Molekül. Der Unterschied ist jedoch so gering, dass er keinen Rückschluss auf eine veränderte Struktur im CspB-Molekül in den Fusionen zulässt.

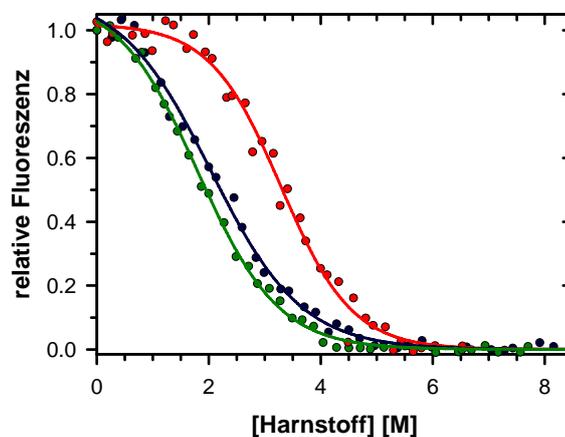
**Tabelle 3.3**  $K_D$ -Werte der dT7 Bindung von CspB und den „direkten Fusionen“

Protein	$K_D$ [nM]
CspB	$23.4 \pm 5.2$
10Ala-CspB	$24.5 \pm 2.3$
17Ala-CspB	$16.5 \pm 3.6$

Die Analyse der Nukleinsäurebindung zusammen mit den Ergebnissen der Fluoreszenz und Nah-UV-CD-Messungen zeigen, dass CspB auch in den Fusionen aus Poly-Alaninen und CspB korrekt gefaltet und nativ vorliegt.

### 3.4.4 Reduzierte thermodynamische Stabilität von CspB in den „direkten Fusionen“

Aus den spektroskopischen Analysen der „direkten Fusionen“ (siehe 3.4.2 und 3.4.3) wird deutlich, dass CspB in den Fusionen nativ vorliegt. Die Untersuchungen erlauben jedoch keine Rückschlüsse auf die thermodynamische Stabilität des Moleküls. Aus diesem Grund wurden chemisch-induzierte Gleichgewichtsübergänge der De- und Renaturierung der Fusionen bestimmt. Als Denaturierungsmittel wurde Harnstoff verwendet. Die Messungen wurden analog 3.3.4 durchgeführt. Die Gleichgewichtsübergänge wurden jedoch nicht in Na-Cacodylat, sondern in 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 100 mM NaCl; pH 7.5 gemessen. Als Referenz wurden die Gleichgewichtsübergänge der De- und Renaturierung von nicht fusioniertem CspB unter identischen Bedingungen bestimmt. In Abbildung 3.17 sind die kooperativen Entfaltungsübergänge von CspB und den „direkten Fusionen“ abgebildet. Tabelle 3.4 zeigt die ermittelten thermodynamischen Parameter der Entfaltungen. Alle Denaturierungen waren reversibel.



**Abbildung 3.17** Chemisch-induzierte Denaturierung von CspB und den „direkten Fusionen“. CspB in rot; 10Ala-CspB in blau und 17Ala-CspB in grün. Die Messungen wurden in 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 100 mM NaCl; pH 7.5 bei einer Proteinkonzentration von 3  $\mu\text{M}$  und einer Temperatur von 25 °C durchgeführt. Die Anregung erfolgte bei 295 nm. Es wurde die Emission bei 345 nm bestimmt.

Aus den Entfaltungsübergängen ist leicht ersichtlich, dass die Fusion mit 10 bzw. 17 Alaninen einen großen Effekt auf die thermodynamische Stabilität von CspB hat. Die thermodynamische Stabilität von CspB wurde durch die Fusionierung um ungefähr 6 kJ/mol verringert.

**Tabelle 3.4** Thermodynamische Parameter der Denaturierung von CspB und den „direkten Fusionen“

Protein	$\Delta G_{H_2O}$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]	$m$ [kJ mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> ]
CspB	12.8 ± 0.8	3.9 ± 0.2
10Ala-CspB	6.2 ± 0.5	3.1 ± 0.2
17Ala-CspB	6.2 ± 0.3	3.4 ± 0.1

Aus den  $\Delta G_{H_2O}$ -Werten geht hervor, dass im nativen Zustand von CspB acht von 1000 Molekülen entfaltet vorliegen. Im Gegensatz dazu besitzen die Fusionen im nativen Zustand neunzig entfaltete Moleküle pro 1000 Proteinen. Die Herabsetzung der thermodynamischen Stabilität in den Fusionen führt also zu einer 11fach höheren Konzentration denaturierter Spezies im nativen Zustand. Diese extreme Veränderung der Stabilität könnte möglicherweise auf das Fehlen einer „Linker-Sequenz“ zwischen CspB und den Poly-Alaninen zurückgeführt werden. Die Ergebnisse der Sekundärstrukturanalyse der „direkten Fusionen“ zeigen, dass eine steigende Zahl an Alaninen im Poly-Alanin-Bereich mit einer zunehmenden Tendenz zur Bildung  $\alpha$ -helikaler Strukturen einhergeht. Vermutlich werden die aliphatischen Methylgruppen der Alanine Wechselwirkungen miteinander eingehen, um sich gegenüber dem polaren wässrigen Lösungsmittel abzuschirmen. Eine solche Strukturbildung könnte, auf Grund der direkten Nachbarschaft von Poly-Alaninen und CspB, zur vermehrten Entfaltung (Destabilisierung) von CspB führen. Die für CspB ermittelten thermodynamischen Parameter entsprechen den aus der Literatur bekannten Daten (Schindler *et al.*, 1995).

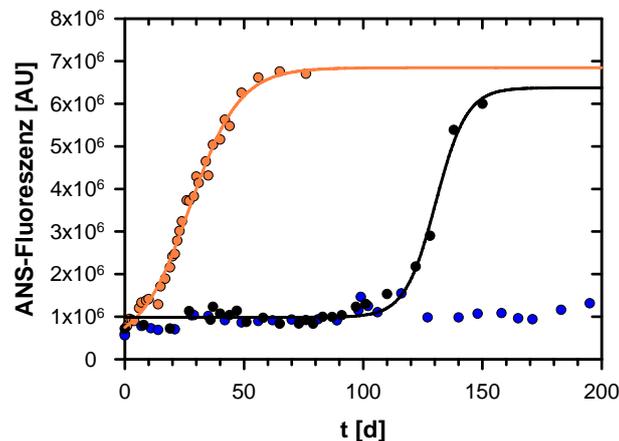
### 3.5 Fibrillenbildung der Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB

#### 3.5.1 Poly-alanin-abhängige Fibrillenbildung der Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB

Die Inkubation der N-terminalen Domänen von PABPN1 im niedrigen millimolaren Konzentrationsbereich und bei einer Temperatur von 37 °C führt innerhalb weniger Wochen zur Bildung amyloider Strukturen. Die Fibrillenbildung ist abhängig von der Anwesenheit des Poly-Alanin-Segmentes. So konnte eine Fibrillenbildung für die Varianten N-(+7)Ala und N-WT, jedoch nicht für die Variante N- $\Delta$ Ala, welche kein Poly-Alanin-Segment besitzt, beobachtet werden. Die Variante mit dem längeren Poly-Alanin-Segment (N-(+7)Ala) zeigte gegenüber der Wildtypvariante (N-WT) eine beschleunigte Fibrillenbildung (Scheuermann, 2003; Scheuermann *et*

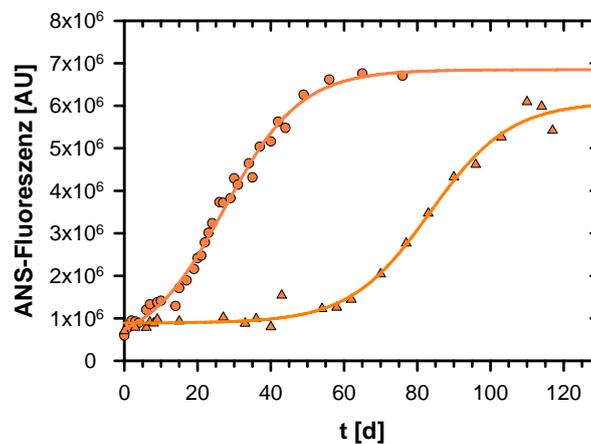
*al.*, 2003; Lodderstedt *et al.*, 2007). Da die N-terminalen Domänen von PABPN1 jedoch keine tertiären Kontakte besitzen (Scheuermann, 2003; Lodderstedt *et al.*, 2008) und die Analyse und Handhabung des Voll-Längen-PABPN1, aufgrund seiner Tendenz zur Aggregatbildung, schwierig ist (Scheuermann, 2003), konnte der Einfluss einer gefalteten Domäne auf die Fibrillenbildung bisher nicht analysiert werden. Die Fusion der N-terminalen Domänen von PABPN1 mit CspB sollte jedoch nun die Analyse des Einflusses eines gefalteten Proteins auf die Fibrillenbildung erlauben.

Die Fusionen wurden bei einer Konzentration von 0.3 mM für mehrere Wochen bei 37 °C inkubiert. Die Fibrillenbildung wurde mittels ANS-Fluoreszenz-Messungen verfolgt. Der Fluoreszenzfarbstoff ANS ist in der Lage über seine Anilinonaphthalengruppe hydrophobe Bereiche von Proteinen zu binden. Die Bindung erzeugt eine Änderung der Fluoreszenzeigenschaften von ANS. Daher wird die ANS-Fluoreszenz bei der Detektion von Konformationsänderungen mit resultierenden exponierten hydrophoben Bereichen (Semisotnov *et al.*, 1991), aber auch der Analyse amyloider Strukturen (Kayed *et al.*, 1999; Baskakov *et al.*, 2002) genutzt. Es konnte gezeigt werden, dass ANS besonders für die Detektion poly-alanin-induzierter amyloider Strukturen geeignet ist (Scheuermann *et al.*, 2003; Shinchuk *et al.*, 2005). Die Existenz fibrillärer Strukturen wurde durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt. In Abbildung 3.18 ist exemplarisch die Fibrillierungskinetik der drei Fusionen der N-terminalen Domänen und CspB dargestellt.



**Abbildung 3.18 Fibrillierungskinetik der Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB, bestimmt über ANS-Fluoreszenz.** N- $\Delta$ Ala-CspB in blau; N-WT-CspB in schwarz und N-(+7)Ala-CspB in orange. Die Proteine wurden bei einer Konzentration von 0.3 mM und einer Temperatur von 37 °C in 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 100 mM NaCl; 0.1 % (w/v)  $\text{NaN}_3$ ; pH 7.5 inkubiert. Die ANS-Fluoreszenz wurde wie unter 2.4.5 beschrieben bestimmt. Die Auswertung erfolgte bei einer Emissionswellenlänge von 480 nm. Der Kurvenverlauf ist das Ergebnis einer sigmoiden Anpassung mit dem Programm SigmaPlot 8.0.

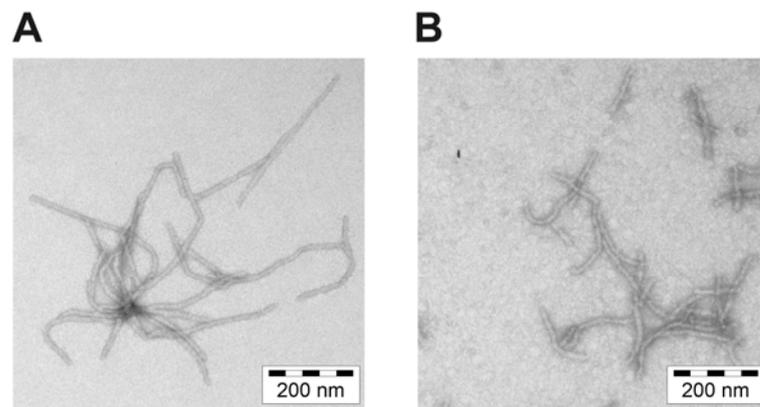
Ähnlich dem Fibrillierungsverhalten der N-terminalen Domänen von PABPN1 konnte für die Fusionen mit CspB ein von der Anwesenheit des Poly-Alanin-Segmentes abhängiges Fibrillierungsverhalten gezeigt werden. So konnte die Bildung von Fibrillen für die Varianten N-(+7)Ala-CspB und N-WT-CspB, jedoch nicht für N- $\Delta$ Ala-CspB nachgewiesen werden. Die Kinetik zeigt den für die Bildung amyloider Strukturen typischen sigmoiden Verlauf, der einen nukleationsabhängigen Prozess widerspiegelt (Harper & Lansbury, 1997). Besonderes Augenmerk gilt der *Lag*-Phase der Kinetik. Sie repräsentiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Fibrillierung, die Fibrillen- oder Nukleationskeimbildung. Analog der Fibrillenbildung der N-terminalen Domänen von PABPN1 scheint die Länge der *Lag*-Phase, und damit die Geschwindigkeit der Fibrillenkeimbildung, auch hier abhängig von der Länge des Poly-Alanin-Bereiches zu sein. So ist offensichtlich die Fibrillenbildung von N-(+7)Ala-CspB durch eine kürzere *Lag*-Phase gekennzeichnet als die von N-WT-CspB. Jedoch wurden auch Schwankungen in den Fibrillierungskinetiken der Fusionen, genauer in der Länge der *Lag*-Phasen, in Abhängigkeit von der Proteinpräparation beobachtet. Unter gleichen Bedingungen zeigten die *Lag*-Phasen der Fibrillenbildung von N-(+7)Ala-CspB, in Abhängigkeit von der Proteinpräparation, erhebliche Variationen. Ein Beispiel für eine derartig variierende Fibrillierungskinetik ist in Abbildung 3.19 gezeigt.



**Abbildung 3.19 Fibrillierungskinetik von N-(+7)Ala-CspB aus verschiedenen Proteinpräparationen bestimmt durch ANS-Fluoreszenz.** N-(+7)Ala-CspB aus einer Präparation gekennzeichnet durch Kreise und aus einer anderen Präparation gekennzeichnet durch Dreiecke. Es gelten die gleichen Bedingungen wie unter Abbildung 3.18. Der Kurvenverlauf ist das Ergebnis einer sigmoiden Anpassung mit dem Programm SigmaPlot 8.0.

Für diese Schwankungen konnte keine Erklärung gefunden werden. Die Proteine der verschiedenen Präparationen wiesen keine Unterschiede bezüglich ihrer spektroskopischen (CD, Fluoreszenz) oder strukturellen Eigenschaften (dT7-Bindung) auf. Auch eine Ultrazentrifugation vor der Inkubation der Proteine, zum Zweck der Eliminierung möglicher Fibrillierungskeime oder

deren Vorstufen, führte nicht zu einer verbesserten Reproduzierbarkeit der Fibrillierungskinetik. Wie oben bereits erwähnt, ist die Fibrillenbildung ein stochastischer Prozess, deren Kinetik von der Bildung eines Nukleationskeims abhängt. Die Bildung eines solchen Keims wird vermutlich durch eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren wie bspw. Dauer der Präparation, Chemikalienreinheit, mechanische Einflüsse (Rühren) beeinflusst. So ist es vorstellbar, dass während der Präparationen in Abhängigkeit dieser Faktoren sehr geringe, aber offensichtlich effiziente Mengen „fibrillierungskompetenter“ Spezies gebildet werden. Diese Spezies konnten durch die angewandten Methoden nicht detektiert oder beseitigt werden. Die Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Fibrillenbildung von der jeweiligen Proteinpräparation wurde auch für andere amyloide Proteine beschrieben (Harper & Lansbury, 1997; Dong *et al.*, 2007). Aus diesem Grund wurde auf eine nähere Analyse der Unterschiede zwischen den Kinetiken der Fibrillenbildung der Fusionen der N-terminalen Domänen und CspB verzichtet. Die aus den Proteinen N-(+7)Ala-CspB und N-WT-CspB gebildeten Fibrillen wurden durch Elektronenmikroskopie nachgewiesen (siehe Abbildung 3.20).

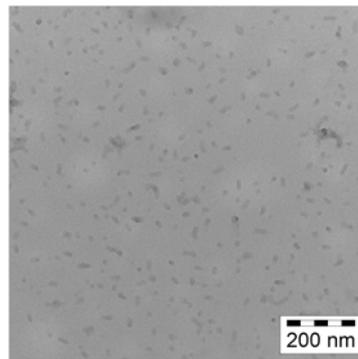


**Abbildung 3.20 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von (A) N-(+7)Ala-CspB- und (B) N-WT-CspB-Fibrillen.** Die Proteine wurden in 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 100 mM NaCl; 0.1 % (w/v)  $\text{NaN}_3$ ; pH 7.5 bei einer Konzentration von 0.3 mM und einer Temperatur von 37 °C inkubiert. Die Präparation der *Grids* erfolgte nach 103 Tagen Inkubation bei einer Proteinkonzentration von 0.8 mg/ml (A) und 137 Tagen und einer Konzentration von 1.3 mg/ml (B). Die Aufnahmen entstanden bei einer Vergrößerung von  $5 \times 10^4$ .

Die Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB und N-WT-CspB zeigen eine fadenförmige, unverzweigte Morphologie mit einem Fibrillendurchmesser von ungefähr 10-15 nm.

### 3.5.2 Beschleunigte Fibrillenbildung der Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 nach Zugabe homologer *Seeds*

Wie bereits erwähnt, ist die Fibrillenkeimbildung, repräsentiert durch die *Lag-Phase* der amyloidtypischen sigmoiden Fibrillierungskinetik, der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Fibrillenbildung. (Harper & Lansbury, 1997). Die Fibrillenkeimbildung kann durch die Zugabe fragmentierter Fibrillen umgangen werden. Dies äußert sich in einer Verkürzung bzw. Eliminierung der *Lag-Phase* (Harper & Lansbury, 1997; Westermark, 2005). Eine Fibrillierung unter Zugabe von Fibrillenfragmenten wird auch als *Seeding* bezeichnet. Wird das lösliche Protein mit fragmentierten Fibrillen des gleichen Proteins versehen, spricht man von einem homologen *Seeding*. Werden Fibrillen eines anderen Proteins verwendet, so wird dies als heterologes- oder auch *Cross-Seeding* bezeichnet (O'Nuallain *et al.*, 2004; Westermark, 2005). *Seeds* sollten jedoch nicht mit den sich spontan bildenden Fibrillierungs- oder Nukleationskeimen verwechselt werden. Bisher ist nicht klar, inwieweit sich Nukleationskeim und Fibrille (*Seed*) strukturell ähneln. Abbildung 3.21 zeigt exemplarisch eine elektronenmikroskopische Aufnahme von *Seeds* der Fibrillen des N-(+7)Ala-CspB-Proteins.

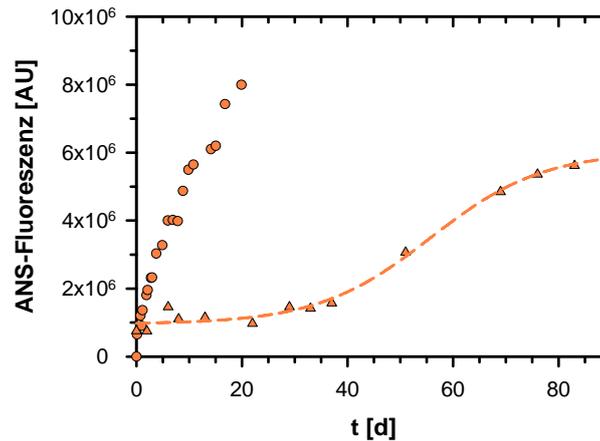


**Abbildung 3.21 Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Seeds* aus Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB.** Die Fibrillenbildung fand in 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 100 mM NaCl; 0.1 % (w/v)  $\text{NaN}_3$ ; pH 7.5 bei einer Konzentration von 0.8 mM und einer Temperatur von 37 °C statt. Die *Seed*-Präparation erfolgte nach 185 Tagen Inkubation gemäß 2.5.2. Die Aufnahmen entstanden bei einer Vergrößerung von  $5 \times 10^4$ .

Um den Einfluss homologer *Seeds* auf das Fibrillierungsverhalten von N-(+7)Ala-CspB zu untersuchen, wurden Fibrillen mittels Ultraschall fragmentiert und präpariert (siehe 2.5.2). Anschließend wurden die *Seeds* dem Fibrillierungsansatz zugesetzt. Es erfolgte eine mehrwöchige Inkubation. Die mittels ANS-Fluoreszenz aufgezeichnete Kinetik der Fibrillenbildungen ist in Abbildung 3.22 gezeigt.

Auch bei N-(+7)Ala-CspB ist nach Zugabe homologer *Seeds* eine Abhängigkeit der Fibrillierungskinetik von der Proteinpräparation erkennbar. So führte unter identischen Bedingungen die Zugabe von *Seeds* zum Protein einer Präparation zur kompletten Eliminierung der *Lag-Phase*

der Kinetik, während die Zugabe der gleichen Menge an *Seeds* zum Protein einer anderen Präparation lediglich zur Verkürzung der *Lag*-Phase führte. Hierbei muss jedoch auch der Einfluss der *Seed*-Präparation berücksichtigt werden. Die gleiche Massenkonzentration an *Seeds* aus zwei unterschiedlichen Präparationen entspricht höchstwahrscheinlich nicht einer identischen Anzahl fragmentierter Fibrillen. Die Anzahl fragmentierter Fibrillen („aktiver Enden“) sollte beim Prozess des *Seedings* jedoch die entscheidende Größe sein.



**Abbildung 3.22 Kinetik der Fibrillenbildung von N-(+7)Ala-CspB aus verschiedenen Proteinpräparationen nach Zugabe homologer *Seeds*.** N-(+7)Ala-CspB aus einer Präparation gekennzeichnet durch Kreise und aus einer anderen Präparation gekennzeichnet durch Dreiecke. Die Proteine wurden bei einer Konzentration von 0.3 mM und einer Temperatur von 37 °C in 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 100 mM NaCl; 0.1 % (w/v) NaN<sub>3</sub>; pH 7.5 inkubiert. Die Konzentration an *Seeds* betrug 0.03 % (w/v). Die ANS-Fluoreszenz wurde wie unter 2.4.5 beschrieben bestimmt. Der Kurvenverlauf ist das Ergebnis einer sigmoiden Anpassung mit dem Programm SigmaPlot 8.0.

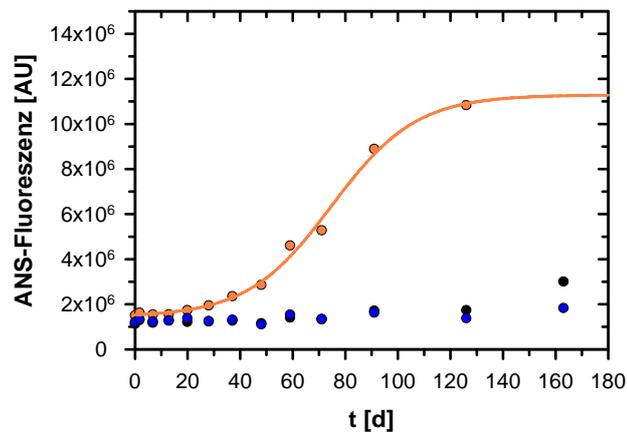
Aufgrund der langen Fibrillierungszeiten und geringen Konzentration an Fibrillen von N-WT-CspB wurde auf eine Analyse der Fibrillenbildung dieser Fusion nach Zugabe homologer *Seeds* verzichtet.

### 3.5.3 Fibrillenbildung der Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 nach Zugabe heterologer *Seeds*

Die Grundlage für ein funktionierendes heterologes *Seeding* liegt vermutlich in einer identischen oder sehr ähnlichen Struktur im Bereich des  $\beta$ -Faltblatts der Fibrillen beider Proteine (O’Nuallain *et al.*, 2004). So konnte beispielsweise ein *Cross-Seeding* zwischen den N-terminalen Domänen N-(+7)Ala und N-WT nachgewiesen werden (Lodderstedt *et al.*, 2007). Eine Analyse der Fibrillenbildung der Varianten N-WT- und N- $\Delta$ Ala-CspB nach Zugabe von *Seeds* von N-(+7)Ala-CspB könnte einen weiteren Beweis für eine poly-alanin-induzierte Fibrillenbildung der Fusionen liefern. Sollte ein heterologes *Seeding* zwischen N-(+7)Ala- und N-

WT-CspB möglich und zwischen N-(+7)Ala-CspB und N- $\Delta$ Ala-CspB jedoch unmöglich sein, würde dies die Annahme einer poly-alanin-induzierten Fibrillenbildung der Fusionen stützen.

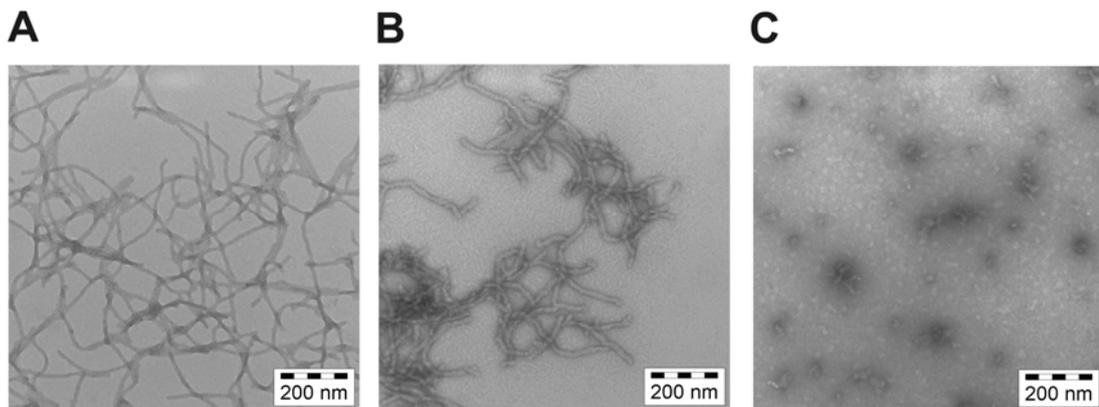
Um eine Fibrillenbildung der Varianten N-WT-CspB und N- $\Delta$ Ala-CspB nach Zugabe heterologer *Seeds* von N-(+7)Ala-CspB nachzuweisen, wurden die Fusionen mit fragmentierten Fibrillen des N-(+7)Ala-CspB-Proteins versehen und mehrere Wochen bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde N-(+7)Ala-CspB mit homologen *Seeds* versetzt. In Abbildung 3.23 ist die mittels ANS-Fluoreszenz aufgezeichnete Kinetik der Fibrillenbildungen gezeigt.



