

**Untersuchung der Fibrillenbildung des nukleären  
Polyadenylat-Bindeproteins 1 (PABPN1)  
*in vivo* und *in vitro***

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

Jens Liebold

geboren am 27. Juli 1985 in Greiz

Gutachter:

1. Prof. Dr. Elisabeth Schwarz

2. PD Dr. Ralph Golbik

3. Prof. Dr. Kai Tittmann

Promotionsgesuch eingereicht am: 21.12.2015

Tag der öffentlichen Verteidigung: 26.05.2016

## Nachtrag vom 27.07.2016: Korrekturen

Die folgenden Korrekturen sind bitte nachträglich zu berücksichtigen. Während der Vorbereitung der Verteidigung wurde ein Fehler in Abbildung 34 festgestellt. Das dritte Bild von links in der oberen Reihe war doppelt eingefügt. Die daraufhin korrigierte Abbildung wurde in der Dissertations-Verteidigung präsentiert und ist hier dargestellt.

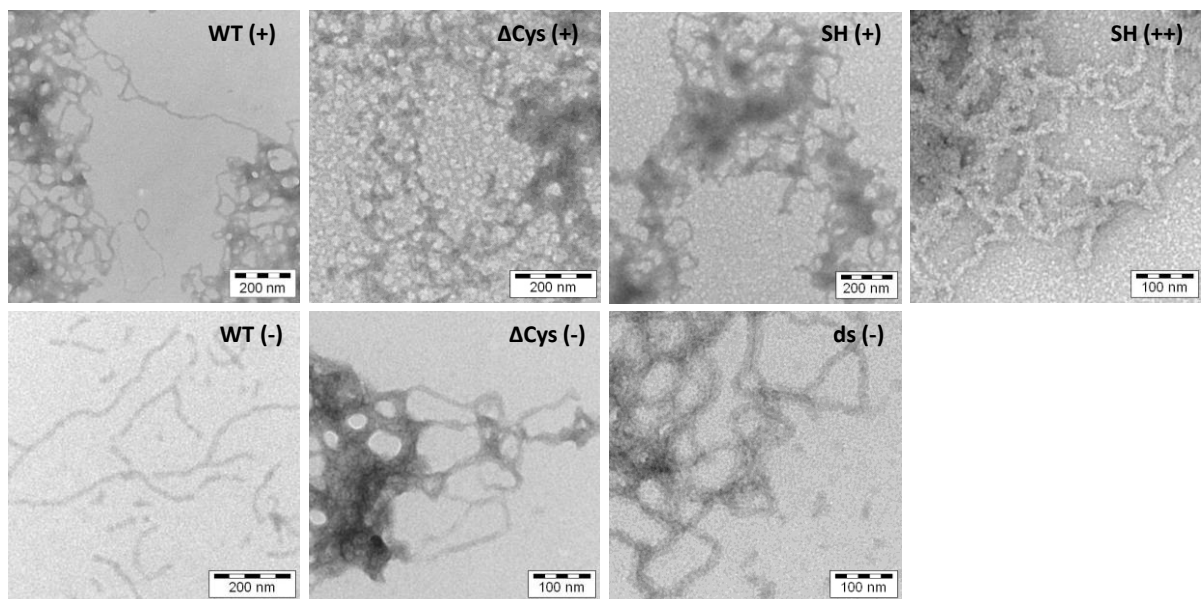


Abbildung 34: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von fibrillären PABPN1-Varianten nach Erreichen eines Plateaus der ThT-Fluoreszenz. Die Fibrillierungsansätze wurden bei einer Proteinkonzentration von 60  $\mu$ M bei 20 °C inkubiert. Die Fibrillierung fand entweder unter nicht-reduzierenden Bedingungen (-) oder in Anwesenheit von 10 mM DTT (+) oder 100 mM DTT (++) statt. Die Negativkontrastierung wurde mit Uranylacetat vorgenommen.