**Abbildung 3.23 Fibrillenbildung der Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB nach Zugabe von *Seeds* von N-(+7)Ala-CspB.** N- $\Delta$ Ala-CspB in blau; N-WT-CspB in schwarz und N-(+7)Ala-CspB in orange. Die Proteine wurden bei einer Konzentration von 0.3 mM und einer Temperatur von 37 °C in 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 100 mM NaCl; 0.1 % (w/v) NaN<sub>3</sub>; pH 7.5 inkubiert. Die Konzentration an *Seeds* betrug 0.04 % (w/v). Die ANS-Fluoreszenz wurde wie unter 2.4.5 beschrieben bestimmt. Die Auswertung erfolgte bei einer Emissionswellenlänge von 480 nm. Der Kurvenverlauf ist das Ergebnis einer sigmoiden Anpassung mit dem Programm SigmaPlot 8.0.

Nach Zugabe von *Seeds* von N-(+7)Ala-CspB konnte lediglich für N-(+7)Ala-CspB eine beschleunigte Fibrillenbildung nachgewiesen werden. Die Länge der *Lag*-Phase konnte von ca. 60 Tagen auf ungefähr 25 Tage reduziert werden. Dies bestätigt die Ergebnisse aus 3.5.2 und beweist damit die Existenz von *Seeds* von N-(+7)Ala-CspB in den Reaktionsansätzen. Für die Variante N-WT-CspB konnte kein beschleunigtes Fibrillierungsverhalten gezeigt werden. N- $\Delta$ Ala-CspB konnte, wie erwartet, auch durch Zugabe von *Seeds* nicht zur Fibrillierung angeregt werden. Die Ergebnisse deuten an, dass ein *Cross-Seeding* zwischen den Varianten der Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB nicht möglich ist. Diese Annahme konnte durch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen (siehe Abbildung 3.24) nicht vollständig bestätigt werden. Nach ca. 200 Tagen Inkubation waren fibrilläre Strukturen für N-(+7)Ala- und N-WT-CspB, jedoch nicht für N- $\Delta$ Ala-CspB detektierbar. Die Aufnahmen von N- $\Delta$ Ala-CspB sind durch punktförmige Strukturen gekennzeichnet, welche vermutlich auf die

eingesetzten *Seeds* zurückzuführen sind. Die Tatsache, dass die Aufnahmen von N-WT-CspB derartige Strukturen nicht zeigen, Fibrillen jedoch sichtbar sind, bedeutet, dass die *Seeds* von N-(+7)Ala-CspB möglicherweise doch an der Fibrillenbildung von N-WT-CspB beteiligt waren. Dies widerspricht der aus den Fibrillierungskinetiken gezogenen Schlussfolgerung eines nicht funktionierenden *Cross-Seedings* zwischen N-(+7)Ala- und N-WT-CspB.



**Abbildung 3.24** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Fibrillierungen von (A) N-(+7)Ala-, (B) N-WT- und (C) N-ΔAla-CspB nach Zugabe von *Seeds* von N-(+7)Ala-CspB. Die Proteine wurden bei einer Konzentration von 0.3 mM und einer Temperatur von 37 °C in 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 100 mM NaCl; 0.1 % (w/v) NaN<sub>3</sub>; pH 7.5 inkubiert. Die Konzentration an *Seeds* betrug 0.04 % (w/v). Die Präparation der *Grids* erfolgte nach 198 Tagen Inkubation bei einer Proteinkonzentration von ca. 1.2 mg/ml. Die Aufnahmen entstanden bei einer Vergrößerung von  $5 \times 10^4$ .

Es konnte gezeigt werden, dass N-ΔAla-CspB auch durch die Zugabe von Fibrillen des N-(+7)Ala-CspB-Proteins nicht zur Fibrillenbildung angeregt werden kann. Dies unterstreicht die Annahme einer poly-alanin-induzierten Fibrillenbildung für die Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB.

## 3.6 Fibrillenbildung der „direkten Fusionen“

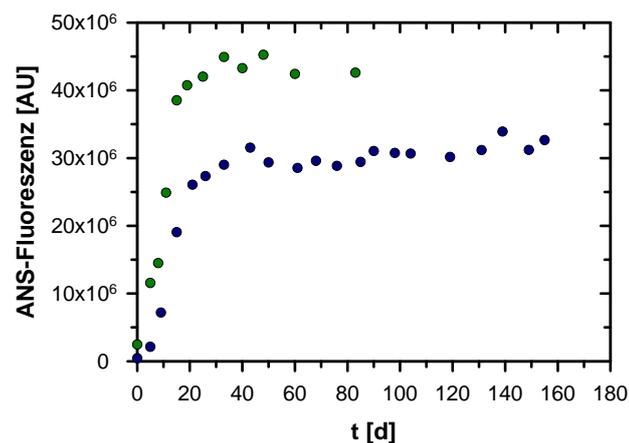
### 3.6.1 Fibrillenbildung der „direkten Fusionen“ ohne Zugabe von *Seeds*

Die Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB zeigen, ähnlich der unfusionierten N-terminalen Domänen, eine von der Anwesenheit des Poly-Alanin-Segementes abhängige Fibrillenbildung (siehe 3.5). Die Ergebnisse belegen, dass durch die Verknüpfung des amyloidogenen Fragments der N-terminalen Domäne von PABPN1 mit dem stabil gefalteten Protein CspB, die amyloidogenen Eigenschaften auf das gesamte Fusionskonstrukt übertragen wurden. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits mit anderen amyloidogenen Proteinen nachgewiesen

(Baxa *et al.*, 2003; Kim & Hecht, 2005; Ignatova *et al.*, 2007). Die Ergebnisse zeigen jedoch nicht, ob die gesamte N-terminale Domäne von PABPN1 für die Fibrillenbildung der Fusion essentiell ist. Da die Fibrillenbildung von poly-alanin-basierten Peptiden bereits beschrieben wurde (Blondelle *et al.*, 1997; Shinchuk *et al.*, 2005), stellte sich die Frage, ob die direkte Verknüpfung einer Poly-Alanin-Sequenz mit CspB ebenfalls zur Fibrillenbildung der Fusion führt. Die hier verwendeten „direkten Fusionen“ wurden, ausgehend von N-(+7)Ala- und N-WT-CspB, mit 17Ala- bzw. 10Ala-CspB bezeichnet.

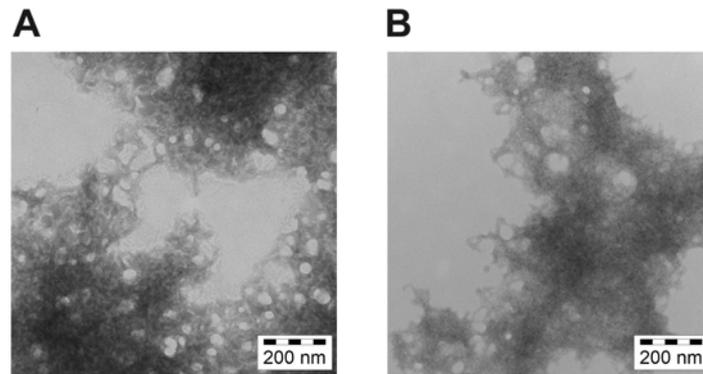
Um das Fibrillierungsverhalten der Fusionen aus Poly-Alaninen und CspB zu analysieren, erfolgte, analog der Behandlung der Fusionen der N-terminalen Domänen und CspB, eine mehrwöchige Inkubation der Proteine bei geringen millimolaren Konzentrationen und einer Temperatur von 37 °C. In Abbildung 3.25 ist die entsprechende mittels ANS-Fluoreszenz aufgezeichnete Kinetik gezeigt.

Die Inkubation der Fusionen unter den angegebenen Bedingungen führte sowohl für 17Ala- als auch für 10Ala-CspB zu einem sofortigen Anstieg der ANS-Fluoreszenz. Eine mehrwöchige *Lag*-Phase war für beide Proteine nicht zu beobachten. Bereits nach 2-3 Wochen erreichte die ANS-Fluoreszenz beider Proteine ein Plateau. Der Wert des ANS-Fluoreszenzsignals im Plateaus war im Vergleich zur Kinetik der Fusionen der N-terminalen Domänen und CspB um den Faktor 3-4 höher. Trotz der geringeren Proteinkonzentration führte die Inkubation des 17Ala-CspB-Proteins zu einem schnelleren Anstieg der ANS-Fluoreszenz als die Inkubation von 10Ala-CspB.



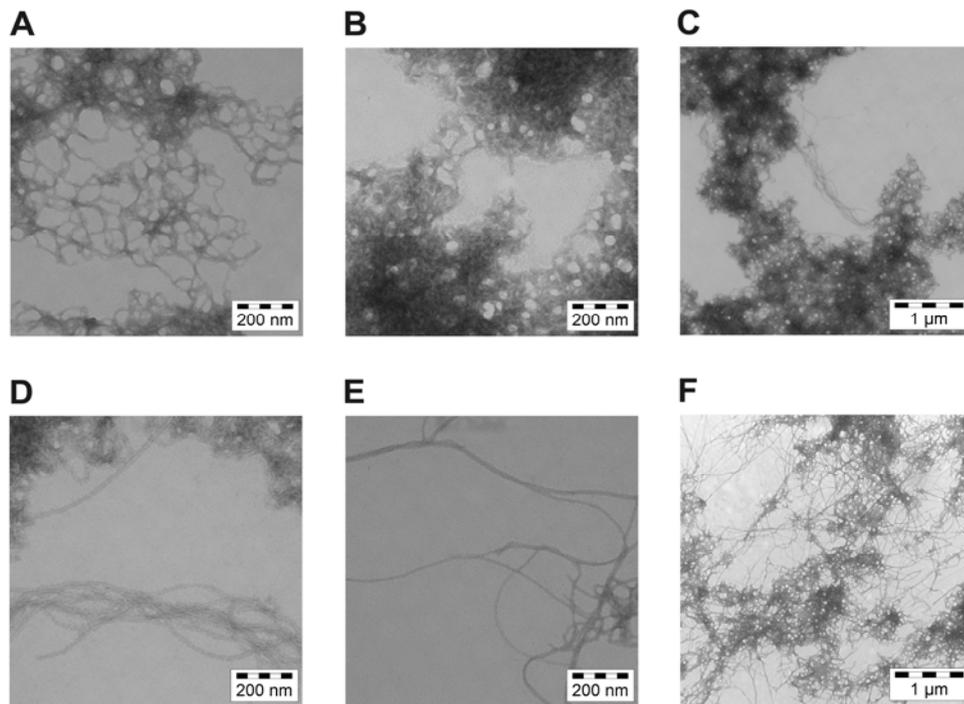
**Abbildung 3.25** ANS-Fluoreszenz der „direkten Fusionen“. 10Ala-CspB in blau und 17Ala-CspB in grün. Die Proteine wurden bei einer Konzentration von 0.7 mM für 10Ala-CspB und 0.2 mM für 17Ala-CspB und einer Temperatur von 37 °C in 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 100 mM NaCl; 0.1 % (w/v)  $\text{NaN}_3$ ; pH 7.5 inkubiert. Die ANS-Fluoreszenz wurde wie unter 2.4.5 beschrieben bestimmt. Die Auswertung erfolgte bei einer Emissionswellenlänge von 480 nm.

Der schnelle Anstieg der ANS-Fluoreszenz lässt eine rasche, von der Zahl der Poly-Alanine abhängige Fibrillenbildung der „direkten Fusionen“ vermuten. Jedoch zeigten elektronenmikroskopische Aufnahmen der Proben, durchgeführt nach einer Inkubationszeit von 35 Tagen, lediglich die Existenz von amorphen Strukturen (siehe Abbildung 3.26).



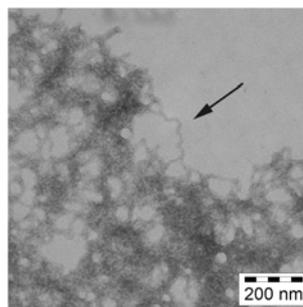
**Abbildung 3.26 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von (A) 10Ala- und (B) 17Ala-CspB nach 35 Tagen Inkubation.** Die Proteine wurden wie unter Abbildung 3.25 beschrieben inkubiert. Die Präparation der Grids erfolgte bei 1.8 mg/ml (10Ala-CspB) und 0.5 mg/ml (17Ala-CspB). Die Aufnahmen entstanden bei Vergrößerung von  $5 \times 10^4$ .

Offensichtlich wurde die ANS-Fluoreszenz durch die Bildung dieser Strukturen dominiert. Hier wird der Nachteil der Detektion poly-alanin-basierter amyloider Strukturen durch ANS deutlich. Vermittelt durch die Eigenschaft der Interaktion mit hydrophoben Proteinbereichen detektiert ANS nicht ausschließlich amyloide Strukturen, sondern verschiedene Faltungs- und Missfaltungszustände von Proteinen. Erst eine verlängerte Inkubation der Fusionen führte zur Entstehung fibrillärer Strukturen von 10Ala-CspB. Der Verlauf der Entstehung der Fibrillen ist in Abbildung 3.27 gezeigt. Nach einer Inkubationszeit von ca. 50 Tagen waren erste fibrilläre Strukturen zwischen den amorphen Zusammenlagerungen von 10Ala-CspB zu beobachten. Im weiteren Verlauf nahm die Menge und Länge der amyloiden Strukturen zu. Jedoch waren während des gesamten Prozesses auch amorphe Strukturen sichtbar. Eine Quantifizierung dieser amorphen Strukturen war nicht möglich. Die Intensität des ANS-Fluoreszenzsignals änderte sich während der Entstehung der fibrillären Strukturen überraschenderweise nicht, sondern blieb konstant. Dies könnte implizieren, dass die Bildung der Fibrillen direkt aus den amorphen Strukturen erfolgte. Eindeutige Hinweise dafür konnten bisher jedoch nicht gefunden werden. Die gebildeten Fibrillen hatten eine fadenförmige Morphologie und einen Durchmesser von ca. 8-12 nm. Sie scheinen damit einen geringfügig kleineren Durchmesser als die Fibrillen der Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB zu besitzen. Die Fibrillen zeigten außerdem eine Tendenz zur Zusammenlagerung und fadenförmigen Verflechtung (siehe Abbildung 3.27 D, E).



**Abbildung 3.27** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von 10Ala-CspB nach (A) 16, (B) 35, (C) und (D) 50, (E) 77 und (F) 155 Tagen Inkubation. Die Inkubation erfolgte wie unter Abbildung 3.25 beschrieben. Die Präparation der *Grids* erfolgte bei einer Proteinkonzentration von 1.8 mg/ml. Die Aufnahmen (A), (B), (D) und (F) entstanden bei einer Vergrößerung von  $5 \times 10^4$  und die Aufnahmen (C) und (F) von  $1.2 \times 10^4$ .

Im Gegensatz zur Inkubation von 10Ala-CspB konnten für 17Ala-CspB unter variierenden Bedingungen (verschiedene Protein-, NaCl-Konzentrationen, Temperaturen) zu keinem Zeitpunkt eindeutige fibrilläre Strukturen detektiert werden. In einigen Fällen konnten allerdings am Rand der amorphen Zusammenlagerungen fibrillenartige, verdrehte Strukturen beobachtet werden (siehe Abbildung 3.28). Aufgrund der im Verhältnis zu den amorphen Strukturen vergleichsweise geringen Zahl an fibrillären Strukturen blieben sie jedoch unberücksichtigt.



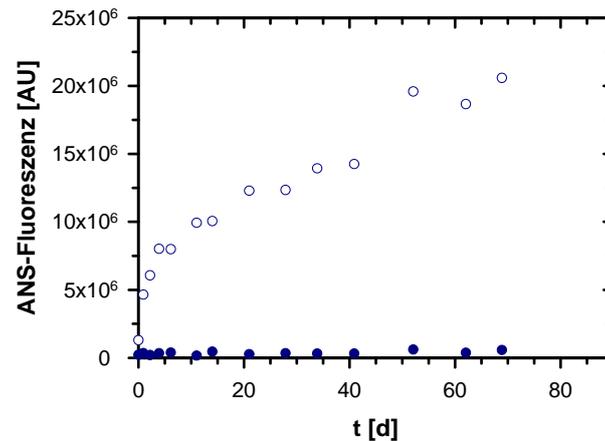
**Abbildung 3.28** Elektronenmikroskopische Aufnahme von 17Ala-CspB nach 77 Tagen Inkubation. Das Protein wurde bei einer Konzentration von 0.5 mM und einer Temperatur von 30°C in 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 100 mM NaCl; 0.1 % (w/v)  $\text{NaN}_3$ ; pH 7.5 inkubiert. Die Präparation der *Grids* erfolgte bei einer Proteinkonzentration von 2.7 mg/ml. Die Aufnahmen entstanden bei einer Vergrößerung von  $5 \times 10^4$ .

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Fibrillenbildung für 10Ala-, jedoch nicht zweifelsfrei für 17Ala-CspB gezeigt werden konnte. Der Fibrillenbildung von 10Ala-CspB ging allerdings eine amorphe Zusammenlagerung des Proteins voraus. Inwieweit die amorphen Strukturen im Zusammenhang mit der Fibrillenbildung stehen oder lediglich eine unabhängige Begleiterscheinung sind, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Die Bildung der amorphen Zusammenlagerung ist vermutlich auf die geringe thermodynamische Stabilität der Fusionen aus Poly-Alaninen und CspB zurückzuführen (siehe 3.4.4). Unter den gegebenen Bedingungen wird eine nicht unerhebliche Konzentration der Fusionen im entfalteten Zustand vorliegen. Da Alanine einen aliphatischen Charakter besitzen, werden sie in einer Poly-Alanin-Sequenz die Tendenz zur Zusammenlagerung und Abschirmung gegenüber einem wässrigen Lösungsmittel aufweisen. Je länger das Poly-Alanin-Segment ist, desto höher wird diese Tendenz sein. Dies würde erklären, warum bei 17Ala-CspB, bei gleicher thermodynamischer Stabilität wie für 10Ala-CspB, früher amorphe Strukturen auftraten.

Zur Kontrolle inkubiertes CspB zeigte bei einer Konzentration von 0.5 mM bis zu 130 Tagen Inkubation weder einen Anstieg in der ANS-Fluoreszenz noch elektronenmikroskopisch nachweisbare Strukturen (hier nicht gezeigt).

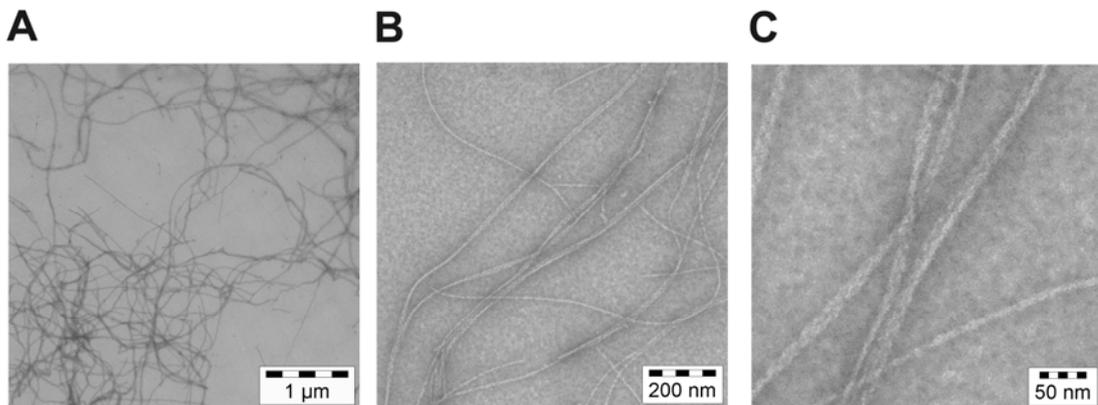
### **3.6.2 Vermeidung von Aggregaten bei der Fibrillenbildung von 10Ala-CspB durch Zugabe homologer *Seeds***

Die Induktion der Fibrillenbildung von 10Ala-CspB durch die Zugabe homologer *Seeds* sollte den amyloiden Charakter der beobachteten fibrillären Strukturen bestätigen. Aus diesem Grund wurde ein für mehrere Monate inkubierter Ansatz von 10Ala-CspB mit nachweislich vorhandenen Fibrillen zur Präparation von *Seeds* genutzt. Die *Seeds* wurden dem monomeren Protein zugesetzt. Es erfolgte eine mehrwöchige Inkubation bei 37 °C. Um eine Überlagerung der Fibrillierung durch die Bildung amorpher Strukturen zu verhindern, wurde eine veränderte Konzentration an NaCl (250 mM) genutzt. Aus vorangegangenen Experimenten war bekannt, dass diese Salzkonzentration die Bildung amorpher Strukturen verzögert. In Abbildung 3.29 ist die ANS-Fluoreszenz von in An- und Abwesenheit homologer *Seeds* inkubierten 10Ala-CspB gezeigt. Es ist klar ersichtlich, dass die Zugabe von homologen *Seeds* in einem raschen Anstieg des Signals der ANS-Fluoreszenz resultiert. Ein derartiger Anstieg ist bei dem Ansatz ohne *Seeds* nicht zu erkennen. Die Zunahme der ANS-Fluoreszenz deutet eine Induktion der Fibrillenbildung von 10Ala-CspB durch die Zugabe homologer *Seeds* an. Elektronenmikroskopische Aufnahmen stützen die Annahme einer durch *Seeds* induzierten Fibrillenbildung von 10Ala-CspB (siehe Abbildung 3.30). Die Abbildungen zeigen gleichmäßige fibrilläre Strukturen ohne sichtbare amorphe Zusammenlagerungen.



**Abbildung 3.29 ANS-Fluoreszenz des inkubierten 10Ala-CspB-Proteins in An- und Abwesenheit homologer Seeds.** Das Protein wurde bei einer Konzentration von 0.5 mM mit (offene Kreise) und ohne (geschlossene Kreise) Zugabe homologer *Seeds* in 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 250 mM NaCl; 0.1 % (w/v) NaN<sub>3</sub>; pH 7.5 bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert. Die Konzentration an *Seeds* betrug 0.1 % (w/v). Die ANS-Fluoreszenz wurde wie unter 2.4.5 beschrieben bestimmt. Die Auswertung erfolgte bei einer Emissionswellenlänge von 480 nm.

Die Abwesenheit amorpher Strukturen in den Ansätzen zeigt, dass die Fibrillenbildung von 10Ala-CspB nicht notwendigerweise mit der Bildung solcher Strukturen einhergehen muss. Die Zugabe fragmentierter, homologer Fibrillen reicht offensichtlich aus, um eine Fibrillenbildung von 10Ala-CspB zu induzieren.

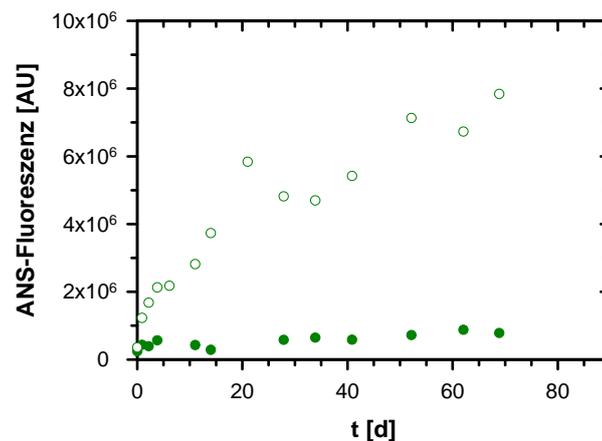


**Abbildung 3.30 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von 10Ala-CspB inkubiert nach Zugabe homologer Seeds in einer Vergrößerung von (A)  $1.2 \times 10^4$ , (B)  $5 \times 10^4$  und (C)  $14 \times 10^4$ .** Die Inkubation des Proteins erfolgte unter den unter Abbildung 3.29 genannten Bedingungen. Die Präparation der *Grids* erfolgte bei einer Proteinkonzentration von 2.6 mg/ml nach 68 Tagen Inkubation.

### 3.6.3 Induktion amorpher Aggregate von 17Ala-CspB durch heterologe *Seeds* von 10Ala-CspB

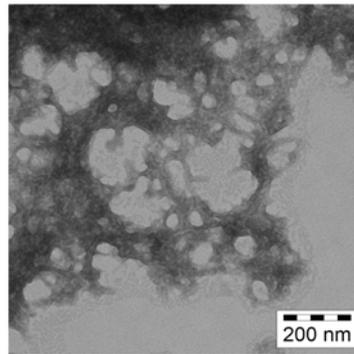
Für das Fusionsprotein 17Ala-CspB konnte unter variierenden Bedingungen ohne die Zugabe von *Seeds* keine eindeutige Fibrillenbildung gezeigt werden. Die Inkubation der Fusion führte lediglich zur Bildung amorpher Zusammenlagerungen mit teilweise angrenzenden fibrillären Strukturen (siehe 3.6.1). Da jedoch für 10Ala-CspB eine poly-alanin-induzierte Fibrillenbildung gezeigt werden konnte, wurde die Möglichkeit der Induktion der Fibrillenbildung von 17Ala-CspB durch die Zugabe heterologer *Seeds* von 10Ala-CspB getestet.

Die Durchführung des Experiments erfolgte analog der Analyse der Fibrillenbildung von 10Ala-CspB nach Zugabe homologer *Seeds* (siehe 3.6.2). Allerdings wurde die Inkubation, zum Zweck der Unterdrückung amorpher Strukturen, bei einer Temperatur von 30 °C und einer geringeren Proteinkonzentration durchgeführt. In Abbildung 3.31 ist die zeitabhängige ANS-Fluoreszenz von 17Ala-CspB in An- und Abwesenheit heterologer *Seeds* von 10Ala-CspB gezeigt.



**Abbildung 3.31 ANS-Fluoreszenz des inkubierten 17Ala-CspB-Proteins in An- und Abwesenheit von 10Ala-CspB-*Seeds*.** Das Protein wurde bei einer Konzentration von 0.4 mM mit (offene Kreise) und ohne (geschlossene Kreise) Zugabe von *Seeds* bei einer Temperatur von 30 °C inkubiert. Die Konzentration an *Seeds* betrug 0.1 % (w/v). Es gelten die Bedingungen von Abbildung 3.29.

Ähnlich des homologen *Seedings* von 10Ala-CspB führte die Zugabe von fragmentierten Fibrillen von 10Ala-CspB zum 17Ala-CspB-Protein, im Vergleich zum Ansatz ohne *Seeds*, zu einem raschen Anstieg der ANS-Fluoreszenz. Trotz des geringeren Anstieges der ANS-Fluoreszenz als im Fall des homologen *Seedings*, könnte eine Induktion der Fibrillenbildung von 17Ala-CspB durch die Zugabe heterologer *Seeds* vermutet werden. Jedoch zeigt die elektronenmikroskopische Analyse der resultierenden Strukturen ausschließlich amorphe Zusammenlagerungen und keine fibrillären Strukturen (siehe Abbildung 3.32).



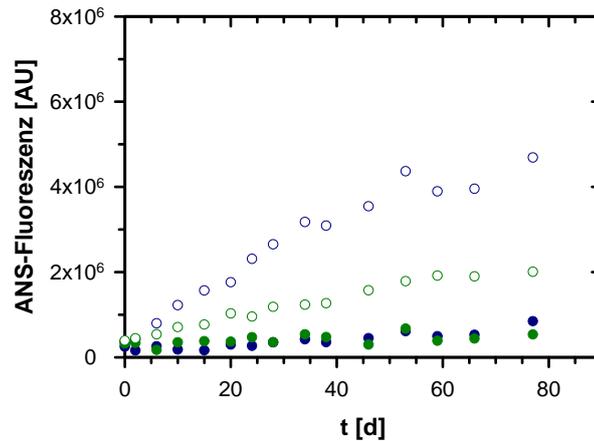
**Abbildung 3.32 Elektronenmikroskopische Aufnahme von 17Ala-CspB inkubiert nach Zugabe heterologer Seeds von 10Ala-CspB.** Die Inkubation des Proteins erfolgte mit den unter Abbildung 3.31 genannten Bedingungen. Die Präparation der *Grids* erfolgte bei einer Proteinkonzentration von 2.1 mg/ml nach 68 Tagen Inkubation. Die Aufnahme entstand bei einer Vergrößerung von  $5 \times 10^4$ .

Die Zugabe von *Seeds* des 10Ala-CspB-Proteins führte nicht zur Induktion einer Fibrillenbildung von 17Ala-CspB.

#### **3.6.4 Fibrillenbildung der „direkten Fusionen“ nach Zugabe heterologer Seeds von N-(+7)Ala-CspB**

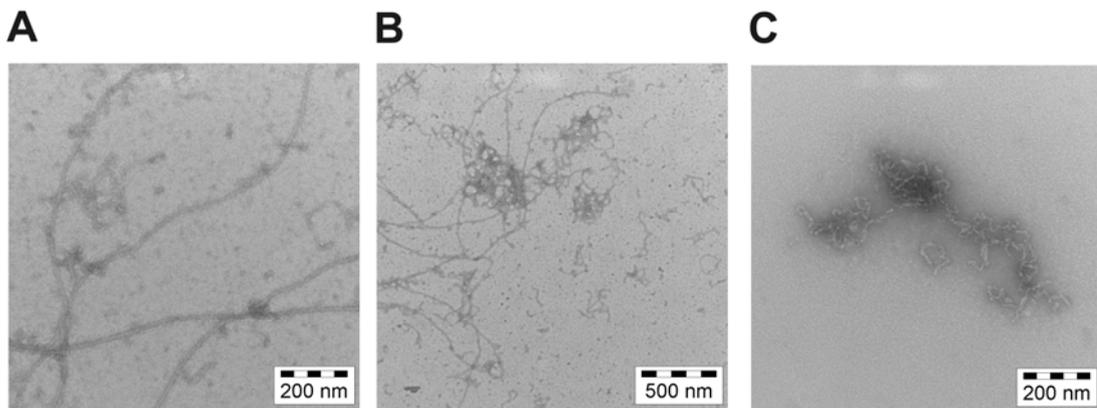
Da sowohl für die Fusionen der N-terminalen Domänen und CspB als auch für 10Ala-CspB eine von der Anwesenheit der Poly-Alanin-Sequenz abhängige Fibrillenbildung gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob ein *Cross-Seeding* zwischen den zwei Fusionstypen möglich ist. Zwar konnte kein Hinweis für ein *Cross-Seeding* innerhalb der Fusionstypen, also zwischen den Fusionen N-(+7)Ala- und N-WT-CspB einerseits und 10Ala- und 17Ala-CspB andererseits, gefunden werden, dennoch war ein *Cross-Seeding* zwischen den unterschiedlichen Fusionstypen nicht grundsätzlich auszuschließen.

Um ein potentiell *Cross-Seeding* zwischen den Fusionen zu testen, wurden Fibrillen eines für mehrere Monate bei 37 °C inkubierten Ansatzes von N-(+7)Ala-CspB genutzt. Die *Seeds* von N-(+7)Ala-CspB wurden den Fusionen 10Ala- und 17Ala-CspB zugesetzt und unter den Bedingungen von 3.6.2 für 10Ala- und 3.6.3 für 17Ala-CspB, bei einer Konzentration von 0.45 mM, inkubiert. In Abbildung 3.33 ist die ANS-Fluoreszenz der Ansätze von 10- und 17Ala-CspB in An- und Abwesenheit heterologer *Seeds* von N-(+7)Ala-CspB gezeigt.



**Abbildung 3.33** ANS-Fluoreszenz der inkubierten Fusionen 10Ala- und 17Ala-CspB mit und ohne Zugabe von N-(+7)Ala-CspB-Seeds. 10Ala-CspB in blau und 17Ala-CspB in grün. Ohne Zugabe von *Seeds* geschlossene und mit Zugabe von *Seeds* offene Kreise. Die Proteine wurden bei einer Konzentration von 0.45 mM und einer Temperatur von 37 °C (10Ala-CspB) und 30 °C (17Ala-CspB) in 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 250 mM NaCl; 0.1 % (w/v) NaN<sub>3</sub>; pH 7.5 inkubiert. Die *Seed*-Konzentration betrug 0.02 % (w/v). Die ANS-Fluoreszenz wurde wie unter 2.4.5 beschrieben bestimmt. Die Auswertung erfolgte bei einer Emissionswellenlänge von 480 nm.

Im Vergleich zu den Ansätzen ohne *Seeds* zeigten die mit *Seeds* versehenen Ansätze von 10Ala- und 17Ala-CspB ein über die Zeit gleichmäßig, linear ansteigendes ANS-Fluoreszenzsignal. Die Intensität und der Anstieg des Signals waren jedoch geringer als bei den Fibrillierungen der Fusionen der N-terminalen Domänen mit CspB und der Fibrillenbildung von 10Ala-CspB nach Zugabe homologer *Seeds*.



**Abbildung 3.34** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von (A) und (B) 10Ala- und (C) 17Ala-CspB inkubiert nach Zugabe heterologer *Seeds* von N-(+7)Ala-CspB. Die Inkubation der Proteine erfolgte mit den unter Abbildung 3.33 genannten Bedingungen. Die Präparation der *Grids* erfolgte nach 87 Tagen Inkubation (A) und (B) und nach 38 Tagen (C) bei einer Proteinkonzentration von ca. 4.7 mg/ml. Die Aufnahmen entstanden bei einer Vergrößerung von  $5 \times 10^4$  (A) und (C) und  $2 \times 10^4$  (B).

Die elektronenmikroskopische Analyse der Ansätze zeigte die Existenz fibrillärer Strukturen ausschließlich bei dem mit *Seeds* inkubierten Ansatz von 10Ala-CspB (siehe Abbildung 3.34 A, B). Im Gegensatz zur Fibrillierung von 10Ala-CspB in Gegenwart homologer *Seeds* (siehe Abbildung 3.30) scheint die Fibrillenbildung jedoch von der Bildung amorpher Strukturen begleitet zu sein. Da derartige Strukturen bei dem ohne *Seeds* inkubierten Ansatz nicht zu beobachten waren, ist anzunehmen, dass die Bildung der Strukturen durch die fragmentierten Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB hervorgerufen wurde. Die Zugabe von *Seeds* von N-(+7)Ala-CspB zur Fusion 17Ala-CspB führte lediglich zur Bildung vereinzelter amorpher Strukturen (siehe Abbildung 3.34 C). Ein eindeutiger fibrillärer Charakter der Strukturen war nicht zu erkennen.

Offensichtlich ist eine Induktion der Fibrillenbildung von 10Ala-CspB durch die Zugabe heterologer *Seeds* von N-(+7)Ala-CspB möglich. Die Bildung der Fibrillen wurde jedoch von der Bildung amorpher Zusammenlagerungen begleitet, welche bei dem homologen *Seeding* von 10Ala-CspB (siehe Abbildung 3.30) nicht beobachtet wurden. Es ist daher unklar, in welchem Zusammenhang die Zugabe von *Seeds* mit der Fibrillenbildung und der Entwicklung amorpher Strukturen steht. Die Induktion der Fibrillenbildung von 10Ala-CspB durch die Zugabe von *Seeds* von N-(+7)Ala-CspB ist umso erstaunlicher, da kein eindeutiger Beweis für ein *Cross-Seeding* zwischen N-(+7)Ala-CspB und N-WT-CspB und zwischen N-(+7)Ala-CspB und 17Ala-CspB zu finden war. Die Fusionen N-(+7)Ala- und 10Ala-CspB zeigen von den oben genannten Fusionen die geringste Übereinstimmung bezüglich ihrer Aminosäuresequenz. Daher scheint ein *Cross-Seeding* zwischen diesen beiden Fusionen, theoretisch, eher unwahrscheinlich. Eine zusammenfassende Betrachtung aller durchgeführten „*Seeding*-Experimente“ erfolgt im Kapitel 4.

### 3.6.5 Fibrillierung 10Ala-CspB nach Zugabe von dT7

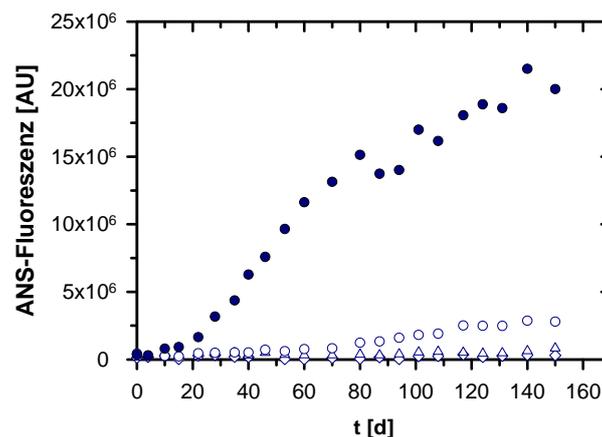
Wie später noch näher erläutert wird, besaßen die Fibrillen der Fusion 10Ala-CspB kein korrekt gefaltetes CspB (siehe 3.8.3). Es ist daher anzunehmen, dass die Entfaltung von CspB eine Voraussetzung für die Fibrillenbildung von 10Ala-CspB ist und eine geringe thermodynamische Stabilität die Fibrillenbildung fördert. Das artifizielle Substrat dT7 wird von freiem und fusionierten CspB mit hoher Affinität gebunden (siehe 3.4.3). Da CspB innerhalb von Millisekunden faltet und entfaltet (Schindler *et al.*, 1995), dT7 jedoch durch korrekt gefaltetes CspB hoch affin gebunden wird, sollte dT7 eine stabilisierende Wirkung auf CspB ausüben. Daher ist anzunehmen, dass die Zugabe von dT7 zu 10Ala-CspB die Fibrillenbildung des Proteins unterdrückt. Aus diesem Grund wurde die Fibrillenbildung von 10Ala-CspB nach Zugabe von dT7 analy-

siert. Die elektronenmikroskopische Analyse einer potentiellen Fibrillenbildung von 10Ala-CspB nach Zugabe von dT7 könnte außerdem Aufschluss über die Rolle der amorphen Strukturen bei der Fibrillenbildung von 10Ala-CspB geben. Sollte eine Fibrillenbildung von 10Ala-CspB in Gegenwart von dT7 möglich sein und gleichzeitig die Bildung amorpher Strukturen verhindert werden, wäre dies ein deutlicher Hinweis, dass die amorphen Strukturen keine notwendige Zwischenstufe für die Fibrillenbildung von 10Ala-CspB sind.

Zur Analyse des Einflusses von dT7 auf die Fibrillenbildung von 10Ala-CspB wurde dT7 im molaren Unterschuss (Faktor 20 und 5) und im äquimolaren Verhältnis zum Protein zugegeben. In Abbildung 3.35 ist die zeitabhängige ANS-Fluoreszenz von 10Ala-CspB nach Zugabe verschiedener Konzentrationen dT7 gezeigt.

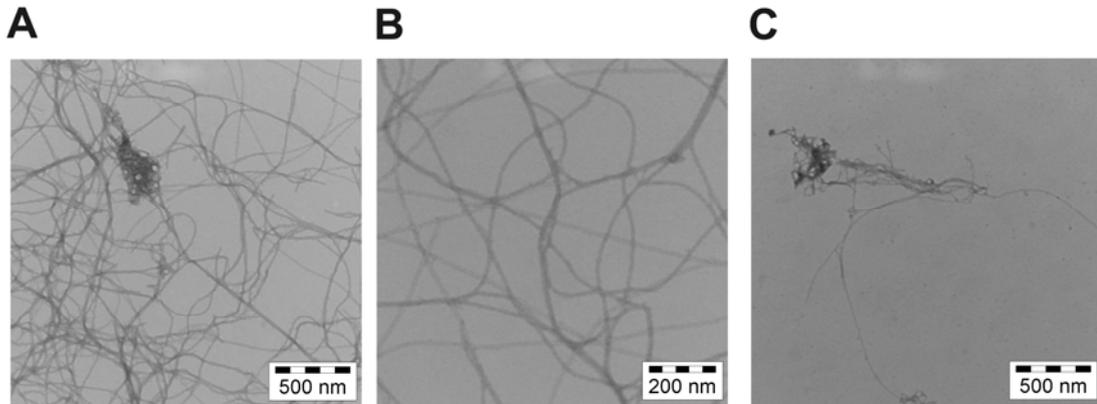
Die ANS-Fluoreszenz lässt vermuten, dass die Fibrillenbildung der Fusion 10Ala-CspB tatsächlich durch die Zugabe von dT7 inhibiert bzw. verzögert wird. Während der Ansatz ohne dT7 innerhalb von 50-60 Tagen ein deutliches ANS-Fluoreszenzsignal erreichte, führte die Anwesenheit eines fünffachen Unterschusses bzw. eines äquimolaren Verhältnisses an dT7 innerhalb von 150 Tagen zu keinem registrierbaren Anstieg der ANS-Fluoreszenz. Für diese Ansätze wurden weder Fibrillen noch Aggregate mittels Elektronenmikroskopie nachgewiesen.

Selbst ein zwanzigfach molarer Unterschuss an dT7 genügte, um den Anstieg der ANS-Fluoreszenz zu verzögern. Der nach 150 Tagen bestimmte Wert der ANS-Fluoreszenz dieses Ansatzes war um ein Vielfaches geringer als der entsprechende Wert des Ansatzes in Abwesenheit von dT7.



**Abbildung 3.35 ANS-Fluoreszenz des inkubierten 10Ala-CspB-Proteins nach Zugabe verschiedener Konzentrationen dT7.** 10Ala-CspB in Abwesenheit von dT7 (geschlossene Kreise), in einem 20fachen bzw. 5fachen molaren Unterschuss an dT7 (offene Kreise bzw. offene Dreiecke) und in einem äquimolaren Verhältnis mit dT7 (offene Vierecke). Die Inkubation erfolgte bei einer Proteinkonzentration von 0.5 mM und einer Temperatur von 37 °C in 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 100 mM NaCl; 0.1 % (w/v) NaN<sub>3</sub>; pH 7.5. Die ANS-Fluoreszenz wurde gemäß 2.4.5 bestimmt.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten für den Ansatz ohne dT7 hauptsächlich fibrilläre Strukturen, während der Ansatz mit einem zwanzigfach molaren Unterschuss an dT7 vereinzelte fibrilläre Strukturen neben Aggregaten aufwies (siehe Abbildung 3.36).



**Abbildung 3.36** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von inkubiertem 10Ala-CspB (A) und (B) ohne Zugabe und (C) nach Zugabe eines 20fach molaren Unterschusses an dT7. Die Inkubation erfolgte unter den in Abbildung 3.35 genannten Bedingungen. Die Präparation der *Grids* erfolgte nach 140 Tagen Inkubation bei einer Proteinkonzentration von ca. 1.7 mg/ml (A) und (B) und 5.1 mg/ml (C). Die Aufnahmen entstanden bei einer Vergrößerung von  $2 \times 10^4$  (A) und (C) und  $5 \times 10^4$  (B).

Die vermutlich verzögerte Fibrillenbildung von 10Ala-CspB nach Zugabe eines zwanzigfach molaren Unterschusses von dT7 führte nicht grundsätzlich zur Unterdrückung amorpher Strukturen. Dies könnte bedeuten, dass die gebildeten amorphen Zusammenlagerungen in direktem Zusammenhang mit der Fibrillenbildung von 10Ala-CspB stehen.

Interessanterweise wurde der Anstieg der ANS-Fluoreszenz von 10Ala-CspB durch die Zugabe von dT7 nur geringfügig verzögert, wenn die Zugabe erst kurz vor dem Ansteigen des ANS-Fluoreszenzsignals erfolgte (hier nicht gezeigt). Eine Beobachtung, die darauf schließen lässt, dass dT7 die Nukleationskeimbildung erschwert. Auch bei diesen Ansätzen konnte die Bildung von amorphen Zusammenlagerungen nicht verhindert werden. Die hier gezeigten Ergebnisse geben lediglich erste Hinweise für den Fibrillierungsmechanismus von 10Ala-CspB.

Die Zugabe von dT7 zur Fusion 17Ala-CspB führte ebenfalls zur Unterdrückung des Anstieges der ANS-Fluoreszenz. Durch die Zugabe konnte keine Fibrillenbildung von 17Ala-CspB induziert werden.

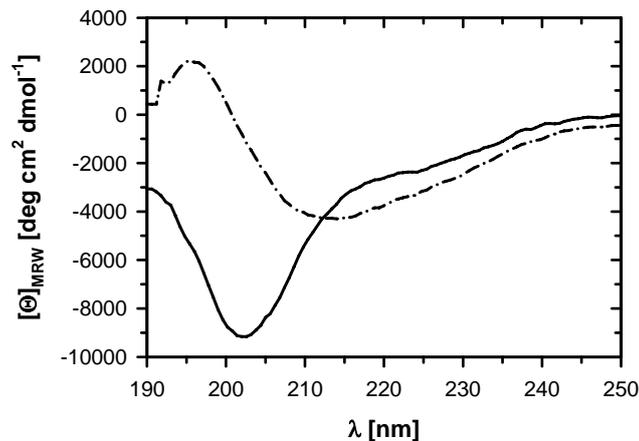
## 3.7 Biophysikalische Charakterisierung der Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB

### 3.7.1 Amyloidtypische Sekundärstruktur der Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB

Die Bildung amyloider Strukturen ist gekennzeichnet durch eine Konformationsänderung des Faltungszustandes des amyloidogenen Proteins. Ausgehend vom nativ gefalteten Zustand mit den verschiedenen Sekundärstrukturanteilen und einer Tertiärstruktur, oder auch von einem „nativ ungefalteten“ Zustand ohne Tertiärstruktur, durchlaufen die Proteine eine oder mehrere Konformationsänderungen, die in der für amyloide Strukturen allgemein anerkannten  $\beta$ -Cross-Struktur resultieren (Geddes *et al.*, 1968; Sunde & Blake, 1997). Das wesentliche Merkmal der  $\beta$ -Cross-Struktur ist die senkrecht zur Fibrillenachse verlaufende  $\beta$ -Faltblatt-Struktur (Sunde & Blake, 1997). Diese wird durch eine Sekundärstrukturanalyse der Fibrillen, durchgeführt mittels Circular dichroismus oder FT-IR-Spektroskopie (Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie), und der Existenz des für amyloide Strukturen charakteristischen Röntgenbeugungsmusters nachgewiesen. Für die Fibrillen der N-terminalen Domänen von PABPN1 konnten die typischen Merkmale einer  $\beta$ -Cross-Struktur gezeigt werden (Scheuermann, 2003).

Um die Sekundärstruktur des fibrillären N-(+7)Ala-CspB zu ermitteln, wurden Fern-UV-CD-Messungen durchgeführt. In Abbildung 3.37 ist dem Fern-UV-CD-Spektrum des monomeren N-(+7)Ala-CspB das des fibrillären Proteins gegenübergestellt.

Es ist klar ersichtlich, dass das Spektrum des monomeren Proteins von einer anderen Sekundärstruktur geprägt ist als das des fibrillären Proteins. So konnten für das monomere Protein *random-coil*- und  $\alpha$ -helikale Strukturanteile ermittelt werden (siehe 3.3.1). Das Spektrum des fibrillären N-(+7)Ala-CspB dagegen zeigt deutliche Charakteristika einer  $\beta$ -Faltblatt-Struktur. Dies wird in dem absoluten Minimum zwischen 214 und 215 nm und dem absoluten Maximum bei ca. 197 nm deutlich. Ein im Verlauf nahezu identisches Spektrum zeigte der fibrilläre Zustand von N-(+7)Ala (Scheuermann, 2003). Ähnliche Fern-UV-CD-Spektren konnten beispielsweise auch für amyloide Strukturen einer SH3-Domäne (Polverino de Laureto *et al.*, 2003), der für den Prioncharakter verantwortlichen NM-Sequenz von Sup35p (Scheibel & Lindquist, 2001), des *Islet amyloid polypeptide* (IAPP) (Kayed *et al.*, 1999) und auch für Fibrillen poly-alaninbasierter Peptide (Shinchuk *et al.*, 2005) gefunden werden. Eine quantitative Auswertung der Absorptionsintensität des Spektrums des fibrillären Proteins war schwierig, da Streulicht, hervorgerufen durch die makromolekularen Strukturen der Fibrillen, zu einer Intensitätsverringering der Spektren führt.



**Abbildung 3.37 Fern-UV CD-Spektren von monomerem und fibrilliertem N-(+7)Ala-CspB.** Monomeres N-(+7)Ala-CspB durchgezogene und fibrilliertes N-(+7)Ala-CspB gestrichelte Linie. Die Spektren wurden in 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 100 mM NaCl; pH 7.5 bei einer Proteinkonzentration von 1.2 mg/ml (Monomer) und 1.1 mg/ml (Fibrille) und einer Temperatur von 25 °C gemessen.

Die unterschiedlichen Fern-UV CD-Spektren des monomeren und fibrillären Zustandes von N-(+7)Ala-CspB beweisen eine Konformationsänderung von N-(+7)Ala-CspB, hervorgerufen durch den Prozess der Fibrillenbildung. Das Spektrum des fibrillären Proteins trägt die typischen Merkmale einer  $\beta$ -Cross-Struktur.

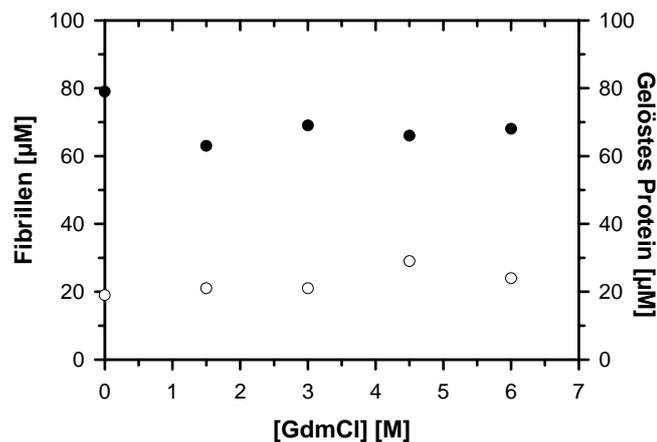
### 3.7.2 Hohe Stabilität der Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB gegenüber chemischen Denaturierungsmitteln

Amyloide Strukturen zeigen häufig eine hohe Resistenz gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen. So weisen die Fibrillen verschiedener Proteine hohe Stabilitäten gegenüber thermischen Einflüssen (Scheibel *et al.*, 2003; Bocharova *et al.*, 2005) oder der Behandlung mit SDS (Brown *et al.*, 1990; Scherzinger *et al.*, 1999; Busch *et al.*, 2003) auf. Viele Fibrillen können erst durch die Verwendung hoher Konzentrationen chemischer Denaturierungsmittel oder den Einsatz besonders starker chemischer Denaturierungsmittel wieder dissoziiert werden (Scheibel *et al.*, 2003). Die Fibrillen von N-(+7)Ala beispielsweise konnten selbst durch die Verwendung hoher Konzentrationen von Guanidiniumthiocyanat, einem sehr starken Denaturierungsmittel, nur unvollständig wieder gelöst werden (Lodderstedt *et al.*, 2007).

Für eine Analyse der Stabilität der Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB gegenüber chemischen Denaturierungsmitteln wurde Guanidiniumchlorid als Denaturierungsmittel verwendet. Die Fibrillen eines für mehrere Monate bei 37 °C inkubierten Ansatzes von N-(+7)Ala-CspB wurden aliquotiert und mit steigenden Konzentrationen an GdmCl versehen. Die Aliquots wurden 1 h unter leichtem Schütteln bei 25 °C inkubiert. Nach einer Ultrazentrifugation wurde die Menge an

gelöstem und fibrillärem Protein mittels der Konzentrationsbestimmung über Tryptophanfluoreszenz (siehe 2.4.2) bestimmt. Die Existenz fibrillärer Strukturen wurde durch Elektronenmikroskopie nachgewiesen. In Abbildung 3.38 sind die Konzentrationen an fibrillärem und monomeren N-(+7)Ala-CspB gegen die Konzentration von GdmCl aufgetragen.