Jens Liebold

Mohlsdorf, 27.07.2016

# Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Proteine .....	1
1.2 Proteinfaltung und Proteinfehlfaltung .....	1
1.3 Proteinfehlfaltungskrankheiten.....	2
1.4 Amyloide Fibrillen.....	3
1.4.1 Eigenschaften und Struktur amyloider Fibrillen .....	3
1.4.2 Grundlagen der Entstehung amyloider Fibrillen .....	4
1.4.3 Entstehung von Fibrillen durch <i>domain swapping</i> .....	6
1.5 Ursachen für Fibrillierungs-Erkrankungen.....	7
1.5.1 Glutaminexpansions-Erkrankungen.....	8
1.5.2 Alaninexpansions-Erkrankungen .....	8
1.6 Okulopharyngeale Muskeldystrophie (OPMD) .....	9
1.7 Die biologische Funktion von PABPN1 .....	10
1.8 Aktueller Stand der Erforschung von OPMD .....	11
1.9 Untersuchungen der Fibrillenbildung von PABPN1.....	12
1.10 Zielstellung.....	13
2 Materialien und Methoden .....	15
2.1 Materialien .....	15
2.1.1 Chemikalien .....	15
2.1.2 Antibiotika.....	15
2.1.3 Standards und Proteaseinhibitor .....	15
2.1.4 <i>E. coli</i> -Stämme .....	15
2.1.5 Zelllinien.....	16
2.1.6 Plasmide, RNA und Primer.....	16
2.1.7 Proteine .....	16
2.1.8 Antikörper .....	17
2.1.9 Reagenzien und Material für die Zellkultur .....	17
2.1.10 Säulen und Säulenmatrices.....	18
2.1.11 Geräte und Zubehör .....	18
2.1.12 Sonstige Materialien .....	19
2.2 Methoden .....	19
2.2.1 Mikrobiologische Methoden .....	19

2.2.1.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	19
2.2.1.2 Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i> .....	19
2.2.1.3 Rekombinante Genexpression.....	20
2.2.2 Zellkultur-Methoden.....	21
2.2.2.1 Kultivierung von HEK293-Zellen.....	21
2.2.2.2 Transfektion von HEK293-Zellen.....	21
2.2.2.3 Selektion stabiler Zelllinien.....	22
2.2.3 Molekularbiologische Methoden.....	22
2.2.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	22
2.2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	23
2.2.3.4 Phenol-Chloroform-Extraktion.....	23
2.2.3.5 Ethanol-Fällung von Nukleinsäuren.....	23
2.2.3.7 Agarose-Gelelektrophorese.....	24
2.2.3.8 Ligierung von DNA-Fragmenten.....	24
2.2.3.9 Sequenzierung von Plasmid-DNA.....	24
2.2.3.10 5'-Markierung von RNA mit [ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-ATP.....	24
2.2.3.11 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	25
2.2.4 Biochemische Methoden.....	25
2.2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	25
2.2.4.2 Western-Blot.....	26
2.2.4.3 Dot-Blot.....	26
2.2.4.4 <i>Filter trap assay</i> .....	27
2.2.4.5 Immunfluoreszenzmikroskopie.....	27
2.2.4.6 Filterbindungsexperiment.....	28
2.2.4.7 <i>Gel shift</i> -Experiment.....	29
2.2.4.8 Polyadenylierungs-Experiment.....	29
2.2.4.9 Präparation von Zellkernextrakt.....	30
2.2.5 Biophysikalische Methoden.....	30
2.2.5.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen.....	30
2.2.5.2 Konzentrierung von Proteinlösungen.....	31
2.2.5.3 Ultrazentrifugation.....	31
2.2.5.4 Analytische Ultrazentrifugation.....	31
2.2.5.5 Circular dichroismus.....	32
2.2.5.6 Fluoreszenzspektroskopie.....	32