Die Grafik zeigt, dass die Behandlung der Fibrillen mit verschiedenen Konzentrationen an GdmCl das Verhältnis von löslichem zu fibrillärem Protein nicht wesentlich verändert. So beträgt die Konzentration der löslichen Spezies konstant ca. 20  $\mu\text{M}$ , während die Konzentration der fibrillären Spezies konstant ca. 70-80  $\mu\text{M}$  groß ist. Die Zugabe von GdmCl hatte keinen Einfluss auf die Konzentrationsverteilung. Das Auftreten von löslichem Protein in den Ansätzen wird vermutlich seine Ursache in einer Ablösung von an den Fibrillen haftendem Monomer haben. Die Schwankungen der Konzentrationen, besonders bei der Analyse des fibrillären Zustands, sind wahrscheinlich auf die schwierige Handhabung der Fibrillen zurückzuführen.

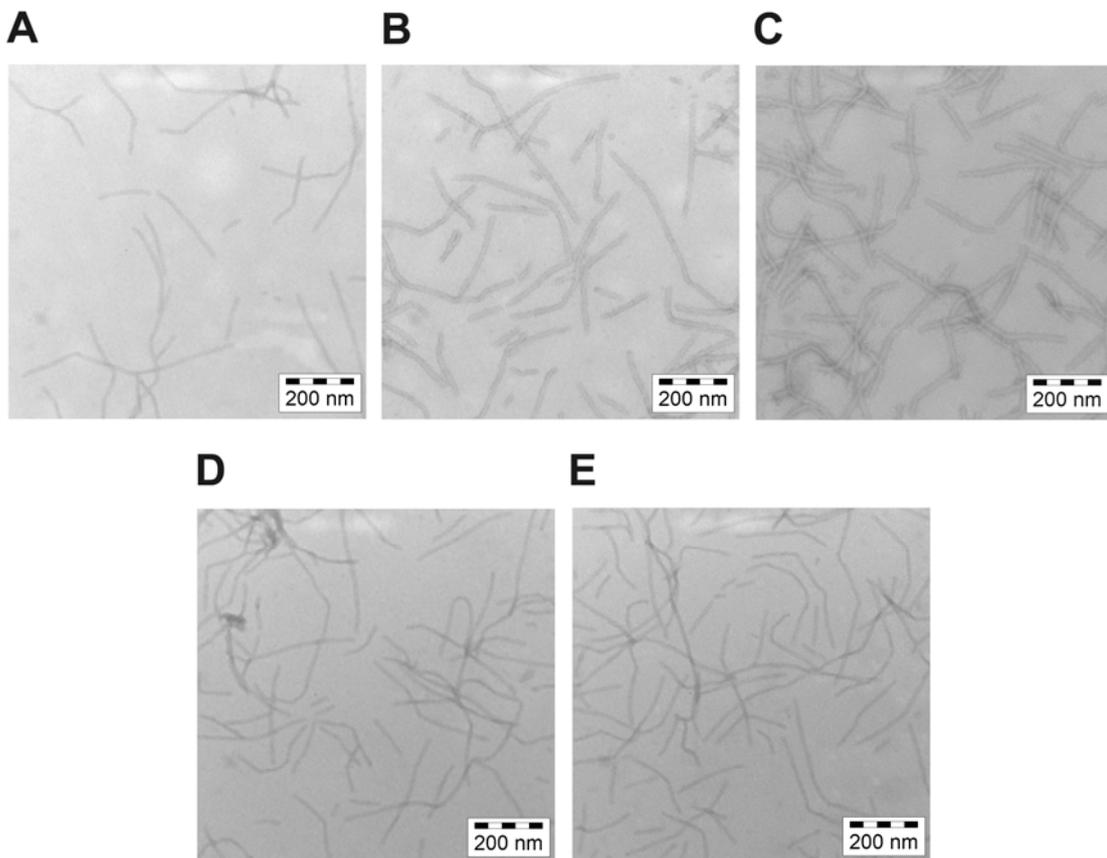


**Abbildung 3.38** Konzentrationen an fibrillärem und monomeren Protein von N-(+7)Ala-CspB nach der Behandlung mit variierenden Konzentrationen an GdmCl. Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB dargestellt durch gefüllte, und monomeres Protein durch offene Kreise. Die Auflösung der Fibrillen wurde für 1 h bei 25 °C in 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 100 mM NaCl; pH 7.5 mit variierenden Konzentrationen an GdmCl durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung des fibrillären und monomeren Proteins erfolgte nach einer Zentrifugation (60 000 rpm; 1 h) gemäß 2.4.2.

Nach der Behandlung mit GdmCl konnten für alle pelletierten Proben Fibrillen durch elektronenmikroskopische Aufnahmen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.39).

Die Daten zeigen, dass die Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB durch die Verwendung von GdmCl nicht aufgelöst werden können. Trotz dieser Stabilität der Fibrillen gegenüber GdmCl kann offensichtlich die Proteinkonzentration mittels Tryptophanfluoreszenz, welche Tryptophan in einer denaturierten Umgebung voraussetzt (Pajot, 1976), bestimmt werden. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass CspB in den Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB offenbar nicht in die für die Fibrillenstruktur bestimmenden  $\beta$ -Faltblattstruktur eingebaut ist (siehe 3.7.3 und 3.7.4).

Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass sich die CspB-Moleküle an der Fibrillenoberfläche befinden und von der Fibrillenbildung unbeeinflusst in ihrem nativen Zustand verbleiben. Demnach führt die Behandlung der Fibrillen mit GdmCl nicht zur Auflösung der Fibrillen, jedoch zur Entfaltung von CspB.



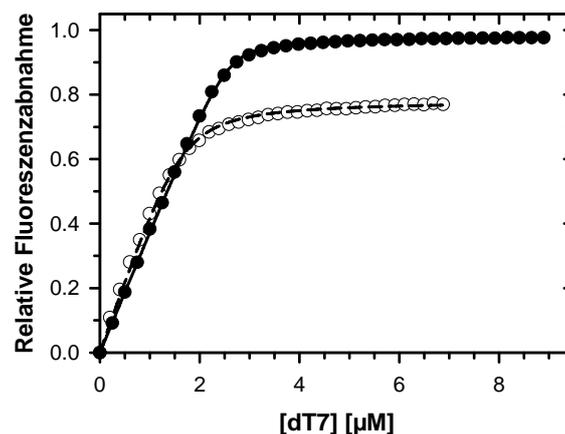
**Abbildung 3.39** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von (A) mit 0 M, (B) mit 1.5 M, (C) mit 3 M, (D) mit 4.5 M, (E) mit 6 M GdmCl behandelten Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB. Für die Auflösung gelten die Bedingungen von Abbildung 3.38. Die Präparation der *Grids* erfolgte bei einer Proteinkonzentration von ca. 0.9 mg/ml. Die Aufnahmen entstanden bei einer Vergrößerung von  $2 \times 10^4$  (A) und  $5 \times 10^4$  (B)-(F).

### 3.7.3 Natives CspB in den Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB

Im Abschnitt 3.3 konnte gezeigt werden, dass die Partner der Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB strukturell unabhängig voneinander in der Fusion vorliegen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Fibrillenbildung der Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB durch das Poly-Alanin-Segment induziert wird (siehe 3.5). Dies impliziert eine direkte strukturelle Beteiligung der Poly-Alanin-Sequenz beim Aufbau der Fibrille. Da die Poly-Alanin-Sequenz und CspB in den Fusionen jedoch durch ca. 100 Aminosäuren voneinander getrennt sind, ist eine Erhaltung der nativen Struktur von CspB

in den Fibrillen denkbar. Dies würde die Koexistenz einer fibrillären Struktur und korrekt gefaltetem CspB in den Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB bedeuten. Zum Nachweis dieser Hypothese wurde CspB auf seine native Faltung in den Fibrillen getestet.

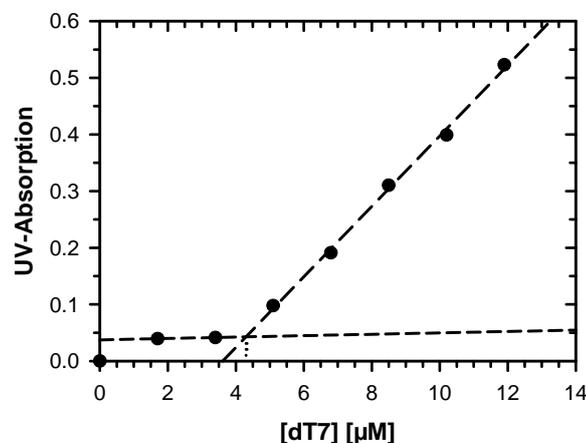
Der Faltungszustand von CspB in den Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB wurde über die Fähigkeit der Nukleinsäurebindung des Proteins analysiert. Die Fibrillen eines für mehrere Monate bei 37 °C inkubierten Ansatzes von N-(+7)Ala-CspB wurden zentrifugiert (60 000 rpm; 1 h) und wie für die Herstellung von *Seeds* präpariert (siehe 2.5.2). Die Konzentrationsbestimmung des monomeren Proteins in den Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB erfolgte durch die Konzentrationsbestimmung mittels Tryptophanfluoreszenz (siehe 2.4.2). Anschließend wurden die präparierten Fibrillen für eine Fluoreszenztitration mit dT7, analog der Bestimmung des Faltungszustands des monomeren Proteins, eingesetzt (siehe 2.4.4). In Abbildung 3.40 ist der Bindungsisotherme des monomeren N-(+7)Ala-CspB die des fibrillären Proteins gegenübergestellt.



**Abbildung 3.40** dT7-Bindungsisothermen von monomerem und fibrillärem N-(+7)Ala-CspB. Monomeres N-(+7)Ala-CspB dargestellt durch geschlossene Kreise mit durchgezogener Linie, und fibrilläres Protein durch offene Kreise mit gestrichelte Linie. Die Messungen wurden in 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 100 mM NaCl; pH 7.5 bei einer Proteinkonzentration von 3 µM und einer Temperatur von 20 °C durchgeführt.

Die Bindungsisothermen machen deutlich, dass sowohl monomeres Protein als auch die Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB in der Lage sind dT7 zu binden. Jedoch ist die Abnahme der Fluoreszenzintensität, hervorgerufen durch die dT7-Bindung, im Fall des fibrillären Proteins geringer. Dies impliziert, dass nicht jedes CspB-Molekül der Fibrillen in der Lage ist dT7 zu binden. Die Analyse der Bindungsstöchiometrie bestätigte diese Annahme. Statt ca. 0.85 Molekülen dT7 je Molekül CspB wie im Fall des Monomers, wurden in den Fibrillen nur noch ca. 0.55 Moleküle dT7 je Molekül CspB gebunden. Die Analyse der Bindungsisothermen weist daraufhin, dass die dT7-Bindung des fibrillären Proteins partiell verhindert wird. Vorstellbar wäre eine durch die Fibrillenstruktur hervorgerufene sterische Hinderung der Bindung von dT7.

In einem alternativen experimentellen Ansatz sollte die Fähigkeit der Bindung von dT7 durch die Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB bestätigt werden. Die Grundlage der Analyse bildete die Pelletierbarkeit der Fibrillen. So wurden Ansätze von Fibrillen mit definierter Proteinkonzentration (7  $\mu\text{M}$ ) mit steigenden Konzentrationen an dT7 versetzt, 30 min bei 20 °C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Eine Analyse der UV-Absorption der Probenüberstände sollte Aufschluss über die nicht gebundene Menge an dT7-Molekülen geben. Die Lichtabsorption wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm analysiert. Das Experiment wurde gemäß 2.5.6 durchgeführt. Die Ergebnisse der Bindung von dT7 durch die Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB sind in Abbildung 3.41 gezeigt.



**Abbildung 3.41 Analyse der Faltung von CspB in den Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB mittels Ultrazentrifugation.** Ansätze mit je 7  $\mu\text{M}$  fibrillärem N-(+7)Ala-CspB wurden mit verschiedenen Konzentrationen an dT7 versehen und für 30 min bei einer Temperatur von 20 °C in 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 100 mM NaCl; pH 7.5 inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 35 000 rpm für 30 min. Die Überstände wurden auf ihre UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm untersucht. Die Geraden geben den Anstieg vor und nach Sättigung mit dT7 wieder.

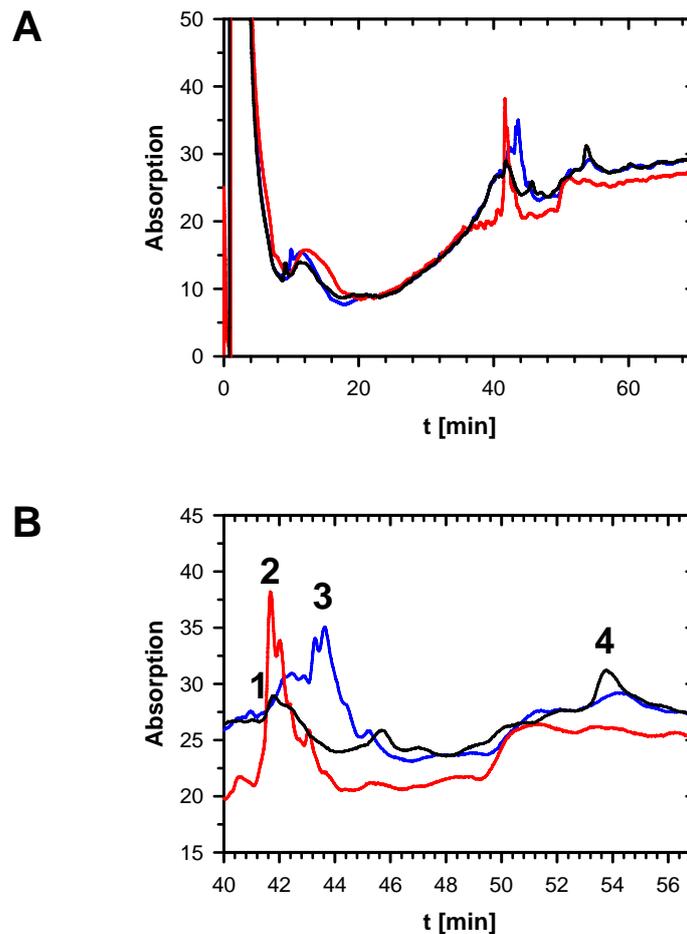
Die Absorption ist bis zu einer dT7-Konzentration von 3.4  $\mu\text{M}$  gering und nahezu konstant. Es kann davon ausgegangen werden, dass sich kein dT7 im Überstand der Proben befand, sondern alle dT7-Moleküle von den Fibrillen gebunden wurden. Ab einer dT7-Konzentration von 5.1  $\mu\text{M}$  stieg die Absorption linear an. Es stellte sich ein Gleichgewicht zwischen gebundenem und freiem dT7 ein. Die Bindung von dT7 durch die Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB hatte somit seine Sättigung erreicht. Durch den Schnittpunkt der Anstiege der Geraden vor und nach Sättigung mit dT7 konnte die Konzentration des im Gleichgewicht gebundenen dT7 berechnet werden. Es ergab sich eine Bindungsstöchiometrie von 0.61 dT7-Molekülen pro N-(+7)Ala-CspB-Molekül. Diese Stöchiometrie entspricht annähernd der durch Fluoreszenztitration bestimmten Bindungsstöchiometrie.

Die Ergebnisse belegen klar, dass die Fusion N-(+7)Ala-CspB auch im fibrillären Zustand dT7 binden kann. Zwar ist die Bindungsstöchiometrie und die Höhe der beobachteten Intensitätsabnahme der intrinsischen Fluoreszenz, vermittelt durch die Bindung von dT7, um 20-30 % verringert, dennoch konnte für die Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB eine dT7-Bindung gezeigt werden. Anders ausgedrückt bedeutet dies, dass offensichtlich der überwiegende Teil der fibrillären Moleküle von N-(+7)Ala-CspB natives CspB besitzt. Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass die Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB generell korrekt gefaltetes CspB besitzen, jedoch nicht jedes CspB-Molekül einen räumlichen Zugang für eine Interaktion mit dT7 hat.

### 3.7.4 Proteolysegeschützter Bereich der Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB

Amyloide Strukturen besitzen, vermutlich aufgrund ihrer  $\beta$ -Cross-Struktur, eine hohe Resistenz gegenüber proteolytischem Abbau (Polverino de Laureto *et al.*, 2003; Bocharova *et al.*, 2005). Im letzten Abschnitt konnte außerdem gezeigt werden, dass nicht notwendigerweise das gesamte Protein am Aufbau der  $\beta$ -Faltblatt-Struktur beteiligt sein muss. Es ist zu vermuten, dass ein genügend großer Abstand zwischen amyloidogener Sequenz und gefaltetem Protein die Existenz unabhängiger Strukturen ermöglicht. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass vermutlich nicht das gesamte fibrillierte Protein proteolysegeschützt ist. Der proteolysegeschützte Bereich wird sich im Wesentlichen auf die  $\beta$ -Faltblatt-bildenden Aminosäuren, also die amyloidogene Peptidsequenz, beschränken. Die Existenz von solchen proteolysegeschützten fibrillären „Kernstrukturen“ wurde bereits beschrieben (Bocharova *et al.*, 2005; Monti *et al.*, 2005; Frare *et al.*, 2006). Die Detektion des proteolysegeschützten Bereiches ermöglicht quasi eine Kartierung des amyloidogenen Proteins bzw. die Identifizierung der amyloidogenen Aminosäuresequenz („Fibrillenkernsequenz“) innerhalb des Proteins.

Die Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB wurden mit Thermolysin und Proteinase K, zwei hochaktiven und relativ unspezifisch schneidenden Proteasen, behandelt. Das proteolyseresistente Material wurde durch Zentrifugation von den Peptidbruchstücken getrennt und anschließend durch die Verwendung stark denaturierender Bedingungen (5 M GdmSCN; 0.1 % TFA) solubilisiert. Die so erhaltenen Peptide wurden mittels RP-HPLC und Massenspektrometrie analysiert. In Abbildung 3.42 sind die RP-HPLC-Chromatogramme der mit proteasebehandelten im Vergleich mit den unbehandelten, solubilisierten Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB gezeigt. Die nummerierten *Peaks* kennzeichnen die anschließend durch Massenspektrometrie untersuchten Fraktionen.



**Abbildung 3.42** RP-HPLC-Chromatogramme der mit Proteasen behandelten und unbehandelten, solubilisierten Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB im Original (A) und als Ausschnitt (B). Unbehandelte Fibrillen in schwarz, mit Thermolysin oder Proteinase K behandelte Fibrillen in rot bzw. blau. Die Fibrillen wurden gemäß 2.5.4 verdaut und aufgelöst und gemäß 2.6 getrennt. Die Chromatogramme wurden durch UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 205 nm aufgezeichnet. Die nummerierten *Peaks* wurden aufgefangen und anschließend massenspektrometrisch untersucht.

Der in den Chromatogrammen markierte *Peak* mit der höchsten Retentionszeit (*Peak 4*) entspricht dem monomeren Protein (hier nicht separat abgebildet). Dies wurde durch eine massenspektrometrische Analyse bestätigt. Die chromatographische Trennung der aufgelösten und mit Thermolysin oder Proteinase K behandelten Fibrillen führte zu charakteristischen *Peaks* bei geringeren Retentionszeiten (*Peak 2, 3*), ein Hinweis für die Existenz von Peptidfragmenten. Jedoch führte die chromatographische Trennung der solubilisierten und nicht mit einer Protease behandelten Fibrillen ebenfalls zum Auftreten eines *Peaks* bei einer geringeren Retentionszeit (*Peak 1*). Ein Fakt, der Inhomogenität in der fibrillären Struktur von N-(+7)Ala-CspB vermuten lässt und die Existenz von Abbauprodukten in den Fibrillen andeutet. Die chromatographische Trennung des mit Thermolysin oder Proteinase K behandelten monomeren N-(+7)Ala-CspB

fürte überwiegend zu *Peaks* mit einer Retentionszeit von weniger als 40 min (hier aus Übersichtlichkeitsgründen nicht gezeigt). Dies beweist ein variierendes Proteolyseschnittmuster und verschiedene Konformationen von Monomer und Fibrille.

Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse und die daraus ermittelten Peptidfragmente sind in Tabelle 3.5 und Abbildung 3.43 zusammengefasst dargestellt. Die Zuordnung der Peptidfragmente zu den ermittelten Massen erfolgte mit dem Programm FindPept (<http://expasy.ch/tools/protparam.html>). Es wurden ausschließlich Peptidfragmente mit reproduzierbaren Schnittstellen berücksichtigt. Die theoretischen Massen der ermittelten Fragmente zeigen zu den gemessenen Massen eine Abweichung von  $< 0.05$  Da ( $< 15$  ppm).

**Tabelle 3.5** Die aus der massenspektrometrischen Analyse resultierenden Massen der geschnittenen und solubilisierten Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB und die daraus ermittelten Peptidfragmente. Die Massen waren monoisotopische mit  $[M+H]^+$ .

Protease	Masse [Da]	theoretische Masse [Da]	resultierendes Fragment	Peak
Thermolysin	3396.831	3396.800	14-52	2
	<b>3533.887</b>	3533.859	14-53	2
	<b>3297.752</b>	3297.720	13-51	3
Proteinase K	<b>3453.856</b>	3453.822	13-52	3
	3540.898	3540.854	12-52	3
	3627.923	3627.886	11-52	3

Hervorgehobene Massen markieren die dominierenden *Peaks* der Spektren.



**Abbildung 3.43** Schematische Darstellung der proteolyse-resistenten Aminosäuresequenz der Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB. Die rot gekennzeichneten Aminosäuren markieren den Anfang und das Ende der proteolyse-geschützten Bereiche.

Die aufgelisteten Massen und die daraus resultierenden Peptidfragmente zeigen, dass der proteolyse-geschützte Bereich der Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB neben der Poly-Alanin-Sequenz nur wenige Aminosäuren vor und nach den Poly-Alaninen umfasst. Die Daten unterstreichen somit die Hypothese, einer direkten Beteiligung der Poly-Alanin-Sequenz am Aufbau der  $\beta$ -Faltblattstruktur der Fibrille. Ähnliche Daten konnten aus der Analyse des proteolyse-geschützten Bereiches der Fibrillen von N-(+7)Ala erhalten werden (Sackewitz *et al.*, 2008a). Da kleinere Massen ( $< 1000$  Da), aufgrund eines geringeren Signal/Rausch-Verhältnisses, nur noch schwer zu detektieren sind, kann nicht ausgeschlossen werden, dass der proteolyse-geschützte Bereich der Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB eine noch kürzere Aminosäuresequenz umfasst. Ers-

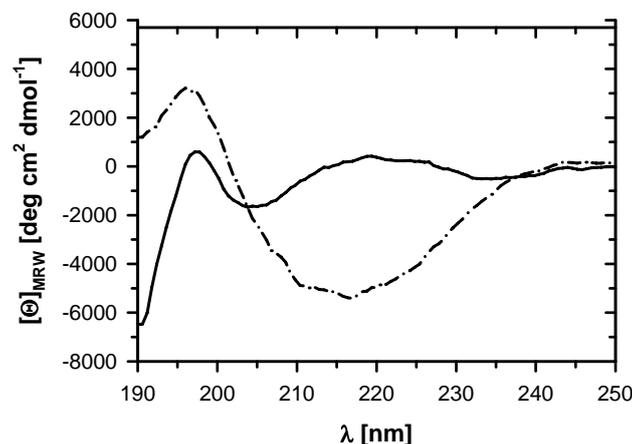
te Daten von Festkörper-NMR-Analysen der Fibrillen von N-(+7)Ala legen nahe, dass neben der Poly-Alanin-Sequenz mindestens noch Glycin-Reste am Aufbau der rigiden  $\beta$ -Faltblatt-Struktur der Fibrille beteiligt sind (Sackewitz *et al.*, 2008a). Überraschenderweise zeigte die massenspektrometrische Analyse des *Peaks 1* (siehe Abbildung 3.42 B), hervorgegangen aus den unbehandelten, solubilisierten Fibrillen, keine signifikanten Signale in der massenspektrometrischen Analyse.

### 3.8 Biophysikalische Charakterisierung der Fibrillen von 10Ala-CspB

#### 3.8.1 Amyloidtypische Sekundärstruktur der Fibrillen von 10Ala-CspB

Für die Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB konnte eine durch die Fibrillenbildung des Proteins hervorgerufene Konformationsänderung nachgewiesen werden. Hier sollte analysiert werden, ob die Fibrillenbildung von 10Ala-CspB ebenfalls mit einer Konformationsänderung einhergeht und die Fibrillen die amyloidtypische  $\beta$ -Faltblatt-Struktur besitzen.

Grundlage der Sekundärstrukturanalyse war erneut die Fern-UV-CD-Spektroskopie. Abbildung 3.44 zeigt sowohl das Spektrum des Monomers von 10Ala-CspB als auch das der Fibrillen.



**Abbildung 3.44 Fern-UV CD-Spektren von monomerem und fibrilliertem 10Ala-CspB.** Monomeres 10Ala-CspB durchgezogene, und fibrilliertes 10Ala-CspB gestrichelte Linie. Die Spektren wurden in 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 100 mM NaCl; pH 7.5 bei einer Proteinkonzentration von 1.3 mg/ml (Monomer) und 1.1 mg/ml (Fibrille) und einer Temperatur von 25 °C gemessen.

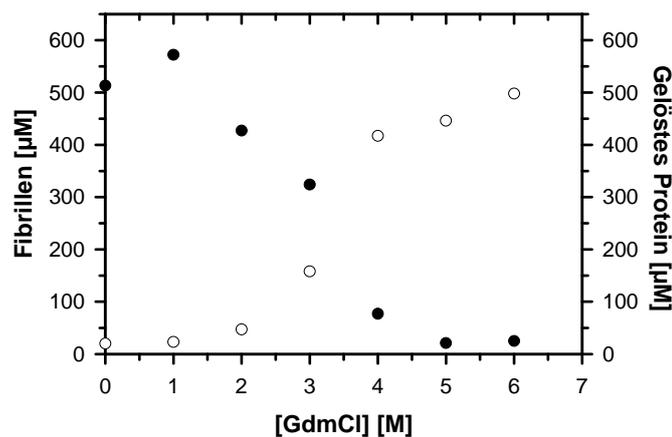
Die Fern-UV CD-Spektren vor und nach der Fibrillenbildung von 10Ala-CspB zeigen deutliche Unterschiede. So wird das Spektrum der monomeren Form von 10Ala-CspB von *random-coil*-

und  $\beta$ -Faltblatt-Strukturanteilen dominiert (siehe 3.4.1). Das Spektrum nach der Fibrillierung zeigt jedoch Charakteristika einer reinen  $\beta$ -Faltblatt-Struktur. Dies wird anhand des absoluten Minimums bei ca. 217 nm und das des absoluten Maximums bei ca. 196 nm deutlich. Das Fern-UV-CD-Spektrum des fibrillären 10Ala-CspB zeigt einen sehr ähnlichen Verlauf zu den Spektren der fibrillären Formen von N-(+7)Ala (Scheuermann, 2003) und N-(+7)Ala-CspB (siehe 3.7.1). Die durch die Fibrillenbildung von 10Ala-CspB hervorgerufene Konformationsänderung resultiert vermutlich in der amyloid-typischen  $\beta$ -Cross-Struktur.

### 3.8.2 Geringe Stabilität der Fibrillen von 10Ala-CspB gegenüber chemischen Denaturierungsmitteln

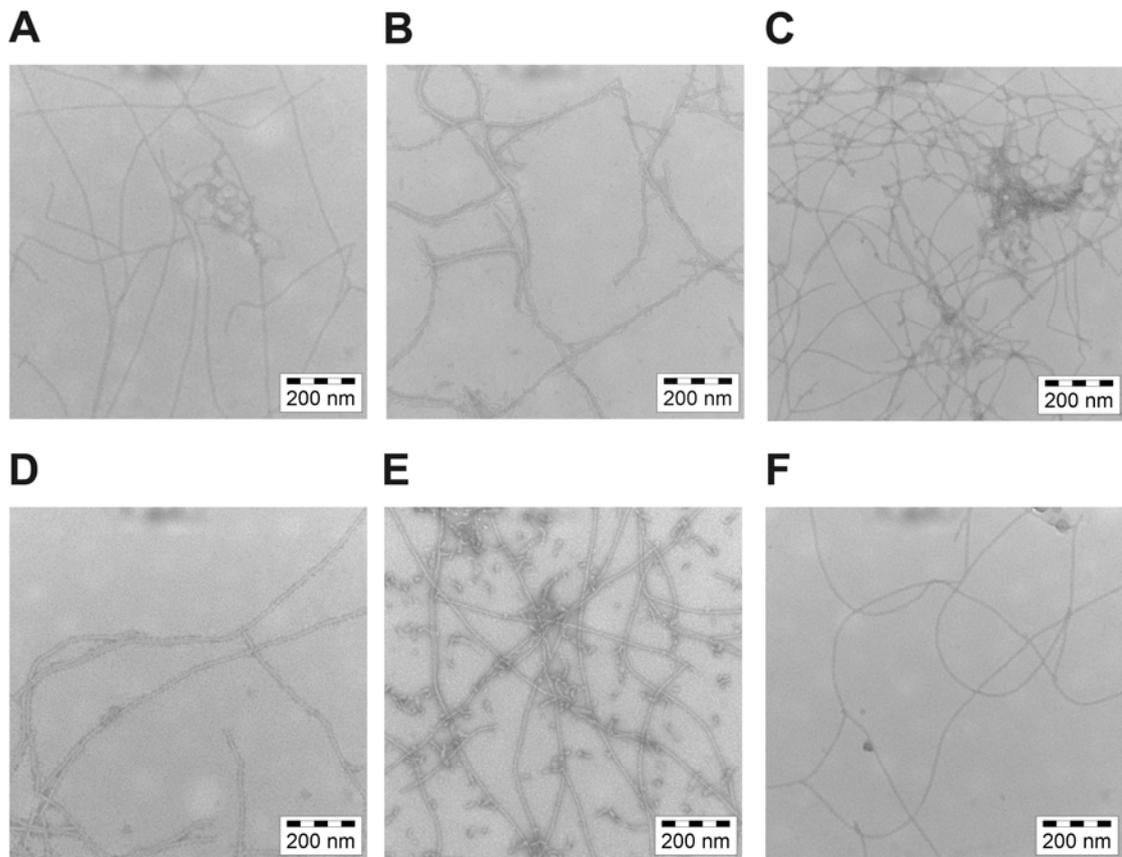
Die Analyse der Sekundärstrukturen der fibrillären Zustände von N-(+7)Ala-CspB und 10Ala-CspB zeigte für beide Proteine charakteristische Merkmale einer  $\beta$ -Faltblatt-Struktur (siehe 3.7.1 und 3.8.1). Da jedoch auch für die Fibrillen der N-terminalen Domänen N-(+7)Ala und N-WT biophysikalische Unterschiede nachgewiesen werden konnten (Lodderstedt *et al.*, 2007), ist anzunehmen, dass sich die Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB und 10Ala-CspB ebenfalls unterscheiden. Für eine biophysikalische Analyse wurde unter anderem die Stabilität der Fibrillen von 10Ala-CspB gegenüber GdmCl untersucht.

Die Stabilität der Fibrillen gegenüber GdmCl wurde analog den Stabilitätsmessungen der Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB (siehe 3.7.2) durchgeführt. In Abbildung 3.45 sind die Konzentrationen an fibrillärem und monomerem 10Ala-CspB bei variierenden GdmCl-Konzentrationen gezeigt.



**Abbildung 3.45** Konzentrationen an fibrillärem und monomerem Protein von 10Ala-CspB nach der Behandlung der Fibrillen mit variierenden Konzentrationen an GdmCl. Fibrillen von 10Ala-CspB dargestellt durch gefüllte, und monomeres Protein durch offene Kreise. Es gelten die Bedingungen aus Abbildung 3.38.

Das Experiment belegt eine deutlich geringere Stabilität der Fibrillen von 10Ala-CspB gegenüber GdmCl als die der Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB (siehe 3.7.2). So wurden hier bei vergleichsweise geringen Konzentrationen an GdmCl von 1-2 M bereits 10 % der Fibrillen solubilisiert. Bei einer GdmCl-Konzentration von 6 M waren quasi keine Fibrillen mehr nachweisbar. Die Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB hingegen konnten unter diesen Bedingungen nicht solubilisiert werden (siehe 3.7.2). In Abbildung 3.46 sind elektronenmikroskopische Aufnahmen der mit GdmCl behandelten Fibrillen von 10Ala-CspB gezeigt.



**Abbildung 3.46** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von (A) mit 0 M, (B) mit 1 M, (C) mit 2 M, (D) mit 3 M, (E) mit 4 M und (F) mit 5 M GdmCl behandelten Fibrillen von 10Ala-CspB. Die Fibrillen wurden für 1 h bei 25 °C in 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 100 mM NaCl; pH 7.5 mit variierenden Konzentrationen an GdmCl inkubiert. Die Präparation der *Grids* erfolgte bei einer Proteinkonzentration von ca. 0.2-1.7 mg/ml. Die Aufnahmen entstanden bei einer Vergrößerung von  $5 \times 10^4$ .

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der mit GdmCl behandelten Fibrillen von 10Ala-CspB offenbaren zwei interessante Fakten. Zum einen konnten die parallel zu den Fibrillen auftretenden amorphen Zusammenlagerungen nicht solubilisiert werden. Die amorphen Strukturen waren bis zu einer GdmCl-Konzentration von 4 M nachweisbar. Dies hat zur Konsequenz, dass alle mit den Fibrillen von 10Ala-CspB durchgeführten Messungen durch einen nicht quantifi-

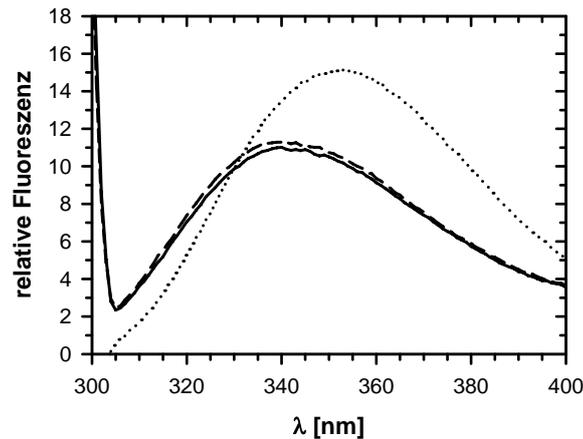
zierbaren Anteil amorpher Strukturen verfälscht wurden. Zum anderen konnten noch vereinzelte fibrilläre Strukturen nach der Behandlung mit 5 M GdmCl elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden, welche durch die Konzentrationsbestimmung nicht mehr erfasst werden konnten. Des Weiteren ist unklar, warum die Durchmesser der Fibrillen nach der Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen an GdmCl variieren.

Die Fibrillen von 10Ala-CspB zeigten eine, im Vergleich zu den Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB, verringerte Stabilität gegenüber GdmCl. Es ist jedoch unklar, ob die verminderte Stabilität auf die im Vergleich zu N-(+7)Ala-CspB verkürzte Alaninsequenz oder die veränderte Aminosäuresequenz nach dem Poly-Alanin-Bereich zurückzuführen ist.

### 3.8.3 Nicht-natives CspB in den Fibrillen von 10Ala-CspB

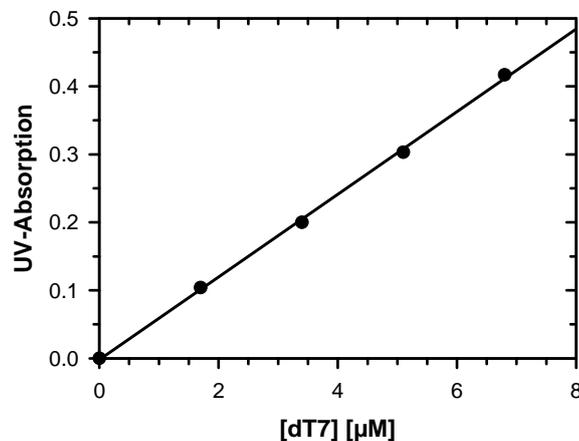
Die biophysikalische Analyse der Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB zeigte die Existenz von aktivem CspB in den Fibrillen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die proteolysegeschützte Peptidsequenz der Fibrillen ca. 7-10 Aminosäuren vor bzw. nach der Poly-Alanin-Sequenz beginnt (siehe 3.7). Die Ergebnisse belegen, dass CspB, vermutlich aufgrund des relativ großen Abstandes zur Poly-Alanin-Sequenz, im nativen Zustand in der Fibrille verbleiben kann. Ein solcher „*Peptid Linker*“ zwischen Poly-Alaninen und CspB existiert in den Fusionen 10Ala- und 17Ala-CspB nicht. Es könnte daher angenommen werden, dass die Fibrillenbildung von 10Ala-CspB von einer Entfaltung des CspB-Moleküls begleitet wird und CspB am Aufbau der fibrillären Struktur beteiligt ist. Aus diesem Grund wurden die Fibrillen von 10Ala-CspB auf ihre Fähigkeit zur dT7-Bindung getestet.

Die Ergebnisse der Bindung von dT7 durch die Fibrillen von 10Ala-CspB sind in Abbildung 3.47 gezeigt. Die Zugabe eines Überschusses an dT7 führte nicht zur Verminderung der intrinsischen Fluoreszenz der Fibrillen. Vielmehr wurde ein zum monomeren Zustand verändertes Fluoreszenzspektrum der Fibrillen von 10Ala-CspB detektiert. Das Fluoreszenzspektrum der Fibrillen ist durch eine Blauverschiebung des Intensitätsmaximums, von 353 nm (Monomer) zu 340 nm (Fibrille) gekennzeichnet. Die Fluoreszenzintensität ist im Vergleich zum Monomer vermindert. Speziell die Verschiebung des Emissionsmaximums der Fibrillen von 10Ala-CspB lässt eine veränderte, hydrophobere Umgebung für den Tryptophanrest von CspB in der Fibrille vermuten. Um einen Verlust der nativen Struktur von CspB durch die mehrmonatige Inkubation von 10Ala-CspB auszuschließen, wurde die dT7-Bindung des im Überstand verbliebenen Proteins der fibrillierten Ansätze analysiert (hier nicht gezeigt). Die Analyse ergab, dass trotz siebenmonatiger Inkubation mindestens 60-70 % der im Überstand verbliebenen Moleküle von 10Ala-CspB nativ gefaltet waren.



**Abbildung 3.47** Fluoreszenzspektren von monomerem und fibrillärem 10Ala-CspB vor und nach Zugabe von dT7. Monomeres 10Ala-CspB gepunktete Linie, fibrilläres 10Ala-CspB ohne dT7 durchgezogene und nach Zugabe von dT7 gestrichelte Linie. Die Messungen wurden in 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 100 mM NaCl; pH 7.5 bei einer Proteinkonzentration von 2  $\mu\text{M}$  und einer Temperatur von 20 °C durchgeführt. Die Anregung erfolgte bei 295 nm. Es wurden 5  $\mu\text{M}$  dT7 zugegeben.

Das Ergebnis, dass die Fibrillen von 10Ala-CspB kein dT7 binden können, konnte durch die Analyse der Konformation von CspB mittels Ultrazentrifugation (siehe 2.5.6) bestätigt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.48 gezeigt.



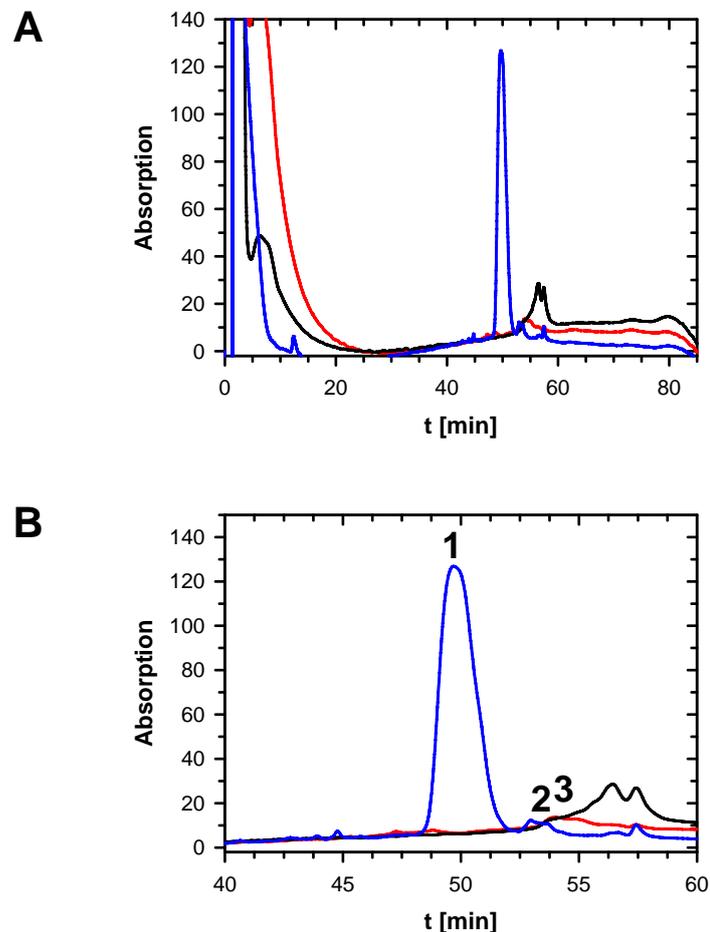
**Abbildung 3.48** Analyse der Konformation von CspB in den Fibrillen von 10Ala-CspB mittels Ultrazentrifugation. Ansätze mit je 7  $\mu\text{M}$  fibrillärem 10Ala-CspB wurden mit variierenden Konzentrationen an dT7 versehen und für 30 min bei einer Temperatur von 20 °C in 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 100 mM NaCl; pH 7.5 inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 35 000 rpm (30 min). Die Überstände wurden auf ihre UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm untersucht.

Im Gegensatz zur Analyse des Faltungszustands von CspB in den Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB (siehe 3.7.3) wurden hier exakt die in den einzelnen Schritten eingesetzten Mengen an dT7 im Überstand wiedergefunden. Es konnte mithilfe der Fibrillen kein dT7 pelletiert werden.

### 3.8.4 Proteolysegeschützter Bereich der Fibrillen von 10Ala-CspB

Die Ergebnisse der Bestimmung des Faltungszustands von CspB in den Fibrillen von 10Ala-CspB zeigen, dass CspB durch die Fibrillenbildung des Proteins entfaltet wird (siehe 3.8.3). Außerdem lassen die spektroskopischen Eigenschaften der Fibrillen eine Beteiligung von CspB an der  $\beta$ -Faltblatt-Struktur der Fibrille vermuten. Eine Kartierung des amyloidogenen Segmentes von 10Ala-CspB bzw. die Bestimmung der für die  $\beta$ -Faltblatt-Struktur verantwortlichen Sequenz über die Bestimmung des proteolysegeschützten Bereiches der Fibrillen sollte zeigen, ob und wie weit CspB an der Fibrillenstruktur beteiligt ist.

Die Fibrillen von 10Ala-CspB wurden analog der von N-(+7)Ala-CspB mit Thermolysin bzw. Proteinase K behandelt (siehe 2.5.4). Die Ergebnisse der chromatographischen Trennung der Fragmente mittels RP-HPLC sind in Abbildung 3.49 gezeigt.



**Abbildung 3.49** RP-HPLC-Chromatogramme der mit Proteasen behandelten und unbehandelten, solubilisierten Fibrillen von 10Ala-CspB im Original (A) und als Ausschnitt (B). Unbehandelte Fibrillen in schwarz, mit Thermolysin und ProteinaseK behandelte Fibrillen in rot bzw. blau. Die RP-HPLC erfolgte gemäß 2.6. Die Chromatogramme wurden durch UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 210 nm aufgezeichnet. Die nummerierten Peaks wurden aufgefangen und anschließend massenspektrometrisch untersucht.

Das Chromatogramm der unbehandelten, solubilisierten Fibrillen von 10Ala-CspB zeigt einen *Peak* bei einer Retentionszeit von ca. 57 min. Unter den gegebenen Bedingungen entspricht dies dem Verhalten des monomeren 10Ala-CspB (hier nicht abgebildet). Trotz der Aufspaltung des *Peaks* ist davon auszugehen, dass die Fibrillen von 10Ala-CspB die komplette Aminosäuresequenz des Proteins enthielten. Die Behandlung der Fibrillen mit Proteinase K bzw. Thermolysin führte zu veränderten Chromatogrammen nach Solubilisierung. Es traten *Peaks* mit einer verringerten Retentionszeit auf (*Peaks* 1-3). Dies ließ die Existenz von Peptidfragmenten von 10Ala-CspB in diesen Ansätzen vermuten. Hervorstechend ist das Auftreten eines signifikanten *Peaks* (*Peak* 1) der mit Proteinase K verdauten, solubilisierten Fibrillen. Es ist unklar, warum die Intensität dieses *Peaks* die Intensitäten der *Peaks* der unbehandelten und mit Thermolysin behandelten, solubilisierten Fibrillen um ein Vielfaches übersteigt. Die chromatographische Trennung des mit Thermolysin oder Proteinase K behandelten monomeren 10Ala-CspBs führte mehrheitlich zu *Peaks* mit einer Retentionszeit von weniger als 40 min (hier nicht gezeigt). Dies beweist ein variierendes Proteolyse-Schnittmuster und verschiedene Konformationen von Monomer und Fibrille.

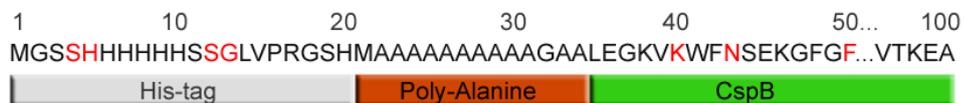
Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse und die daraus ermittelten Peptidfragmente sind in Tabelle 3.6 und Abbildung 3.50 zusammengefasst dargestellt. Die Zuordnung der Peptidfragmente zu den ermittelten Massen erfolgte analog der Vorgehensweise der Analyse des proteolysegeschützten Bereiches der Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB (siehe 3.7.4). Es galten die dort aufgeführten Bedingungen.

Alle ermittelten Peptidfragmente der geschnittenen und solubilisierten Fibrillen von 10Ala-CspB beinhalteten die Poly-Alanin-Sequenz. Die Fraktion des dominierenden *Peaks* des Chromatogramms der mit Proteinase K behandelten Fibrillen (*Peak* 1) vereinte Peptidfragmente mit zwei charakteristischen Schnittmustern: zum einen Fragmente, die kurz vor der Poly-Alanin-Sequenz beginnen und an Position 43 enden (X-43) und zum anderen Fragmente, die mehr als 10 Aminosäuren vor der Poly-Alanin-Sequenz beginnen und an Position 40 enden (X-40). Da der *Peak* des Chromatogramms (*Peak* 1) bei einer Wellenlänge von 280 nm kaum Absorption zeigte (hier nicht gezeigt), ist davon auszugehen, dass die Mehrheit der Peptidfragmente kein Tryptophan besaß. Daher war vermutlich die zweite Gruppe der Fragmente (X-40) für *Peak* 1 verantwortlich. Die Fraktion des zweiten *Peaks* des Chromatogramms der mit Proteinase K behandelten Fibrillen (*Peak* 2) beinhaltete geringfügig größere Peptidfragmente. Für die mit Thermolysin geschnittenen Fibrillen (*Peak* 3) konnten keine charakteristischen Schnittmuster gefunden werden. Alle ermittelten Peptidfragmente enthielten die Poly-Alanin-Sequenz. Es war auch hier, analog der Proteolyse der Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB (siehe 3.7.4), die Existenz von Peptidfragmenten unterhalb von 1000 Da nicht auszuschließen.

**Tabelle 3.6** Die aus der massenspektrometrischen Analyse resultierenden Massen der geschnittenen und solubilisierten Fibrillen von 10Ala-CspB und die daraus ermittelten Peptidfragmente. Die Massen waren monoisotopisch mit  $[M+H]^+$ .

Protease	Masse [Da]	theoretische Masse [Da]	resultierendes Fragment	Peak	
Thermolysin	-	-	-	3	
	2794.415	2794.457	15-43	1	
	<b>2964.583</b>	2964.562	13-43	1	
	3051.599	3051.594	12-43	1	
	3138.634	3138.626	11-43	1	
	<b>3513.843</b>	3513.789	5-40	1	
	ProteinaseK	3600.848	3600.812	4-40	1
		3687.898	3687.853	3-40	1
		<b>3716.964</b>	3716.912	13-50	2
		3803.977	3803.944	12-50	2
3891.025		3890.976	11-50	2	

Hervorgehobene Massen markieren die dominierenden *Peaks* der Spektren.



**Abbildung 3.50** Schematische Darstellung der proteolyse-resistenten Aminosäuresequenz der Fibrillen von 10Ala-CspB. Die rot gekennzeichneten Aminosäuren markieren den Anfang und das Ende der proteolyse-geschützten Bereiche.

Es bleibt festzuhalten, dass zwar alle ermittelten Peptidfragmente die Poly-Alanin-Sequenz besitzen, der protease-geschützte Bereich des fibrillierten 10Ala-CspB jedoch mehr als nur die Poly-Alanin-Sequenz umfasst. Ähnlich der Proteolyse der Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB beginnt der geschützte Bereich wenige Aminosäuren vor und endet ca. 10 Aminosäuren nach der Poly-Alanin-Sequenz. Die Ergebnisse decken sich mit den Resultaten aus 3.8.3, welche eine partielle Involvierung von CspB in die Fibrillenstruktur von 10Ala-CspB vermuten ließen. Das Tryptophan von CspB befindet sich in dieser Fusion an Position 41 und ist daher im Grenzbe-reich der proteolyse-geschützten Sequenz.

## 4 Diskussion

### 4.1 Poly-alanin-abhängige Fibrillenbildung

Expansionen von Poly-Alanin-Sequenzen führen zu einer Reihe von Krankheiten. Da nahezu alle betroffenen und krankheitsassoziierten Proteine Transkriptionsfaktoren darstellen, ist es nicht erstaunlich, dass das Krankheitsbild meist durch Entwicklungsstörungen und Missbildungen geprägt ist (siehe *Review* (Albrecht & Mundlos, 2005)). Nähere Analysen bezüglich des Einflusses der Poly-Alanin-Expansionen auf die Transkriptionsfaktoren haben gezeigt, dass die Expansionen zu einer Aggregation der Proteine führen (Albrecht *et al.*, 2004; Caburet *et al.*, 2004; Nasrallah *et al.*, 2004). Die resultierenden Krankheiten beruhen daher vermutlich auf Proteinmissfaltungen. Intranukleäre fibrilläre Proteinablagerungen in Muskelfasern sind das pathologische Merkmal der einzigen bisher bekannten poly-alanin-assoziierten Krankheit, dessen betroffenes Protein kein Transkriptionsfaktor ist, OPMD (Okulopharyngeale Muskeldystrophie) (Tomé & Fardeau, 1980). Das von der Poly-Alanin-Expansion betroffene und für OPMD verantwortliche Protein PABPN1 war Ausgangspunkt dieser Arbeit. In früheren Analysen konnte gezeigt werden, dass die intranukleären Proteinablagerungen von OPMD-Patienten hauptsächlich PABPN1 enthielten (Becher *et al.*, 2000; Calado *et al.*, 2000b; Uyama *et al.*, 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Expansion der Poly-Alanin-Sequenz die Aggregation von PABPN1 und eine erhöhte Zelltodrate zur Folge hat (Shanmugam *et al.*, 2000; Fan *et al.*, 2001; Bao *et al.*, 2002). Für die isolierte N-terminale Domäne von PABPN1 wurde in Abhängigkeit von der Anwesenheit der Poly-Alanin-Sequenz die Bildung fibrillärer Strukturen gezeigt, welche alle wesentlichen Kriterien amyloider Fibrillen erfüllten (Scheuermann *et al.*, 2003). Trotz der unklaren Rolle der Proteinablagerungen (Ursache, Folge oder Begleiterscheinung) bei der Krankheitsentstehung, wird OPMD ebenfalls als Protein-Missfaltungskrankheit betrachtet (siehe auch *Review* (Abu-Baker & Rouleau, 2007)).