2.2.5.7 Entfaltungs- und Faltungsexperimente .....	33
2.2.5.8 Temperatur-induzierte Denaturierung von Vollängen-PABPN1.....	38
2.2.5.9 Dynamische Differenzkalorimetrie .....	39
2.2.5.10 Transmissionselektronenmikroskopie .....	40
2.2.5.11 Massenspektrometrie.....	40
2.2.6 Proteinbiochemische Methoden .....	40
2.2.6.1 Fibrillierung von PABPN1 .....	40
2.2.6.2 Detektion von Fibrillen.....	40
2.2.6.3 Solubilisierung von Fibrillen.....	41
2.2.6.4 Limitierte Proteolyse.....	42
2.2.7 Computergestützte Modellierung von Disulfidbrücken .....	42
2.2.8 Proteinreinigung .....	42
2.2.8.1 Isolierung von PABPN1-Strep aus HEK293-Zellen.....	43
2.2.8.2 Reinigung der RNP-Domäne-Varianten .....	43
2.2.8.3 Reinigung der PABPN1-Varianten.....	46
3 Ergebnisse.....	48
3.1 Etablierung eines OPMD-Zellkulturmodells in HEK293-Zellen.....	48
3.1.1 Charakterisierung von PABPN1-Strep.....	49
3.1.2 Isolierung <i>in vitro</i> hergestellter PABPN1-Strep-Fibrillen aus Zelllysat.....	52
3.1.3 Selektion stabiler Zelllinien.....	54
3.1.4 Isolierung von PABPN1-Strep aus stabilen Zelllinien.....	56
3.1.5 Charakterisierung des isolierten +7Ala-PABPN1-Strep .....	58
3.1.6 Löslichkeitstest.....	60
3.1.7 Fibrillierung von PABPN1-Strep in Zellkernextrakt.....	62
3.2. Die Rolle der RNP-Domäne bei der Fibrillenbildung von PABPN1 .....	64
3.2.1 Untersuchung der Auswirkung einer Disulfidbrücke auf die RNP-Domäne .....	65
3.2.1.1 Rekombinante Herstellung und Reinigung der RNP-Domäne-Varianten.....	65
3.2.1.2 Biophysikalische Charakterisierung der RNP-Domäne-Varianten.....	67
3.2.1.3 Vergleich der thermodynamischen Stabilität der RNP-Domäne-Varianten.....	70
3.2.1.4 Untersuchung der Temperatur-induzierten Denaturierung der RNP-Domäne.....	76
3.2.2 Untersuchung der Auswirkung einer Disulfidbrücke auf PABPN1 .....	78
3.2.2.1 Biophysikalische Charakterisierung der PABPN1-Varianten.....	79
3.2.2.2 Entfaltungsstudien der Vollängen-PABPN1-Varianten .....	83
3.2.2.3 Einfluss der intramolekularen Disulfidbrücke auf die Fibrillierung von PABPN1 ...	84

3.2.2.4 Auswertung der Fibrillierung von Vollängen-PABPN1 .....	87
4. Diskussion .....	90
4.1 Rückblick auf die Erforschung von OPMD .....	90
4.2 Untersuchung von OPMD in Zellkultur- und Tiermodellen .....	91
4.2.1 Hinweise auf PABPN1-Ablagerungen in OPMD-Zellkulturmodellen .....	91
4.2.2 Zusammenhang der Alaninexpansion und PABPN1-Ablagerungen .....	91
4.2.3 PABPN1-Ablagerungen in Zellkultur- und Tiermodellen .....	92
4.2.4 Einfluss anderer Proteine auf die Fibrillierung von PABPN1 .....	94
4.2.5 Einfluss der Zelllinie und Fusionspartner auf die PABPN1-Fibrillierung .....	95
4.2.6 Theorien zu den Ursachen von OPMD .....	96
4.3 Die Rolle der RNP-Domäne bei der Fibrillenbildung von PABPN1 .....	98
4.3.1 Hinweise zur Bedeutung der RNP-Domäne bei der PABPN1-Fibrillierung .....	98
4.3.2 Stabilisierung der RNP-Domäne durch eine künstliche Disulfidbrücke .....	98
4.3.3 Faltung der RNP-Domäne nach einem Zweizustandsmodell .....	99
4.3.4 Fibrillierung in Abhängigkeit der thermodynamischen Stabilität .....	102
5. Zusammenfassung und Ausblick .....	105
5.1 Etablierung eines OPMD-Zellkulturmodells in HEK293-Zellen .....	105
5.2 Die Rolle der RNP-Domäne bei der Fibrillenbildung von PABPN1 .....	105
6. Literaturverzeichnis .....	106
7. Abkürzungsverzeichnis .....	122
8. Anhang .....	124
8.1 Zentrifugation von PABPN1-Fibrillen .....	124
8.2 Massenspektrometrie .....	124
8.3 Harnstoff-induzierte Denaturierung der RNP-Domäne .....	125
8.4 Faltungskinetiken der RNP-Domäne .....	126
8.5 Temperatur-induzierte Denaturierung der RNP-Domäne .....	127
8.6 Temperatur-induzierte Denaturierung von PABPN1 .....	128
8.7 Vollständige Fibrillierungskinetik von PABPN1 .....	130
8.8 Stabilität der Disulfidbrücke von dS-PABPN1 bei der Fibrillierung .....	130