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse bestätigen einen Zusammenhang von Poly-Alanin-Expansionen, als Bestandteil eines ursprünglich nativ, stabil gefalteten Proteins, und der Entstehung von Proteinmissfaltungen (siehe auch (Sackewitz *et al.*, 2008b)). So wurde analog der Arbeiten von T. Scheuermann und G. Lodderstedt (Scheuermann *et al.*, 2003; Lodderstedt *et al.*, 2007) eine von der Anwesenheit der Poly-Alanin-Sequenz abhängige Fibrillenbildung der N-terminalen Domäne von PABPN1 beobachtet. Die Fusion der Domänen mit dem stabil gefalteten Protein CspB (Kälteschockprotein B aus *B. subtilis*) führte weder zum Verlust

der nativen Struktur von CspB noch verhinderte sie eine Fibrillierung. Überraschenderweise enthielten selbst die Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB natives CspB. Dies könnte im Umkehrschluss bedeuten, dass die Bildung intranukleärer PABPN1-Ablagerungen in den Muskelfasern von OPMD-Patienten nicht notwendigerweise zur Entfaltung des gesamten Proteins und einem daraus folgenden Funktionsverlust führt. Ein deutliches Indiz dafür ist die in den intranukleären Ablagerungen von Patienten gefundene polyadenylierte RNA (Calado *et al.*, 2000b). So könnte vielmehr die Einlagerung von PABPN1 in eine makromolekulare Struktur und die damit verbundene Verringerung der Konzentration an löslichem Protein zur Funktionsstörung führen.

Die direkten Fusionen aus Poly-Alaninen (10 oder 17 Alanine) und CspB enthielten ebenfalls natives CspB und zeigten nach Inkubation eine Proteinmissfaltung. Kurz nach Beginn der Inkubation wurden bei beiden Proteinen amorphe Zusammenlagerungen beobachtet. Nach einer längeren Inkubation konnten eindeutige Fibrillen mit amyloiden Eigenschaften jedoch nur für 10Ala-CspB nachgewiesen werden. Die Fibrillierung von 10Ala-CspB hatte den Verlust der nativen Struktur von CspB zur Folge.

Trotz der auch bei den „direkten Fusionen“ nachgewiesenen Missfaltung der Proteine nach Inkubation, zeigen sowohl die Missfaltungen (Fibrillierung) selbst als auch die resultierenden Fibrillen Unterschiede zu den Fusionen der N-terminalen Domänen und CspB. Das Auftreten amorpher Strukturen, der Verlust der nativen Struktur von CspB in den Fibrillen und auch die geringere Stabilität der Fibrillen von 10Ala-CspB gegenüber GdmCl deuten einen veränderten Fibrillierungsmechanismus und eine veränderte Fibrillenstruktur beider Fusionstypen an. Eine Erklärung für diese Unterschiede könnte in der unterschiedlichen Stabilität von CspB in den löslichen Fusionen, aber auch der unterschiedlichen Primärsequenz beider Fusionstypen liegen. So wurden in ersten Festkörper-NMR-Analysen der Fibrillen von N-(+7)Ala neben der Poly-Alanin-Sequenz mindestens auch Glycin-Reste in einer rigiden Struktur nachgewiesen (Sackewitz *et al.*, 2008a). Die hier dargestellten Proteolyse-Experimente mit den fibrillierten Fusionen deuten außerdem an, dass N- und C-terminale Bereiche der Poly-Alanin-Sequenz ebenfalls an der  $\beta$ -Cross-Struktur beteiligt sein könnten. Der Einfluss der Stabilität der Proteine und der Aminosäuresequenz der die Poly-Alanine umgebenden Bereiche könnte erklären, warum manche Proteine im nativen Zustand 17 (RUNX2) bzw. 20 Alanine (PHOX2B) in einem Poly-Alanin-Segment besitzen, während eine solche Zahl aufeinander folgender Alanine bei anderen Proteinen bereits zur Ausbildung der Krankheit führt (HOXD13, PABPN1) (siehe auch *Review* (Albrecht & Mundlos, 2005)).

Generell ist anzunehmen, dass Poly-Alanine, bei einer geringen thermodynamischen Stabilität des umgebenden Proteins, aufgrund ihres aliphatischen Charakters eine starke Tendenz zur Zusammenlagerung und Abschirmung gegenüber einer wässrigen Umgebung besitzen. So konnte

bereits die Fibrillenbildung poly-alanin-basierter Peptide gezeigt werden (Blondelle *et al.*, 1997; Shinchuk *et al.*, 2005). Vermutlich bildet diese Tendenz zur Zusammenlagerung „nicht stabilisierter“ Poly-Alanin-Sequenzen die molekulare Grundlage der poly-alanin-induzierten Proteinmissfaltungs-Krankheiten. In Abhängigkeit von der Stabilität des umgebenden Proteins und der Anzahl an Alaninen im Poly-Alanin-Segment könnte eine Fibrillenbildung oder Missfaltung der entsprechenden Proteine induziert werden.

## 4.2 Artificielle Fusionen zur Analyse amyloider Strukturen

Die Analyse des Fibrillierungsverhaltens der Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 und CspB zeigte, dass die Verknüpfung einer amyloidogenen Proteinsequenz mit einem stabil gefalteten Protein zur *in vitro*-Fibrillenbildung des gesamten Konstruktes führt. Vergleichbare Ergebnisse wurden bereits beschrieben (Baxa *et al.*, 2003; Caine *et al.*, 2007; Dong *et al.*, 2007; Ignatova *et al.*, 2007). In vielen Analysen wurden amyloidogene Proteine oder Peptide C- oder N-terminal mit GFP (*Green Fluorescent Protein*) verknüpft. GFP fungierte in den Untersuchungen meist als *Marker* für eine Analyse der Fibrillenbildung *in vivo* (Patino *et al.*, 1996; Furlong *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2002; Caine *et al.*, 2007). So wurden auch Fusionen aus GFP und C-terminal lokalisierten Poly-Alaninen in Zellkulturexperimenten genutzt, um poly-alanin-abhängige Proteinablagerungen und eine daraus resultierende erhöhte Zelltodrate nachzuweisen (Rankin *et al.*, 2000; Bao *et al.*, 2002; Wang & Monteiro, 2007). Ähnliche Experimente wurden mit PABPN1 und dessen krankheitsassoziierten, Poly-Alanin-Expansionen enthaltenden Varianten durchgeführt (Fan *et al.*, 2001; Bao *et al.*, 2002). Eine *ex vivo* biophysikalische Charakterisierung der Fibrillen der Fusionen mit GFP wurde in keiner der erwähnten Analysen beschrieben. In einem von der Arbeitsgruppe von Hecht entwickelten Test wurden Fusionen aus A $\beta$ <sub>1-42</sub> und GFP (C-terminal) zur Detektion von fibrillierungsinhibierenden Substanzen und Mutationen in A $\beta$ <sub>1-42</sub> genutzt (Wurth *et al.*, 2002; Kim & Hecht, 2005; Kim *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Analysen bildete hier die gestörte Faltung von GFP, hervorgerufen durch die Fibrillierung, die Grundlage des Tests (Waldo *et al.*, 1999; Wurth *et al.*, 2002). Baxa und Mitarbeiter konnten *in vitro* die Fibrillenbildung von Fusionen der fibrillenbildenden N-terminalen Domäne von Ure2p mit verschiedenen globulären Proteinen wie Barnase, GFP u.a. (C-terminal lokalisiert) nachweisen (Baxa *et al.*, 2002; Baxa *et al.*, 2003). Ure2p ist ein Prionprotein aus *S. cerevisiae*, dessen fibrilläre Konformation vermutlich für den Phänotyp [URE3] der Hefe verantwortlich ist (Lacroute, 1971; Wickner, 1994; Masison & Wickner, 1995; Taylor *et al.*, 1999). Zwar wurde von der Arbeitsgruppe von Melki eine nicht amyloide

Assoziation von Ure2p vorgeschlagen (Bousset *et al.*, 2002; Bousset *et al.*, 2003; Bousset *et al.*, 2004; Fay *et al.*, 2005; Redeker *et al.*, 2007), dennoch konnten durch Baxa amyloidtypische Eigenschaften der Fibrillen von Ure2p und der Fibrillen der Fusionen der N-terminalen Domäne von Ure2p und der verschiedenen globulären Proteine nachgewiesen werden (Baxa *et al.*, 2003). Weiterhin postulierten Baxa und Mitarbeiter für die analysierten Fusionen die Koexistenz einer  $\beta$ -Cross-Struktur und einer stabil gefalteten Domäne (Baxa *et al.*, 2002; Baxa *et al.*, 2003). Eine solche Koexistenz wurde auch für die Fibrillen der N-terminalen Domänen und CspB gezeigt (siehe 3.7.3). Der Nachweis nativ gefalteter Strukturen neben der  $\beta$ -Cross-Struktur in der Fibrille deckt sich mit den häufig gefundenen proteolysegeschützten Fibrillenkernstrukturen, welche meist ausschließlich die amyloidogene Peptidsequenz umfassen (siehe 4.3).

Da für Poly-Alanin-Peptide eine Fibrillenbildung gezeigt werden konnte (Blondelle *et al.*, 1997; Shinchuk *et al.*, 2005), war zu vermuten, dass eine Fusionierung von Poly-Alaninen und CspB ebenfalls zur Fibrillenbildung des gesamten Konstruktes führen würde. Eine Fibrillenbildung konnte eindeutig jedoch nur für 10Ala-CspB gezeigt werden. Die Fibrillenbildung von 10Ala-CspB war begleitet von der Bildung amorpher Strukturen. Außerdem scheint für die Fibrillierung von 10Ala-CspB eine Entfaltung von CspB notwendig zu sein (siehe 3.8.3). Die direkte Fusion von amyloidogener Sequenz und gefaltetem Protein führte bei 10Ala- und 17Ala-CspB offensichtlich zu einer, im Vergleich zu den Fusionen der N-terminalen Domänen und CspB, veränderten Fibrillenbildung einerseits und zur Entfaltung von CspB durch die Fibrillierung andererseits.

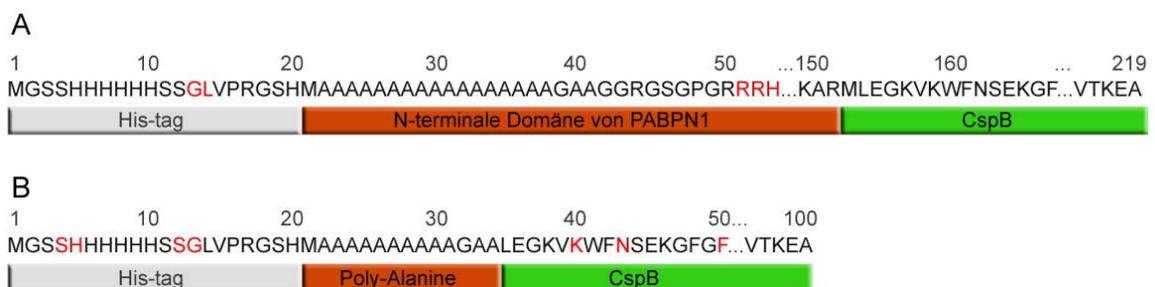
Die hier erzielten Ergebnisse zeigen, dass eine Verknüpfung einer amyloidogenen Peptidsequenz mit einem stabil gefalteten Protein zur Fibrillenbildung der gesamten Fusion führen kann, jedoch nicht notwendigerweise die Entfaltung des globulären Proteins hervorrufen muss.

### **4.3 Proteolyseresistenz und native Faltung innerhalb amyloider Fibrillen**

Wie unter 4.2 bereits angedeutet, muss die Fibrillenbildung eines amyloidogenen Proteins nicht notwendigerweise mit einer Konformationsänderung des gesamten Proteins einhergehen. Vielmehr scheint die Existenz amyloidogener Sequenzen innerhalb der Proteine die  $\beta$ -Cross-Struktur zu determinieren. Liegen diese amyloidogenen Sequenzen strukturell unabhängig und sterisch ungehindert von anderen Bereichen (Domänen) des Proteins vor, durchlaufen vermutlich ausschließlich die amyloidogenen Peptidsequenzen eine Konformationsänderung, während die übrigen Peptidsequenzen in ihrer ursprünglichen Konformation verbleiben. Einen deutlichen Hinweis für diese Annahme bilden die in Proteolyse-Experimenten gefundenen „Fibrillenkern-

sequenzen“ (Kheterpal *et al.*, 2001; Miake *et al.*, 2002; Balguerie *et al.*, 2003; Baxa *et al.*, 2003; Bocharova *et al.*, 2005; Monti *et al.*, 2005; Frare *et al.*, 2006). So bezieht sich die für amyloide Strukturen häufig beschriebene Proteolyseresistenz (McKinley *et al.*, 1983; Polverino de Laurento *et al.*, 2003) nicht auf das gesamte Protein, sondern lediglich auf einen bestimmten Bereich, welcher die amyloidogene Peptidsequenz umfasst. Die Existenz vieler mittels Proteolyse bestimmter „Fibrillenkernsequenzen“ konnte durch H/D-Austausch-Experimente bestätigt werden (Kheterpal *et al.*, 2000; Hoshino *et al.*, 2002; Kheterpal *et al.*, 2003; Nazabal *et al.*, 2003). So wurde beispielsweise die C-terminale Domäne des HET-s-Proteins, einem Prion des filamentösen Pilzes *Podospira anserina* (Coustou *et al.*, 1997; Coustou-Linares *et al.*, 2001; Dos Reis *et al.*, 2002), sowohl durch Proteolyse (Balguerie *et al.*, 2003) als auch über H/D-Austausch (Nazabal *et al.*, 2003) als amyloidogene Sequenz des Proteins identifiziert. Die „Fibrillenkernsequenz“ des amyloiden Zustandes von  $\beta$ 2-Mikroglobulin wurde ebenfalls mittels Proteolyse (Monti *et al.*, 2005) und H/D-Austausch bestimmt (Hoshino *et al.*, 2002).

Die Behandlung der Fibrillen der Fusionsproteine N-(+7)Ala-CspB und 10Ala-CspB mit Thermolysin und Proteinase K führte zu von den Monomeren verschiedenen Schnittmustern. Analog der in der Literatur beschriebenen und oben diskutierten Ergebnisse konnten auch für die Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB und 10Ala-CspB proteolyseresistente „Fibrillenkernsequenzen“ gefunden werden. Die „Fibrillenkernsequenzen“ sind in Abbildung 4.1 dargestellt.



**Abbildung 4.1** Schematische Darstellung der proteolyseresistenten „Fibrillenkernsequenzen“ der Fibrillen von (A) N-(+7)Ala- und (B) 10Ala-CspB. Die rot gekennzeichneten Aminosäuren markieren den Anfang und das Ende der proteolysegeschützten Bereiche. Die experimentelle Durchführung ist in 2.5.4 und 2.4.7 beschrieben.

Die „Fibrillenkernsequenzen“ beinhalten für beide Proteine die Poly-Alanin-Sequenz, erstrecken sich jedoch N- und C-terminal darüber hinaus. Dies könnte implizieren, dass nicht allein die Poly-Alanine die amyloidogene Sequenz bilden und könnte daher die unterschiedlichen Eigenschaften (Stabilität, Fibrillierungskinetik) der Fibrillen erklären. So wurden auch in ersten Festkörper-NMR-Analysen der Fibrillen von N-(+7)Ala neben der Poly-Alanin-Sequenz mindestens noch Glycin-Reste in einer rigiden Umgebung lokalisiert sind (Sackewitz *et al.*, 2008a).

Möglicherweise konnten bei den Proteolyse-Experimenten aber auch kleinere Fragmente (< 1000 Da) auf Grund experimenteller Limitierungen nicht nachgewiesen werden.

Die proteolyseresistenten Segmente von N-(+7)Ala-CspB und 10Ala-CspB erklären auch die unterschiedliche Aktivität von CspB in den Fibrillen der Proteine. Da die „Fibrillenkernsequenz“ im Fall von N-(+7)Ala-CspB mindestens ca. 70 Aminosäuren vor dem CspB-Molekül endet, ist es nicht erstaunlich, dass der Hauptanteil der Moleküle auch im fibrillären Zustand nativ gefaltet vorliegt. Im Gegensatz dazu umfasst die proteolysegeschützte Sequenz in den Fibrillen von 10Ala-CspB auch den N-Terminus von CspB. Folglich liegt CspB in den Fibrillen nicht mehr im nativen Zustand vor.

Der Nachweis nativer, globulärer Strukturen innerhalb der Fibrillen, wie im Fall von N-(+7)Ala-CspB, stützt die These der Existenz von „Fibrillenkernsequenzen“. Wie unter 4.2 bereits beschrieben, konnten aktive oder zumindest partiell aktive, globuläre Proteine in den Fusionen der amyloidogenen N-terminalen Sequenz von Ure2p mit verschiedenen globulären Proteinen gefunden werden (Baxa *et al.*, 2002; Baxa *et al.*, 2003). Ähnliche Ergebnisse, globulärer Strukturen innerhalb der Fibrille, wurden auch für die Fibrillen von Sup35p, einem Prion aus *S. cerevisiae*, nachgewiesen (Krzewska *et al.*, 2007) und für die Fibrillen von  $\beta$ 2-Mikroglobulin zumindest postuliert (Ivanova *et al.*, 2004). Der trotz der vorhandenen nativen Strukturen auftretende Funktionsverlust der fibrillierten Proteine wird meist mit einer sterischen Blockade erklärt, welche beispielsweise eine funktionsvermittelnde Wechselwirkung mit anderen globulären Proteinen verhindert. Von der Arbeitsgruppe von Eisenberg wurde enzymatisch aktive RNase A im fibrillären Zustand des mit einem amyloiden Peptid erweiterten Enzyms gefunden (Sambashivan *et al.*, 2005). Diese Experimente stellen jedoch einen Sonderfall dar, da die Fibrillierung auf einem erweiterten „Domain Swapping“ und einer artifiziellen Verlängerung des domänenverbindenden *Linkers* mit einem amyloiden Peptid beruht. Die Bildung amyloider Fibrillen über den Mechanismus eines erweiterten „Domain Swappings“ konnten auch für die *in vitro* gebildeten Fibrillen der T7 Endonuklease I (Guo & Eisenberg, 2006) und des humanen Cystatin C (Wahlbom *et al.*, 2007) nachgewiesen werden.

Der Nachweis proteolyseresistenter „Fibrillenkernsequenzen“, bestehend aus den entsprechenden amyloidogenen Peptidsequenzen der amyloidogenen Proteine, deutet an, dass eine prinzipielle Koexistenz von  $\beta$ -Cross-Struktur und parallelen Strukturen innerhalb amyloider Fibrillen möglich ist. Gestützt wird diese Hypothese durch erste Nachweise nativ gefalteter Domänen innerhalb amyloider Fibrillen. Limitierende Faktoren für die Koexistenz beider Strukturen innerhalb der Fibrille werden vermutlich die strukturelle Abhängigkeit und die Distanz der Strukturen zueinander und die dadurch möglicherweise verursachte sterische Hinderung darstellen.

## 4.4 Einfluss der Thermodynamik auf die Bildung amyloider Fibrillen

Der Bildung der charakteristischen  $\beta$ -Cross-Struktur eines amyloidogenen Proteins liegt eine Konformationsänderung der nativen Struktur des Proteins bzw. amyloidogenen Peptids zugrunde. Das Peptidgerüst des amyloidogenen Peptids fungiert hierbei als Matrix für die intermolekularen Wechselwirkungen der resultierenden erweiterten  $\beta$ -Faltblattstrukturen der Fibrillen. Weiterhin wechselwirken die  $\beta$ -Faltblätter innerhalb der Protofilamente einer Fibrille miteinander. Betrifft die Konformationsänderung stabil gefaltete Bereiche des Proteins oder werden diese durch die Fibrillierung sterisch beeinträchtigt, kommt der thermodynamischen Stabilität eine wesentliche Bedeutung bei der Fibrillenbildung zu. Vermutlich müssen die stabil gefalteten Bereiche (partiell) entfaltet werden, bevor sie eine Konformationsänderung durchlaufen können. Da der native Zustand eines Proteins lediglich ein thermodynamisches Gleichgewicht abbildet, variiert das Verhältnis gefalteter und ungefalteter Spezies bei Proteinen mit unterschiedlichen thermodynamischen Stabilitäten. Die effektive Konzentration an „fibrillierungskompetenten“ ungefalteten oder partiell gefalteten Proteinen (Faltungsintermediaten) wird bei thermodynamisch weniger stabilen Proteinen höher sein und daher eine Fibrillenbildung fördern.

Für Transthyretin (TTR) beispielsweise, dessen Wildtyp für die ab dem sechzigsten Lebensjahr auftretende SSA (*Senile Systemic Amyloidosis*) und dessen Mutanten für zahlreiche früh auftretende familiäre Amyloidosen verantwortlich sind, konnte gezeigt werden, dass alle mit Amyloidosen assoziierten Mutanten eine zum Wildtyp verringerte Stabilität aufweisen (McCutchen *et al.*, 1993; McCutchen *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 2001; Hammarström *et al.*, 2002; Sekijima *et al.*, 2003). Die native Struktur und die Aktivität der Varianten hingegen bleiben von den Mutationen weitgehend unbeeinflusst (Hornberg *et al.*, 2000). Es scheint ein direkter Zusammenhang zwischen der Stabilität der Varianten von TTR und dem Alter der Patienten bei Einsetzen der Krankheit zu bestehen (McCutchen *et al.*, 1995; Kelly, 1996; Hammarström *et al.*, 2002). Eine erste ausführliche thermodynamische Analyse aller Stufen des komplexen Faltungsmechanismus, bestehend aus mindestens drei Spezies (Tetramer, Monomer, entfaltetes Monomer), von TTR und verschiedener TTR-Mutanten, wurde erst kürzlich publiziert (Hurshman Babbes *et al.*, 2008). Weiterhin konnten Substanzen bzw. TTR-Varianten gefunden werden, die über eine spezifische Bindung bzw. den Einbau in die Tetramere der amyloidogenen TTRs zu einer thermodynamischen oder kinetischen Stabilisierung und einer Inhibierung der Fibrillenbildung führten (McCutchen *et al.*, 1995; Hammarström *et al.*, 2003; Sekijima *et al.*, 2003; Sekijima *et al.*, 2006).

Ähnliche Ergebnisse wurden für Lysozym und dessen für vererbte systemische Amyloidosen verantwortlichen Mutanten (Pepys *et al.*, 1993; Valleix *et al.*, 2002; Yazaki *et al.*, 2003) gefunden. Die krankheitsassoziierten Lysozymvarianten weisen eine zum Wildtyp verringerte Thermostabilität und eine verringerte Kooperativität auf, was die Populierung von partiell entfaltenen Intermediaten unter physiologischen Bedingungen zur Folge hat. Die Intermediate bilden die Vorstufe der amyloiden Fibrillen von Lysozym *in vitro* (Booth *et al.*, 1997; Canet *et al.*, 1999; Morozova-Roche *et al.*, 2000; Canet *et al.*, 2002; Dumoulin *et al.*, 2005; Kumita *et al.*, 2006). Struktur und Aktivität der Lysozymvarianten bleiben im Vergleich zum Wildtyp weitgehend unbeeinflusst (Booth *et al.*, 1997; Esposito *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2005). Die Herabsetzung der Stabilität von Wildtyp-Lysozym (pH 2;  $T > 50$  °C), welches mit keiner amyloidogenen Krankheit assoziiert ist, führte zur Fibrillenbildung des Proteins und bestätigt die Abhängigkeit der Fibrillenbildung von der Stabilität des Proteins (Morozova-Roche *et al.*, 2000). Durch die Bindung der destabilisierten Varianten an ein gegen Lysozym gerichtetes Antikörperfragment konnte die Destabilisierung aufgehoben und die ursprüngliche Kooperativität wieder hergestellt werden. Auf diese Weise wurde die Fibrillenbildung der amyloidogenen Varianten inhibiert (Dumoulin *et al.*, 2003).

Die hier exemplarisch erwähnten Abhängigkeiten der Fibrillenbildung von der thermodynamischen Stabilität stabil gefalteter, amyloidogener Proteine können vermutlich als allgemein gültig betrachtet werden (siehe auch *Reviews* (Kelly, 1996, 1998; Uversky & Fink, 2004; Khare & Dokholyan, 2007)). Als Folge dessen wird die  $\beta$ -Cross-Struktur mittlerweile als allgemein anerkannter, alternativer Faltungszustand von Proteinen unter destabilisierenden Bedingungen diskutiert (Dobson, 1999, 2004; Dumoulin *et al.*, 2006). So konnten auch nicht krankheitsassoziierte Proteine wie Myoglobin (Fändrich *et al.*, 2001) oder Phosphoglycerat-Kinase (Damaschun *et al.*, 2000) *in vitro* fibrilliert werden. Die Behandlung des Peptids 1-22 von CspB mit Acetonitril führte ebenfalls zur Bildung amyloider Fibrillen (Gross *et al.*, 1999; Wilkins *et al.*, 2000). Die Tatsache, dass viele amyloidogene Proteine „nativ ungefaltet“ vorliegen (A $\beta$ -Peptide,  $\alpha$ -Synuclein, Amylin, etc.) bzw. die amyloidogenen Peptide im nativen Zustand häufig unstrukturiert sind (HETs, Ure2p, Sup35p, etc.), stützt diese These.

Die N-terminale Domäne von PABPN1 ist ebenfalls „nativ ungefaltet“ und besitzt einen geringen Sekundärstrukturanteil (Scheuermann, 2003; Lodderstedt *et al.*, 2008). Da die Fibrillen der Fusion N-(+7)Ala-CspB vorwiegend natives CspB besaßen, ist eine Entfaltung von CspB als Ausgang für die Fibrillenbildung auszuschließen. Die thermodynamische Stabilität von CspB wird auf die Fibrillenbildung der Fusion kaum Einfluss haben. Im Gegensatz dazu besitzen die Fibrillen von 10Ala-CspB kein natives CspB. Der Fibrillenbildung geht vermutlich eine Entfaltung von CspB voraus. Daher ist anzunehmen, dass die stark verringerte Stabilität der „direkten

Fusionen“ im löslichen Zustand, im Vergleich zum nicht fusionierten CspB, eine Fibrillenbildung der Varianten begünstigt. Tatsächlich wurde im Vergleich zu den entsprechenden Fusionen der kompletten N-terminale Domäne und CspB ein früher auftretender ANS-Fluoreszenz-Anstieg beobachtet. Die Existenz von präfibrillären Aggregaten, insofern diese im direkten Zusammenhang mit der Fibrillenbildung stehen, deutet jedoch einen veränderten Fibrillierungsprozess an. Die Tatsache, dass die Fibrillenbildung durch die Zugabe von dT7 inhibiert werden konnte, bestätigt den Einfluss der thermodynamischen Stabilität auf die Fibrillierung der Fusionen. Die Ergebnisse konnten in einer von R. Winter durchgeführten und von mir betreuten Diplomarbeit bestätigt werden (Winter, 2008). In der Arbeit wurde das Fibrillierungsverhalten „direkter Fusionen“, welche ein um ca. 10 kJ/mol (im Vergleich zum Wildtyp) stabileres CspB-Molekül (A46K/S48R) (Wunderlich *et al.*, 2005) enthielten, analysiert. Die stabilere CspB-Variante verhinderte eine Fibrillenbildung der Fusionen (Winter, 2008).

Trotz des Einflusses der Stabilität auf die Fibrillenbildung der Fusionen, scheint die Zahl der Alanine im Poly-Alanin-Segment ebenfalls entscheidend zu sein. So zeigte die Fusion 17Ala-CspB, bei gleicher Stabilität, einen früheren Anstieg der ANS-Fluoreszenz als die Fusion 10Ala-CspB. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Fibrillenbildung für 17Ala-CspB nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte.

## 4.5 Induktion der Fibrillenbildung durch *Seeding* und *Cross-Seeding*

Eine durch *Seeds* (fragmentierte Fibrillen) induzierte, beschleunigte Fibrillenbildung konnte für die meisten amyloidogenen Proteine nachgewiesen werden und gilt daher als eines der wesentlichen Charakteristika amyloider Fibrillen (Jarrett & Lansbury, 1993; Harper & Lansbury, 1997; Westermarck, 2005). Auch die Fibrillenbildung der N-terminalen Domänen von PABPN1 (N-(+7)Ala und N-WT) konnte durch die Zugabe homologer *Seeds* induziert werden (Scheuermann, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde die durch *Seeds* induzierte Fibrillenbildung für N-(+7)Ala-CspB und 10Ala-CspB nachgewiesen. Ein deutlicher Hinweis, dass es sich bei den fibrillären Strukturen der Fusionen tatsächlich um amyloide Strukturen handelt. Aufgrund der langen Fibrillierungszeiten und der geringen Konzentration an Fibrillen wurde auf eine Analyse des *Seedings* von N-WT-CspB verzichtet. Es ist jedoch davon auszugehen, dass ein *Seeding* auch für diese Fusion möglich ist. Da für 17Ala-CspB keine eindeutigen fibrillären Strukturen nachgewiesen werden konnten, entfiel hier die Analyse eines *Seedings*.

Die Induktion der Fibrillenbildung durch fragmentierte Fibrillen eines anderen Proteins (heterologe *Seeds*) bezeichnet man als *Cross-Seeding*. Die Voraussetzungen, die die Aminosäurese-

quenzen der amyloidogenen Proteine für ein erfolgreiches *Cross-Seeding* erfüllen müssen, werden in der Literatur kontrovers diskutiert und erscheinen momentan unklar (siehe unten). Da die Faltblätter der amyloiden  $\beta$ -*Cross*-Struktur durch die Wasserstoffbrücken des Peptidrückgrats gebildet werden, sollte theoretisch die Länge, jedoch nicht die Aminosäuresequenz der amyloidogenen Sequenzen, Einfluss auf die heterologe Assemblierung der  $\beta$ -Stränge haben. Die Seitenketten der Aminosäuren können jedoch die  $\beta$ -Faltblätter durch zusätzliche Wasserstoffbrücken stabilisieren, womit die Häufigkeit von Glutamin- und Asparagin-Resten in amyloidogenen Peptiden erklärt wird (Perutz *et al.*, 1994; Nelson *et al.*, 2005). In der Regel sollten die Seitenketten allerdings eher für die Interaktion der Faltblätter untereinander (Protofilament) wichtig sein. Die Arbeitsgruppe von Eisenberg zeigte kürzlich, dass die Seitenketten zwischen den Faltblättern sterisch genau passen müssen, um einen „*Dry Steric Zipper*“ zu bilden (Nelson *et al.*, 2005; Sawaya *et al.*, 2007). Ein ähnlicher biophysikalischer Charakter der Seitenketten, wie im Fall der Poly-Alanine (aliphatisch), könnte eine Wechselwirkung der Faltblätter untereinander begünstigen.

Die Notwendigkeit einer hohen Sequenzidentität für ein effizientes *Cross-Seeding* wurde beispielsweise anhand der Fibrillierung von Hühner-Lysozym gezeigt (Krebs *et al.*, 2004). Unabhängig von der Strukturähnlichkeit der nativen Proteine sank die *Seeding*-Effizienz mit Abnahme der Sequenzidentität der Proteine (Krebs *et al.*, 2004). Ähnliche Ergebnisse wurden für die Fibrillierung von humanem Lysozym und dessen krankheitsassoziierten Varianten (Morozova-Roche *et al.*, 2000), von CsgA, dem Hauptbestandteil der amyloiden Curli-Fasern aus *E. coli*, (Wang & Chapman, 2008) oder auch Huntingtin, dem für die Huntingtonsche Krankheit verantwortlichen Protein (Busch *et al.*, 2003), gefunden. Von der Gruppe von Wetzel dagegen wurde gezeigt, dass *Cross-Seeding* ein nicht vorhersagbarer Prozess ist (O'Nuallain *et al.*, 2004). In den Analysen wurde die Fibrillierung von IAPP (*Islet Amyloid Polypeptide*), auch als Amylin bekannt, einem mit Diabetes Mellitus (Typ II) assoziiertem, amyloidogenen Peptid, durch *Seeds* von  $A\beta_{1-40}$  induziert. Das *Cross-Seeding* wurde mit der hohen Sequenzhomologie beider Peptide erklärt. Überraschenderweise war ein umgekehrtes *Cross-Seeding* nahezu unmöglich. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Punktmutationen in  $A\beta_{1-40}$  ausreichten, um ein *Seeding* von  $A\beta_{1-40}$  mit den Mutanten zu verhindern (O'Nuallain *et al.*, 2004). Eine von der Sequenzidentität und von der für Prionproteine charakteristischen Spezies-Barriere unabhängige *Cross-Seeding*-Reaktion konnte auch für die Prionproteine aus Hamster und Maus gefunden werden (Makarava *et al.*, 2007).

Die kontroversen Daten bezüglich des Einflusses der Sequenzidentität der amyloidogenen Proteine auf ein erfolgreiches *Cross-Seeding* lassen sich am Beispiel des Hefe-Prionproteins

Sup35p gut verfolgen. So wurde erst kürzlich gezeigt, dass die Fibrillierung, der für den amyloiden Zustand von Sup35p verantwortlichen Domäne (NM), eine spezifische Aminosäuresequenz erfordert (Tessier & Lindquist, 2007). Dies erklärt das nicht funktionierende *Cross-Seeding* und die Spezies-Barriere des Prionzustands von Sup35p aus *S. cerevisiae* und den entsprechenden Homologen anderer Hefe-Spezies (Santoso *et al.*, 2000; Chien *et al.*, 2003). Andererseits wurde gezeigt, dass die Primärsequenz der NM-Domäne nicht entscheidend für die Bildung des Prionzustands von Sup35p ist (Ross *et al.*, 2005). Außerdem konnte ein *Cross-Seeding* zwischen der NM-Domäne von Sup35p und der für den Prionzustand verantwortlichen Domäne von Rnq1, eines weiteren Prions aus *S. cerevisiae*, nachgewiesen werden (Vitrenko *et al.*, 2007). Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse aus *Seeding-* und *Cross-Seeding*-Experimenten sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

**Tabelle 4.1** Übersicht über *Seeding-* und *Cross-Seeding*-Experimente

	<i>Seeds</i> von N-(+7)Ala-CspB	<i>Seeds</i> von 10Ala-CspB
N-ΔAla-CspB	-	n.b.
N-WT-CspB	-	n.b.
N-(+7)Ala-CspB	+	n.b.
10Ala-CspB	+	+
17Ala-CspB	-	-

n. b. nicht bestimmt, + (*Cross-*) *Seeding* möglich, - (*Cross-*) *Seeding* nicht möglich

Ähnlich den aus der Literatur bekannten Analysen anderer Proteine ist auch hier kein eindeutiger Trend erkennbar. So ist ein *Cross-Seeding* zwischen den, bezüglich der Primärsequenz, sehr ähnlichen Fusionen N-(+7)Ala-CspB und N-WT-CspB einerseits und den Fusionen 10Ala-CspB und 17Ala-CspB andererseits nicht möglich. Eine Tatsache, die mit der unterschiedlichen Zahl an Alaninen im Poly-Alanin-Segment erklärt werden könnte, jedoch im Gegensatz zu den Ergebnissen der Analysen der N-terminalen Domänen von PABPN1 (Lodderstedt *et al.*, 2007) steht. Ein *Cross-Seeding* zwischen den unterschiedlichen Fusionstypen zeigte überraschenderweise, dass *Seeds* der Variante N-(+7)Ala-CspB eine Fibrillierung der Fusion 10Ala-CspB, aber nicht der Fusion 17Ala-CspB induzieren können. Die Varianten N-(+7)Ala-CspB und 10Ala-CspB besitzen jedoch sehr unterschiedliche Eigenschaften. Sie teilen weder die Zahl an Alaninen im Poly-Alanin-Segment noch zeigen sie eine hohe Sequenzidentität. Die in dieser Arbeit durchgeführte Charakterisierung der Fibrillen von N-(+7)Ala-CspB und 10Ala-CspB zeigte außerdem, dass beide Fibrillentypen eine unterschiedliche Stabilität und ein unterschiedliches Fibrillierungsverhalten besitzen. Im Gegensatz zu N-(+7)Ala-CspB geht der Fibrillierung von

10Ala-CspB die Bildung amorpher Strukturen voraus und die Fibrillen besitzen kein natives CspB. Die Daten deuten an, dass die Fibrillen beider Fusionen eine unterschiedliche molekulare Struktur besitzen. Dementsprechend wäre eine Deutung der Ergebnisse der *Cross-Seeding*-Experimente in Bezug auf die Fibrillenstruktur und dem Fibrillierungsmechanismus der Varianten Spekulation.

## 5 Abkürzungen

10Ala-CspB	N-terminal um 10 Alanine erweitertes CspB
17Ala-CspB	N-terminal um 17 Alanine erweitertes CspB
Å	Angström
A $\beta$	Amyloid- $\beta$ -Peptid
ACN	Acetonitril
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i>
AU	<i>Arbitrary Units</i>
(m)A	(milli)Ampere
ANS	1-Anilino-8-naphthalensulfonsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
CD	Circulardichroismus
CspB	Kälteschockprotein B aus <i>Bacillus subtilis</i>
(k)Da	(kilo)Dalton
DHB	2, 5 Dihydroxybenzoesäure
(c)DNA	(Kopie-)Desoxyribonukleinsäure
(d)dNTP	(Di-) Desoxynukleosidtriphosphat
dT7	Oligonukleotid mit der Sequenz 5'-TTT TTT T-3'
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Elektronenmikroskop
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FT-IR	Fourier-Transformation-Infrarot
GdmCl	Guanidiniumchlorid
GdmSCN	Guanidiniumthiocyanat
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
h	Stunde
HCCA	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxymizinsäure
His-tag	Histidin-tag
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
J	Joule
K	Kelvin
kb	Kilobasen

l	Liter
(m)M	(milli)molar
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight</i>
min	Minute
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MW	molekulare Masse
N-ΔAla	N-terminale Domäne von PABPN1-ΔAla
N-WT	N-terminale Domäne von Wildtyp-PABPN1
N-(+7)Ala	N-terminale Domäne von PABPN1-(+7)Ala
N-ΔAla-CspB	N-terminale Domäne von PABPN1-ΔAla fusioniert mit CspB
N-WT-CspB	N-terminale Domäne von Wildtyp-PABPN1 fusioniert mit CspB
N-(+7)Ala-CspB	N-terminale Domäne von PABPN1-(+7)Ala fusioniert mit CspB
nm	Nanometer
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NTA	Nitritotri-Essigsäure
OD <sub>600</sub>	Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 600 nm
OPMD	Okulopharyngeale Muskeldystrophie
PABPN1	nukleäres Poly(A)-bindendes Protein 1
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylflourid
ppm	Anteil pro Million
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
RP-HPLC	<i>Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultra-violett
(k)V	(Kilo-)Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen

## 6 Literaturverzeichnis

- Abu-Baker, A. and Rouleau, G. A. 2007. *Biochim Biophys Acta* **1772**: 173-185.
- Albrecht, A. and Mundlos, S. 2005. *Curr Opin Genet Dev* **15**: 285-293.
- Albrecht, A. N., Kornak, U., Böddrich, A., Süring, K., *et al.* 2004. *Hum Mol Genet* **13**: 2351-2359.
- Alexandrescu, A. T. 2005. *Protein Sci* **14**: 1-12.
- Amiel, J., Trochet, D., Clément-Ziza, M., Munnich, A., *et al.* 2004. *Hum Mol Genet* **13 Spec No 2**: R235-243.
- Anfinsen, C. B. 1973. *Science* **181**: 223-230.
- Antzutkin, O. N., Balbach, J. J., Leapman, R. D., Rizzo, N. W., *et al.* 2000. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 13045-13050.
- Antzutkin, O. N., Balbach, J. J. and Tycko, R. 2003. *Biophys J* **84**: 3326-3335.
- Arispe, N., Pollard, H. B. and Rojas, E. 1993. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 10573-10577.
- Arispe, N., Pollard, H. B. and Rojas, E. 1996. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 1710-1715.
- Balbach, J. J., Petkova, A. T., Oyler, N. A., Antzutkin, O. N., *et al.* 2002. *Biophys J* **83**: 1205-1216.
- Balbirnie, M., Grothe, R. and Eisenberg, D. S. 2001. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 2375-2380.
- Baldwin, A. J., Bader, R., Christodoulou, J., MacPhee, C. E., *et al.* 2006. *J Am Chem Soc* **128**: 2162-2163.
- Balguerie, A., Dos Reis, S., Ritter, C., Chaignepain, S., *et al.* 2003. *Embo J* **22**: 2071-2081.
- Bao, Y. P., Cook, L. J., O'Donovan, D., Uyama, E., *et al.* 2002. *J Biol Chem* **277**: 12263-12269.
- Barnhart, M. M. and Chapman, M. R. 2006. *Annu Rev Microbiol* **60**: 131-147.
- Baskakov, I. V., Legname, G., Baldwin, M. A., Prusiner, S. B., *et al.* 2002. *J Biol Chem* **277**: 21140-21148.
- Baxa, U., Speransky, V., Steven, A. C. and Wickner, R. B. 2002. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 5253-5260.
- Baxa, U., Taylor, K. L., Wall, J. S., Simon, M. N., *et al.* 2003. *J Biol Chem* **278**: 43717-43727.
- Becher, M. W., Kotzok, J. A., Davis, L. E. and Bear, D. G. 2000. *Ann Neurol* **48**: 812-815.
- Bence, N. F., Sampat, R. M. and Kopito, R. R. 2001. *Science* **292**: 1552-1555.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D. and Lipp, P. 1998. *Nature* **395**: 645-648.
- Berson, J. F., Harper, D. C., Tenza, D., Raposo, G., *et al.* 2001. *Mol Biol Cell* **12**: 3451-3464.
- Berson, J. F., Theos, A. C., Harper, D. C., Tenza, D., *et al.* 2003. *J Cell Biol* **161**: 521-533.
- Bienroth, S., Keller, W. and Wahle, E. 1993. *Embo J* **12**: 585-594.
- Blake, C. and Serpell, L. 1996. *Structure* **4**: 989-998.
- Blondelle, S. E., Forood, B., Houghten, R. A. and Perez-Paya, E. 1997. *Biochemistry* **36**: 8393-8400.
- Bocharova, O. V., Breydo, L., Parfenov, A. S., Salnikov, V. V., *et al.* 2005. *J Mol Biol* **346**: 645-659.
- Bonar, L., Cohen, A. S. and Skinner, M. M. 1969. *Proc Soc Exp Biol Med* **131**: 1373-1375.

- Booth, D. R., Sunde, M., Bellotti, V., Robinson, C. V., *et al.* 1997. *Nature* **385**: 787-793.
- Bousset, L., Briki, F., Doucet, J. and Melki, R. 2003. *J Struct Biol* **141**: 132-142.
- Bousset, L., Redeker, V., Decottignies, P., Dubois, S., *et al.* 2004. *Biochemistry* **43**: 5022-5032.
- Bousset, L., Thomson, N. H., Radford, S. E. and Melki, R. 2002. *Embo J* **21**: 2903-2911.
- Brais, B. 2003. *Cytogenet Genome Res* **100**: 252-260.
- Brais, B., Bouchard, J. P., Xie, Y. G., Rochefort, D. L., *et al.* 1998. *Nat Genet* **18**: 164-167.
- Brinkmann, U., Mattes, R. E. and Buckel, P. 1989. *Gene* **85**: 109-114.
- Brown, P., Liberski, P. P., Wolff, A. and Gajdusek, D. C. 1990. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 7240-7244.
- Bucciantini, M., Calloni, G., Chiti, F., Formigli, L., *et al.* 2004. *J Biol Chem* **279**: 31374-31382.
- Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., *et al.* 2002. *Nature* **416**: 507-511.
- Busch, A., Engemann, S., Lurz, R., Okazawa, H., *et al.* 2003. *J Biol Chem* **278**: 41452-41461.
- Butko, P., Buford, J. P., Goodwin, J. S., Stroud, P. A., *et al.* 2001. *Biochem Biophys Res Commun* **280**: 212-215.
- Buxbaum, J. N. 2003. *Trends Biochem Sci* **28**: 585-592.
- Caburet, S., Demarez, A., Mounné, L., Fellous, M., *et al.* 2004. *J Med Genet* **41**: 932-936.
- Caine, J., Sankovich, S., Antony, H., Waddington, L., *et al.* 2007. *FEMS Yeast Res* **7**: 1230-1236.
- Calado, A., Kutay, U., Kühn, U., Wahle, E., *et al.* 2000a. *Rna* **6**: 245-256.
- Calado, A., Tomé, F. M., Brais, B., Rouleau, G. A., *et al.* 2000b. *Hum Mol Genet* **9**: 2321-2328.
- Calamai, M., Taddei, N., Stefani, M., Ramponi, G., *et al.* 2003. *Biochemistry* **42**: 15078-15083.
- Canet, D., Last, A. M., Tito, P., Sunde, M., *et al.* 2002. *Nat Struct Biol* **9**: 308-315.
- Canet, D., Sunde, M., Last, A. M., Miranker, A., *et al.* 1999. *Biochemistry* **38**: 6419-6427.
- Chapman, M. R., Robinson, L. S., Pinkner, J. S., Roth, R., *et al.* 2002. *Science* **295**: 851-855.
- Cherny, I., Rockah, L., Levy-Nissenbaum, O., Gophna, U., *et al.* 2005. *J Mol Biol* **352**: 245-252.
- Chien, P., DePace, A. H., Collins, S. R. and Weissman, J. S. 2003. *Nature* **424**: 948-951.
- Chiti, F. and Dobson, C. M. 2006. *Annu Rev Biochem* **75**: 333-366.
- Chiti, F., Stefani, M., Taddei, N., Ramponi, G., *et al.* 2003. *Nature* **424**: 805-808.
- Coustou, V., Deleu, C., Saupe, S. and Begueret, J. 1997. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 9773-9778.
- Coustou-Linares, V., Maddelein, M. L., Bégueret, J. and Saupe, S. J. 2001. *Mol Microbiol* **42**: 1325-1335.
- Damaschun, G., Damaschun, H., Fabian, H., Gast, K., *et al.* 2000. *Proteins* **39**: 204-211.
- Demuro, A., Mina, E., Kayed, R., Milton, S. C., *et al.* 2005. *J Biol Chem* **280**: 17294-17300.
- Diaz-Avalos, R., Long, C., Fontano, E., Balbirnie, M., *et al.* 2003. *J Mol Biol* **330**: 1165-1175.
- Dobson, C. M. 1999. *Trends Biochem Sci* **24**: 329-332.
- Dobson, C. M. 2004. *Semin Cell Dev Biol* **15**: 3-16.

- Dong, J., Bloom, J. D., Goncharov, V., Chattopadhyay, M., *et al.* 2007. *J Biol Chem* **282**: 34204-34212.
- Dos Reis, S., Couлары-Salin, B., Forge, V., Lascu, I., *et al.* 2002. *J Biol Chem* **277**: 5703-5706.
- Dumoulin, M., Canet, D., Last, A. M., Pardon, E., *et al.* 2005. *J Mol Biol* **346**: 773-788.
- Dumoulin, M., Kumita, J. R. and Dobson, C. M. 2006. *Acc Chem Res* **39**: 603-610.
- Dumoulin, M., Last, A. M., Desmyter, A., Decanniere, K., *et al.* 2003. *Nature* **424**: 783-788.
- Eaglestone, S. S., Cox, B. S. and Tuite, M. F. 1999. *Embo J* **18**: 1974-1981.
- Eanes, E. D. and Glenner, G. G. 1968. *J Histochem Cytochem* **16**: 673-677.
- Eisenmesser, E. Z., Millet, O., Labeikovsky, W., Korzhnev, D. M., *et al.* 2005. *Nature* **438**: 117-121.
- Emerit, J., Edeas, M. and Bricaire, F. 2004. *Biomed Pharmacother* **58**: 39-46.
- Esposito, G., Garcia, J., Mangione, P., Giorgetti, S., *et al.* 2003. *J Biol Chem* **278**: 25910-25918.
- Everett, C. M. and Wood, N. W. 2004. *Brain* **127**: 2385-2405.
- Fan, X., Dion, P., Laganier, J., Brais, B., *et al.* 2001. *Hum Mol Genet* **10**: 2341-2351.
- Fändrich, M., Fletcher, M. A. and Dobson, C. M. 2001. *Nature* **410**: 165-166.
- Fay, N., Redeker, V., Savistchenko, J., Dubois, S., *et al.* 2005. *J Biol Chem* **280**: 37149-37158.
- Forood, B., Perez-Paya, E., Houghten, R. A. and Blondelle, S. E. 1995. *Biochem Biophys Res Commun* **211**: 7-13.
- Fowler, D. M., Koulov, A. V., Alory-Jost, C., Marks, M. S., *et al.* 2006. *PLoS Biol* **4**: e6.
- Fowler, D. M., Koulov, A. V., Balch, W. E. and Kelly, J. W. 2007. *Trends Biochem Sci* **32**: 217-224.
- Frare, E., Mossuto, M. F., Polverino de Laureto, P., Dumoulin, M., *et al.* 2006. *J Mol Biol* **361**: 551-561.
- Furlong, R. A., Narain, Y., Rankin, J., Wyttenbach, A., *et al.* 2000. *Biochem J* **346 Pt 3**: 577-581.
- Garcia-Mira, M. M. and Schmid, F. X. 2006. *J Mol Biol* **364**: 458-468.
- Geddes, A. J., Parker, K. D., Atkins, E. D. and Beighton, E. 1968. *J Mol Biol* **32**: 343-358.
- Geula, C., Wu, C. K., Saroff, D., Lorenzo, A., *et al.* 1998. *Nat Med* **4**: 827-831.
- Gill, S. C. and von Hippel, P. H. 1989. *Anal Biochem* **182**: 319-326.
- Goldberg, A. L. 2003. *Nature* **426**: 895-899.
- Golde, T. E., Dickson, D. and Hutton, M. 2006. *Curr Alzheimer Res* **3**: 421-430.
- Goodman, F. R., Mundlos, S., Muragaki, Y., Donnai, D., *et al.* 1997. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 7458-7463.
- Graumann, P. and Marahiel, M. A. 1994. *FEBS Lett* **338**: 157-160.
- Graumann, P. and Marahiel, M. A. 1996. *Bioessays* **18**: 309-315.
- Graumann, P., Schröder, K., Schmid, R. and Marahiel, M. A. 1996. *J Bacteriol* **178**: 4611-4619.
- Graumann, P., Wendrich, T. M., Weber, M. H., Schröder, K., *et al.* 1997. *Mol Microbiol* **25**: 741-756.
- Greenfield, N. J. 1996. *Anal Biochem* **235**: 1-10.
- Gregersen, N., Bross, P., Vang, S. and Christensen, J. H. 2006. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **7**: 103-124.