# 1 Einleitung

## 1.1 Proteine

Proteine zählen zu den wichtigsten Bausteinen von Lebewesen. Selbst einfache Organismen wie Bakterien oder Einzeller enthalten etwa 1000 verschiedene Proteine [1]. Im menschlichen Körper sind mehr als 100 000 unterschiedliche Proteine mit vielfältigen Funktionen zu finden [2]. Sie stellen Enzyme oder Hormone dar, sind verantwortlich für die Muskelkontraktion oder die Funktion des Immunsystems. Um ihre biologische Funktion zu erfüllen, nehmen viele Proteine eine dicht gepackte, dreidimensionale Struktur ein [1]. Die Strukturbildung von Proteinen steht im Fokus wissenschaftlicher Forschung. In Lebewesen existieren aufwändige Systeme zur Gewährleistung und Überprüfung einer korrekten Proteinfaltung. Der „Qualitätskontrolle“ der korrekten Faltung und dem Abbau falschgefalteter Proteine kommen entscheidende Bedeutungen bei der Aufrechterhaltung der Lebensfunktion von Organismen zu [2, 3]. Eine Vielzahl von Krankheiten hat ihren Ursprung in Mutationen oder ist die Folge von Proteinfehlfaltung. Beispiele dafür sind Krebs, Stoffwechselstörungen oder Krankheiten, welche mit der Ablagerung von fehlgefalteten Protein einhergehen [4]. Aus diesem Grund kommt der Aufklärung der räumlichen Struktur und des Faltungsweges von Proteinen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe und Medikamente zu.

## 1.2 Proteinfaltung und Proteinfehlfaltung

Die Grundlage der Struktur und Funktion von Proteinen bildet die Primärsequenz. Die Abfolge der Aminosäuren gibt die dreidimensionale Struktur von Proteinen vor [5]. Es wird angenommen, dass die native Struktur eines Proteins der Zustand ist, in dem die freie Energie am geringsten ist [5]. Neben den thermodynamischen Gegebenheiten spielen auch kinetische Aspekte eine wichtige Rolle bei der Proteinfaltung [6, 7]. Ein rein statistischer Prozess bei der Ausbildung der nativen Proteinstruktur würde viel zu lange dauern, um die bisher beobachteten Faltungsgeschwindigkeiten von Proteinen zu erklären [8, 9]. Aus diesem Grund nimmt man an, dass die Faltung von Proteinen ein zielgerichteter Prozess ist, welcher in einer „Energielandschaft“ zum nativen Zustand verläuft [1, 10].

Kleine Proteine mit weniger als ca. 100 Aminosäuren falten häufig nach einem Zweizustandsmodell. Dies bedeutet, dass nur der native und denaturierte Zustand des Proteins signifikant populiert ist [11]. Der Faltungsweg größerer Proteine ist häufig komplexer und kann die Population teilweise gefalteter Intermediate umfassen [12]. Proteine mit mehr als ca. 100 Aminosäuren haben eine erhöhte Neigung in wässriger Lösung kompakte Zustände



anzunehmen, auch wenn dabei nicht-native Wechselwirkungen zwischen einzelnen Aminosäuren ausgebildet werden. Dies kann in der Fehlfaltung von Proteinen resultieren [1]. Die Exposition hydrophober Bereiche von fehlgefalteten Proteinen kann schließlich zur Bildung von Aggregaten führen [13-15]. Die Fehlfaltung von Proteinen und ein damit einhergehender Funktionsverlust oder die Ablagerung von Proteinaggregaten ist für eine Vielzahl von Krankheiten verantwortlich [12, 16].

### 1.3 Proteinefehlfaltungskrankheiten

Eine große Gruppe von Proteinefehlfaltungskrankheiten ist durch die Umwandlung löslicher Peptide oder Proteine in unlösliche Fibrillen gekennzeichnet und wird der Klasse der Amyloidosen zugeordnet [1]. Hierzu zählen neurodegenerative Erkrankungen wie die Alzheimer'sche Krankheit, die Parkinson'sche Krankheit und Krankheiten der Gruppe *transmissible spongiform encephalopathies*. Man unterscheidet gewebsspezifische Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2 und systemische Erkrankungen wie die Leichtketten-Amyloidose oder die Transthyretin-Amyloidose [17-19]. Die Ausprägung der Krankheitssymptome korreliert mit dem Auftreten amyloider Ablagerungen bzw. Fibrillen [17]. Ob die Fibrillen dabei aber die Krankheitsursache darstellen, lediglich Begleiterscheinungen sind oder sogar eine schützende Funktion als Ort der Ablagerung toxischer Oligomere haben, ist weitgehend ungeklärt [20, 21].