- Gross, M., Wilkins, D. K., Pitkeathly, M. C., Chung, E. W., *et al.* 1999. *Protein Sci* **8**: 1350-1357.
- Guo, Z. and Eisenberg, D. 2006. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 8042-8047.
- Hammarström, P., Jiang, X., Hurshman, A. R., Powers, E. T., *et al.* 2002. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99 Suppl 4**: 16427-16432.
- Hammarström, P., Wiseman, R. L., Powers, E. T. and Kelly, J. W. 2003. *Science* **299**: 713-716.
- Hardy, J. and Allsop, D. 1991. *Trends Pharmacol Sci* **12**: 383-388.
- Harper, J. D. and Lansbury, P. T., Jr. 1997. *Annu Rev Biochem* **66**: 385-407.
- Hartl, F. U. and Hayer-Hartl, M. 2002. *Science* **295**: 1852-1858.
- Hartley, D. M., Walsh, D. M., Ye, C. P., Diehl, T., *et al.* 1999. *J Neurosci* **19**: 8876-8884.
- Herczenik, E. and Gebbink, M. F. 2008. *Faseb J* **22**: 2115-2133.
- Hino, H., Araki, K., Uyama, E., Takeya, M., *et al.* 2004. *Hum Mol Genet* **13**: 181-190.
- Hirschfield, G. M. and Hawkins, P. N. 2003. *Int J Biochem Cell Biol* **35**: 1608-1613.
- Hoffmann, C., Zurn, A., Bunemann, M. and Lohse, M. J. 2008. *Br J Pharmacol* **153 Suppl 1**: S358-366.
- Hofweber, R., Horn, G., Langmann, T., Balbach, J., *et al.* 2005. *Febs J* **272**: 4691-4702.
- Hornberg, A., Eneqvist, T., Olofsson, A., Lundgren, E., *et al.* 2000. *J Mol Biol* **302**: 649-669.
- Hoshino, M., Katou, H., Hagihara, Y., Hasegawa, K., *et al.* 2002. *Nat Struct Biol* **9**: 332-336.
- Hurshman Babbes, A. R., Powers, E. T. and Kelly, J. W. 2008. *Biochemistry* **47**: 6969-6984.
- Iconomidou, V. A., Vriend, G. and Hamodrakas, S. J. 2000. *FEBS Lett* **479**: 141-145.
- Ignatova, Z., Thakur, A. K., Wetzel, R. and Gierasch, L. M. 2007. *J Biol Chem* **282**: 36736-36743.
- Ivanova, M. I., Sawaya, M. R., Gingery, M., Attinger, A., *et al.* 2004. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 10584-10589.
- Janson, J., Ashley, R. H., Harrison, D., McIntyre, S., *et al.* 1999. *Diabetes* **48**: 491-498.
- Jarrett, J. T. and Lansbury, P. T., Jr. 1993. *Cell* **73**: 1055-1058.
- Jiang, X., Buxbaum, J. N. and Kelly, J. W. 2001. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 14943-14948.
- Jimenez, J. L., Guijarro, J. I., Orlova, E., Zurdo, J., *et al.* 1999. *Embo J* **18**: 815-821.
- Johnson, R. J., Christodoulou, J., Dumoulin, M., Caddy, G. L., *et al.* 2005. *J Mol Biol* **352**: 823-836.
- Kawahara, M., Arispe, N., Kuroda, Y. and Rojas, E. 1997. *Biophys J* **73**: 67-75.
- Kawahara, M., Kuroda, Y., Arispe, N. and Rojas, E. 2000. *J Biol Chem* **275**: 14077-14083.
- Kayed, R., Bernhagen, J., Greenfield, N., Sweimeh, K., *et al.* 1999. *J Mol Biol* **287**: 781-796.
- Kayed, R., Head, E., Thompson, J. L., McIntire, T. M., *et al.* 2003. *Science* **300**: 486-489.
- Keller, R. W., Kühn, U., Aragon, M., Bornikova, L., *et al.* 2000. *J Mol Biol* **297**: 569-583.
- Kelly, J. W. 1996. *Curr Opin Struct Biol* **6**: 11-17.
- Kelly, J. W. 1998. *Curr Opin Struct Biol* **8**: 101-106.
- Kelly, S. M. and Price, N. C. 2000. *Curr Protein Pept Sci* **1**: 349-384.
- Kerwitz, Y., Kühn, U., Lilie, H., Knoth, A., *et al.* 2003. *Embo J* **22**: 3705-3714.
- Khare, S. D. and Dokholyan, N. V. 2007. *Curr Protein Pept Sci* **8**: 573-579.
- Kheterpal, I., Wetzel, R. and Cook, K. D. 2003. *Protein Sci* **12**: 635-643.
- Kheterpal, I., Williams, A., Murphy, C., Bledsoe, B., *et al.* 2001. *Biochemistry* **40**: 11757-11767.

- Kheterpal, I., Zhou, S., Cook, K. D. and Wetzel, R.** 2000. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 13597-13601.
- Kim, S., Morley, J. F., Ben-Zvi, A. and Morimoto, R. I.** 2005. In *Protein Folding Handbook. Part II.* (ed. J. Buchner, Kiefhaber, T.), pp. 1175-1199. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Kim, S., Nollen, E. A., Kitagawa, K., Bindokas, V. P., et al.** 2002. *Nat Cell Biol* **4**: 826-831.
- Kim, W. and Hecht, M. H.** 2005. *J Biol Chem* **280**: 35069-35076.
- Kim, W., Kim, Y., Min, J., Kim, D. J., et al.** 2006. *ACS Chem Biol* **1**: 461-469.
- Kourie, J. I. and Henry, C. L.** 2002. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **29**: 741-753.
- Krebs, M. R., Morozova-Roche, L. A., Daniel, K., Robinson, C. V., et al.** 2004. *Protein Sci* **13**: 1933-1938.
- Krzewska, J., Tanaka, M., Burston, S. G. and Melki, R.** 2007. *J Biol Chem* **282**: 1679-1686.
- Kumita, J. R., Johnson, R. J., Alcocer, M. J., Dumoulin, M., et al.** 2006. *Febs J* **273**: 711-720.
- Lacroute, F.** 1971. *J Bacteriol* **106**: 519-522.
- Lashuel, H. A.** 2005. *Sci Aging Knowledge Environ* **2005**: pe28.
- Laumonnier, F., Ronce, N., Hamel, B. C., Thomas, P., et al.** 2002. *Am J Hum Genet* **71**: 1450-1455.
- Lin, H., Bhatia, R. and Lal, R.** 2001. *Faseb J* **15**: 2433-2444.
- Lindholm, D., Wootz, H. and Korhonen, L.** 2006. *Cell Death Differ* **13**: 385-392.
- Lodderstedt, G., Hess, S., Hause, G., Scheuermann, T., et al.** 2007. *Febs J* **274**: 346-355.
- Lodderstedt, G., Sachs, R., Faust, J., Bordusa, F., et al.** 2008. *Biochemistry* **47**: 2181-2189.
- Lohman, T. M. and Bujalowski, W.** 1991. *Methods Enzymol* **208**: 258-290.
- Lopez, M. M., Yutani, K. and Makhatadze, G. I.** 1999. *J Biol Chem* **274**: 33601-33608.
- Lopez, M. M., Yutani, K. and Makhatadze, G. I.** 2001. *J Biol Chem* **276**: 15511-15518.
- Mackay, J. P., Matthews, J. M., Winefield, R. D., Mackay, L. G., et al.** 2001. *Structure* **9**: 83-91.
- Makarava, N., Lee, C. I., Ostapchenko, V. G. and Baskakov, I. V.** 2007. *J Biol Chem* **282**: 36704-36713.
- Manuelidis, L., Fritch, W. and Xi, Y. G.** 1997. *Science* **277**: 94-98.
- Martin, A., Kather, I. and Schmid, F. X.** 2002. *J Mol Biol* **318**: 1341-1349.
- Masison, D. C. and Wickner, R. B.** 1995. *Science* **270**: 93-95.
- Mattson, M. P.** 2000. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: 120-129.
- Mattson, M. P. and Chan, S. L.** 2001. *J Mol Neurosci* **17**: 205-224.
- Max, K. E., Wunderlich, M., Roske, Y., Schmid, F. X., et al.** 2007. *J Mol Biol* **369**: 1087-1097.
- Max, K. E., Zeeb, M., Bienert, R., Balbach, J., et al.** 2006. *J Mol Biol* **360**: 702-714.
- McCutchen, S. L., Colon, W. and Kelly, J. W.** 1993. *Biochemistry* **32**: 12119-12127.
- McCutchen, S. L., Lai, Z., Miroy, G. J., Kelly, J. W., et al.** 1995. *Biochemistry* **34**: 13527-13536.
- McKinley, M. P., Bolton, D. C. and Prusiner, S. B.** 1983. *Cell* **35**: 57-62.
- Miake, H., Mizusawa, H., Iwatsubo, T. and Hasegawa, M.** 2002. *J Biol Chem* **277**: 19213-19219.
- Miller, J. S., Kennedy, R. J. and Kemp, D. S.** 2001. *Biochemistry* **40**: 305-309.

- Miller, J. S., Kennedy, R. J. and Kemp, D. S. 2002. *J Am Chem Soc* **124**: 945-962.
- Mirzabekov, T. A., Lin, M. C. and Kagan, B. L. 1996. *J Biol Chem* **271**: 1988-1992.
- Monti, M., Amoresano, A., Giorgetti, S., Bellotti, V., *et al.* 2005. *Biochim Biophys Acta* **1753**: 44-50.
- Morozova-Roche, L. A., Zurdo, J., Spencer, A., Noppe, W., *et al.* 2000. *J Struct Biol* **130**: 339-351.
- Muragaki, Y., Mundlos, S., Upton, J. and Olsen, B. R. 1996. *Science* **272**: 548-551.
- Nasrallah, I. M., Minarcik, J. C. and Golden, J. A. 2004. *J Cell Biol* **167**: 411-416.
- Nazabal, A., Dos Reis, S., Bonneu, M., Saupe, S. J., *et al.* 2003. *Biochemistry* **42**: 8852-8861.
- Nelson, R. and Eisenberg, D. 2006. *Adv Protein Chem* **73**: 235-282.
- Nelson, R., Sawaya, M. R., Balbirnie, M., Madsen, A. O., *et al.* 2005. *Nature* **435**: 773-778.
- Nemeth, A., Krause, S., Blank, D., Jenny, A., *et al.* 1995. *Nucleic Acids Res* **23**: 4034-4041.
- Nguyen, H. D. and Hall, C. K. 2004. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 16180-16185.
- Nguyen, H. D. and Hall, C. K. 2006. *J Am Chem Soc* **128**: 1890-1901.
- Nilsson, M. R. 2004. *Methods* **34**: 151-160.
- O'Nuallain, B., Williams, A. D., Westermark, P. and Wetzel, R. 2004. *J Biol Chem* **279**: 17490-17499.
- Orr, H. T. and Zoghbi, H. Y. 2007. *Annu Rev Neurosci* **30**: 575-621.
- Pace, C. N. 1986. *Methods Enzymol* **131**: 266-280.
- Pajot, P. 1976. *Eur J Biochem* **63**: 263-269.
- Patino, M. M., Liu, J. J., Glover, J. R. and Lindquist, S. 1996. *Science* **273**: 622-626.
- Paushkin, S. V., Kushnirov, V. V., Smirnov, V. N. and Ter-Avanesyan, M. D. 1996. *Embo J* **15**: 3127-3134.
- Pepys, M. B., Hawkins, P. N., Booth, D. R., Vigushin, D. M., *et al.* 1993. *Nature* **362**: 553-557.
- Perez-Paya, E., Forood, B., Houghten, R. A. and Blondelle, S. E. 1996. *J Mol Recognit* **9**: 488-493.
- Perutz, M. F., Johnson, T., Suzuki, M. and Finch, J. T. 1994. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 5355-5358.
- Petkova, A. T., Ishii, Y., Balbach, J. J., Antzutkin, O. N., *et al.* 2002. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 16742-16747.
- Petkova, A. T., Leapman, R. D., Guo, Z., Yau, W. M., *et al.* 2005. *Science* **307**: 262-265.
- Petkova, A. T., Yau, W. M. and Tycko, R. 2006. *Biochemistry* **45**: 498-512.
- Pike, C. J., Walencewicz, A. J., Glabe, C. G. and Cotman, C. W. 1991. *Eur J Pharmacol* **207**: 367-368.
- Podrabsky, J. E., Carpenter, J. F. and Hand, S. C. 2001. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **280**: R123-131.
- Polverino de Laureto, P., Taddei, N., Frare, E., Capanni, C., *et al.* 2003. *J Mol Biol* **334**: 129-141.
- Puchtler, H. and Sweat, F. 1965. *J Histochem Cytochem* **13**: 693-694.
- Quist, A., Doudevski, I., Lin, H., Azimova, R., *et al.* 2005. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 10427-10432.
- Rankin, J., Wyttenbach, A. and Rubinsztein, D. C. 2000. *Biochem J* **348 Pt 1**: 15-19.
- Reches, M. and Gazit, E. 2003. *Science* **300**: 625-627.

- Redeker, V., Halgand, F., Le Caer, J. P., Bousset, L., *et al.* 2007. *J Mol Biol* **369**: 1113-1125.
- Ross, E. D., Edskes, H. K., Terry, M. J. and Wickner, R. B. 2005. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 12825-12830.
- Rubinsztein, D. C. 2006. *Nature* **443**: 780-786.
- Sackewitz, M., Scheidt, H. A., Lodderstedt, G., Schierhorn, A., *et al.* 2008a. *J Am Chem Soc* **130**: 7172-7173.
- Sackewitz, M., von Einem, S., Hause, G., Wunderlich, M., *et al.* 2008b. *Protein Sci* **17**: 1044-1054.
- Sambashivan, S., Liu, Y., Sawaya, M. R., Gingery, M., *et al.* 2005. *Nature* **437**: 266-269.
- Sanchez, I. E. and Kiefhaber, T. 2003. *J Mol Biol* **325**: 367-376.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. 1977. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.
- Santoso, A., Chien, P., Osherovich, L. Z. and Weissman, J. S. 2000. *Cell* **100**: 277-288.
- Sawaya, M. R., Sambashivan, S., Nelson, R., Ivanova, M. I., *et al.* 2007. *Nature* **447**: 453-457.
- Scheibel, T. and Lindquist, S. L. 2001. *Nat Struct Biol* **8**: 958-962.
- Scheibel, T., Parthasarathy, R., Sawicki, G., Lin, X. M., *et al.* 2003. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 4527-4532.
- Scheibel, T. and Serpell, L. 2005. In *Protein Folding Handbook. Part II.* (ed. J. Buchner, Kiefhaber, T.), pp. 197-253. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Scherzinger, E., Sittler, A., Schweiger, K., Heiser, V., *et al.* 1999. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 4604-4609.
- Scheuermann, T. 2003. Untersuchungen zum Einfluss von Polyalaninsequenzen auf die Bildung amyloider Fibrillen von PABPN1. *Dissertation*, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Scheuermann, T., Schulz, B., Blume, A., Wahle, E., *et al.* 2003. *Protein Sci* **12**: 2685-2692.
- Schindelin, H., Marahiel, M. A. and Heinemann, U. 1993. *Nature* **364**: 164-168.
- Schindler, T., Herrler, M., Marahiel, M. A. and Schmid, F. X. 1995. *Nat Struct Biol* **2**: 663-673.
- Schindler, T. and Schmid, F. X. 1996. *Biochemistry* **35**: 16833-16842.
- Schnuchel, A., Wiltschek, R., Czisch, M., Herrler, M., *et al.* 1993. *Nature* **364**: 169-171.
- Sekijima, Y., Dendle, M. T., Wiseman, R. L., White, J. T., *et al.* 2006. *Amyloid* **13**: 57-66.
- Sekijima, Y., Hammarström, P., Matsumura, M., Shimizu, Y., *et al.* 2003. *Lab Invest* **83**: 409-417.
- Semisotnov, G. V., Rodionova, N. A., Razgulyaev, O. I., Uversky, V. N., *et al.* 1991. *Biopolymers* **31**: 119-128.
- Serpell, L. C., Sunde, M., Benson, M. D., Tennent, G. A., *et al.* 2000. *J Mol Biol* **300**: 1033-1039.
- Shanmugam, V., Dion, P., Rochefort, D., Laganiere, J., *et al.* 2000. *Ann Neurol* **48**: 798-802.
- Shao, J. and Diamond, M. I. 2007. *Hum Mol Genet* **16 Spec No. 2**: R115-123.
- Shinchuk, L. M., Sharma, D., Blondelle, S. E., Reixach, N., *et al.* 2005. *Proteins* **61**: 579-589.
- Shorter, J. and Lindquist, S. 2005. *Nat Rev Genet* **6**: 435-450.
- Smith, J. J., Rücknagel, K. P., Schierhorn, A., Tang, J., *et al.* 1999. *J Biol Chem* **274**: 13229-13234.
- Soti, C. and Csermely, P. 2003. *Exp Gerontol* **38**: 1037-1040.

- Sousa, M. M., Cardoso, I., Fernandes, R., Guimaraes, A., *et al.* 2001. *Am J Pathol* **159**: 1993-2000.
- Stansfield, I., Jones, K. M., Kushnirov, V. V., Dagkesamanskaya, A. R., *et al.* 1995. *Embo J* **14**: 4365-4373.
- Sunde, M. and Blake, C. 1997. *Adv Protein Chem* **50**: 123-159.
- Taylor, K. L., Cheng, N., Williams, R. W., Steven, A. C., *et al.* 1999. *Science* **283**: 1339-1343.
- Tessier, P. M. and Lindquist, S. 2007. *Nature* **447**: 556-561.
- Tomé, F. M. and Fardeau, M. 1980. *Acta Neuropathol* **49**: 85-87.
- True, H. L. and Lindquist, S. L. 2000. *Nature* **407**: 477-483.
- Tycko, R. 2006. *Q Rev Biophys* **39**: 1-55.
- Uversky, V. N. and Fink, A. L. 2004. *Biochim Biophys Acta* **1698**: 131-153.
- Uyama, E., Tsukahara, T., Goto, K., Kurano, Y., *et al.* 2000. *Muscle Nerve* **23**: 1549-1554.
- Valleix, S., Drunat, S., Philit, J. B., Adoue, D., *et al.* 2002. *Kidney Int* **61**: 907-912.
- Verkhatsky, A. 2005. *Physiol Rev* **85**: 201-279.
- Vitrenko, Y. A., Gracheva, E. O., Richmond, J. E. and Liebman, S. W. 2007. *J Biol Chem* **282**: 1779-1787.
- Volles, M. J. and Lansbury, P. T., Jr. 2002. *Biochemistry* **41**: 4595-4602.
- Volles, M. J., Lee, S. J., Rochet, J. C., Shtilerman, M. D., *et al.* 2001. *Biochemistry* **40**: 7812-7819.
- von Einem, S. 2006. Untersuchungen zum Einfluss der Proteinumgebung auf die poly-L-Alanin-vermittelte Fibrillenbildung. *Diplomarbeit*, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Wahlbom, M., Wang, X., Lindström, V., Carlemalm, E., *et al.* 2007. *J Biol Chem* **282**: 18318-18326.
- Wahle, E. 1991. *Cell* **66**: 759-768.
- Wahle, E. 1995. *J Biol Chem* **270**: 2800-2808.
- Waldo, G. S., Standish, B. M., Berendzen, J. and Terwilliger, T. C. 1999. *Nat Biotechnol* **17**: 691-695.
- Wallace, R. B. and Miyada, C. G. 1987. *Methods Enzymol* **152**: 432-442.
- Wang, H. and Monteiro, M. J. 2007. *Exp Cell Res* **313**: 2810-2820.
- Wang, H. W. and Nogales, E. 2005. *Nature* **435**: 911-915.
- Wang, X. and Chapman, M. R. 2008. *J Mol Biol* **380**: 570-580.
- Westermarck, P. 2005. *Febs J* **272**: 5942-5949.
- Westermarck, P., Benson, M. D., Buxbaum, J. N., Cohen, A. S., *et al.* 2005. *Amyloid* **12**: 1-4.
- Wickner, R. B. 1994. *Science* **264**: 566-569.
- Wilkins, D. K., Dobson, C. M. and Gross, M. 2000. *Eur J Biochem* **267**: 2609-2616.
- Williams, A. D., Portelius, E., Kheterpal, I., Guo, J. T., *et al.* 2004. *J Mol Biol* **335**: 833-842.
- Williams, M. D. and Nadler, J. L. 2007. *Curr Diab Rep* **7**: 242-248.
- Winter, R. 2008. Fibrillenbildung von Polyalanin-CspB-Fusionen: Einfluss einer thermodynamisch stabilisierten CspB-Variante. *Diplomarbeit*, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Wong, J., Farlie, P., Holbert, S., Lockhart, P., *et al.* 2007. *Front Biosci* **12**: 2085-2095.
- Wunderlich, M., Martin, A. and Schmid, F. X. 2005. *J Mol Biol* **347**: 1063-1076.

- Wurth, C., Guimard, N. K. and Hecht, M. H.** 2002. *J Mol Biol* **319**: 1279-1290.
- Wyss-Coray, T. and Mucke, L.** 2002. *Neuron* **35**: 419-432.
- Yazaki, M., Farrell, S. A. and Benson, M. D.** 2003. *Kidney Int* **63**: 1652-1657.
- Zeeb, M. and Balbach, J.** 2003. *Protein Sci* **12**: 112-123.
- Zeeb, M. and Balbach, J.** 2005. *J Am Chem Soc* **127**: 13207-13212.
- Zeeb, M., Max, K. E., Weininger, U., Löw, C., et al.** 2006. *Nucleic Acids Res* **34**: 4561-4571.
- Zhouravleva, G., Frolova, L., Le Goff, X., Le Guellec, R., et al.** 1995. *Embo J* **14**: 4065-4072.
- Zhu, X., Su, B., Wang, X., Smith, M. A., et al.** 2007. *Cell Mol Life Sci* **64**: 2202-2210.

# Anhang

**Tabelle A** Theoretische biophysikalische Parameter der analysierten Proteine ermittelt anhand des Programms Protparam (<http://expasy.ch/tools/protparam.html>)

Protein	Aminosäure- zahl	MW (ohne Met) [kDa]	Isoelektri- scher Punkt	Molarer Extinktions- koeffizient [ $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ]
CspB	67	7233.9	4.54	5500
N-WT-CspB	212	21536.2	4.56	6990
N-(+7)Ala-CspB	219	22033.7	4.56	6990
N- $\Delta$ Ala-CspB	200	20697.3	4.56	6990
10Ala-CspB	100	10307.3	5.85	5500
17Ala-CspB	107	10804.8	5.85	5500

# Danksagung

Hiermit möchte ich mich herzlich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Frau Elisabeth Schwarz danke ich für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die Überlassung des Themas und eine sehr gute Zusammenarbeit und Betreuung bei der Arbeit. Herrn Prof. Rainer Rudolph möchte ich für die wertvollen Ratschläge und Ideen, die diese Arbeit begleitet haben, danken.

Mein besonderer Dank gilt Hauke Lilie, der mit seiner unerschöpflichen Geduld, vielen kritischen Fragen und seiner ständigen Diskussionsbereitschaft die Lösung vieler Probleme und das Auftauchen vieler neuer Probleme vorangetrieben hat.

Grit Lodderstedt möchte ich für die Hilfestellung bei der Einarbeitung, ihre Diskussionsbereitschaft und für die ausgezeichnete Zusammenarbeit danken. Danke Grit für unzählige Aufmunterungen und eine wirklich tolle Doktorandenzeit. Christine Magg danke ich für die Geduld bei der Beantwortung meiner vielen Fragen bezüglich des CspB-Moleküls und der Faltung von Proteinen im Allgemeinen.

Außerdem möchte ich meinen Diplomanden Sabrina von Einem und Reno Winter und meiner Hiwi Anja Buttstedt für ihre Hilfe danken.

Herrn Gerd Hause danke ich für die Hilfestellung bei der Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen und sein Vertrauen für die selbstständige Nutzung des EM. Prof. Franz-Xaver Schmid möchte ich für die Überlassung der CspB-Gene danken. Für die Bereitstellung von CspB danke ich Michael Wunderlich und Rolf Sachs. Weiterer Dank gilt Angelika Schierhorn und Christian Ihling, die die massenspektrometrischen Analysen durchgeführt haben.

Prof. Milton Stubbs, Frau Mechtild Wahle und allen Graduierten, Assoziierten sowie den Betreuern der ersten Förderperiode des GRK 1026 möchte ich für eine tolle Zeit im Graduiertenkolleg und wunderbare, wissenschaftlich anregende *Meetings* danken.

Dem gesamten Labor 262 der Abteilung Proteintechnologie und den ehemaligen Doktoranden und Diplomanden der AG Schwarz sowie den Bewohnern des Büros in der 6. Etage danke ich für die herzliche Atmosphäre und eine gute Zusammenarbeit.

Meiner Familie und meiner Freundin Cora möchte ich für die moralische und auch praktische Unterstützung, besonders gegen Ende der Arbeit, danken.

# Lebenslauf

## Zur Person

Name	Mirko Sackewitz
Geburtsdatum	09. Juli 1977
Geburtsort	Magdeburg
Familienstand	ledig

## Schulbildung

9/84 – 7/91	8. Polytechnische Oberschule F. J. Curie in Halle/Saale
09/91-06/96	Frieden-Gymnasium in Halle/Saale
06/96	Abitur

## Ersatzdienst

07/96 – 08/97	Zivildienst in der Evangelischen Stadtmission in Halle/Saale
---------------	--

## Studium

10/97-07/03	Studium der Biotechnologie an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig. Diplomarbeit am Neuroonkologischen Labor der Universitätsklinik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
07/03	Studienabschluss als Diplom-Biotechnologe

## Promotion

Seit 10/03	Promotionsstudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg am Institut für Biochemie/Biotechnologie bei PD Dr. E. Schwarz
------------	--

## Publikationen

- Sackewitz, M.**, Scheidt, H. A., Lodderstedt, G., Schierhorn, A., Schwarz, E., Huster, D. Dynamical mapping of fibrils from a disease-associated alanine expansion domain using proteolysis and solid-state NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc.* 2008 Jun; 130(23): 7172-3.
- Sackewitz, M.**, von Einem, S., Hause, G., Wunderlich, M., Schmid, F. X., Schwarz, E. A folded and functional protein domain in an amyloid-like fibril. *Prot Sci.* 2008 Jun; 17(6): 1044-54.
- Rohrberg, J., Sachs, R., Lodderstedt, G., **Sackewitz, M.**, Balbach, J., Schwarz, E. Monitoring fibril formation of the N-terminal domain of PABPN1 carrying an alanine repeat by tryptophan fluorescence and real-time NMR. *FEBS Lett.* 2008 May; 582(11): 1587-92.
- Söling, A., **Sackewitz M.**, Volkmar, M., Schaarschmidt, D. Jacob, R., Holzhausen, H.J., Rainov, N.G. Minichromosome maintenance protein 3 elicits a cancer-restricted immune response in patients with brain malignancies and is a strong independent predictor of survival in patients with anaplastic astrocytoma. *Clin Cancer Res.* 2005 Jan; 11(1): 249-58.

# **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 selbstständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt wurde. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Mirko Sackewitz

Halle, November 2008