Der Begriff „amyloide Fibrillen“ bezeichnet extrazellulär vorkommende Proteinablagerungen, welche im Elektronenmikroskop als fibrilläre Strukturen erkennbar sind, bei der Anfärbung durch Kongorot unter polarisiertem Licht eine gelb-grüne Lichtdoppelbrechung aufweisen und das charakteristische Röntgenbeugungsmuster einer *cross-β*-Struktur zeigen [22] (siehe Kapitel 1.4.1). Hingegen werden intrazellulär auftretende Fibrillen, oder Fibrillen, welche nur *in vitro* nachgewiesen wurden, als „amyloid-artige Fibrillen“ klassifiziert. Beide Arten von Fibrillen sind ähnlich hinsichtlich ihrer biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften und des strukturellen Aufbaus [23, 24]. Es wird außerdem vermutet, dass die Fähigkeit amyloide Fibrillen zu bilden ein allgemeines Charakteristikum von Polypeptidketten sein könnte [2, 12]. Aus diesem Grund wird zur Vereinfachung in dieser Arbeit nicht weiter zwischen „amyloid“ und „amyloid-artig“ unterschieden.

## 1.4 Amyloide Fibrillen

### 1.4.1 Eigenschaften und Struktur amyloider Fibrillen

Im Elektronenmikroskop wurden in amyloiden Ablagerungen längliche Filamente beschrieben, welche ungeordnet vorlagen oder in Bündeln angeordnet waren [25]. Detaillierte Studien beschrieben amyloide Fibrillen als unverzweigt, mit einem Durchmesser von ca. 7-12 nm und Längen bis in den  $\mu\text{m}$ -Bereich [26]. Die Fibrillen können mit verschiedenen Farbstoffen wie Kongorot, Thioflavin T (ThT) oder 8-Anilino-1-naphthalen-sulfonsäure (ANS) nachgewiesen werden [27-30]. Amyloide Fibrillen haben eine erhöhte Resistenz bezüglich der hydrolytischen Spaltung durch Proteasen [31, 32] und zeigen eine hohe chemische Stabilität gegenüber Denaturierungsmitteln wie Detergenzien oder chaotropen Agenzien [33-36]. Ein bemerkenswertes Phänomen amyloider Fibrillen ist, dass die Polypeptidketten der verschiedenen krankheitsassoziierten Proteine kaum Gemeinsamkeiten haben und dennoch Fibrillen mit sehr ähnlichen Eigenschaften entstehen [37]. Die vergleichbaren Eigenschaften und die hohe Stabilität amyloider Fibrillen sind vermutlich auf strukturelle Gemeinsamkeiten des fibrillären Zustandes zurückzuführen.

Typischerweise sind Fibrillen aus zwei bis sechs Protofilamenten aufgebaut (Abbildung 1) [18, 38]. Jedoch wurden auch Fibrillen bestehend aus einem einzelnen Protofilament beschrieben [39]. Die aus den Röntgenbeugungsmustern von Fibrillen abgeleitete Anordnung der Proteinmonomere in den Protofilamenten wird als *cross*- $\beta$ -Struktur bezeichnet [40, 41]. Röntgenbeugungsmuster amyloider Fibrillen zeigen typische Reflektionen bei ca. 4,7-4,8 Å sowie bei 8-11 Å. Aus diesen Daten wurde geschlossen, dass sich zueinander parallel angeordnete  $\beta$ -Faltblätter entlang der Fibrillenachse befinden, deren Abstand 8-11 Å beträgt. Die einzelnen  $\beta$ -Stränge sind senkrecht zur Fibrillenachse ausgerichtet und durch Wasserstoffbrücken verbunden. Die Reflektionen bei 4,7-4,8 Å spiegeln den Abstand der  $\beta$ -Stränge wider (Abbildung 1 A) [24, 26]. Die  $\beta$ -Stränge können sowohl parallel als auch antiparallel zueinander angeordnet sein [16]. Das strukturelle Modell der *cross*- $\beta$ -Struktur konnte durch Festkörper-NMR bestätigt werden. Eine Analyse der Fibrillen des Amyloid- $\beta$ -Peptides  $\text{A}\beta_{1-40}$  zeigte, dass die Aminosäure-Reste 12-24 sowie die Reste 30-40 parallel angeordnete  $\beta$ -Stränge bilden. Die Reste 25-29 bildeten einen „Knick“ des Peptid-Rückgrates, um die Ausrichtung der beiden  $\beta$ -Stränge zu ermöglichen. Die ersten 10 Reste waren ungeordnet (Abbildung 1 B) [42]. Eine Besonderheit stellen Fibrillen mit einer  *$\beta$ -solenoid*-Struktur dar. Diese Struktur ist durch  $\beta$ -helikale Elemente in einer dreieckigen Anordnung gekennzeichnet und wurde beispielsweise für Fibrillen der C-terminalen Domäne des Proteins HET-s aus dem Pilz *Podospora anserina* nachgewiesen [43, 44].

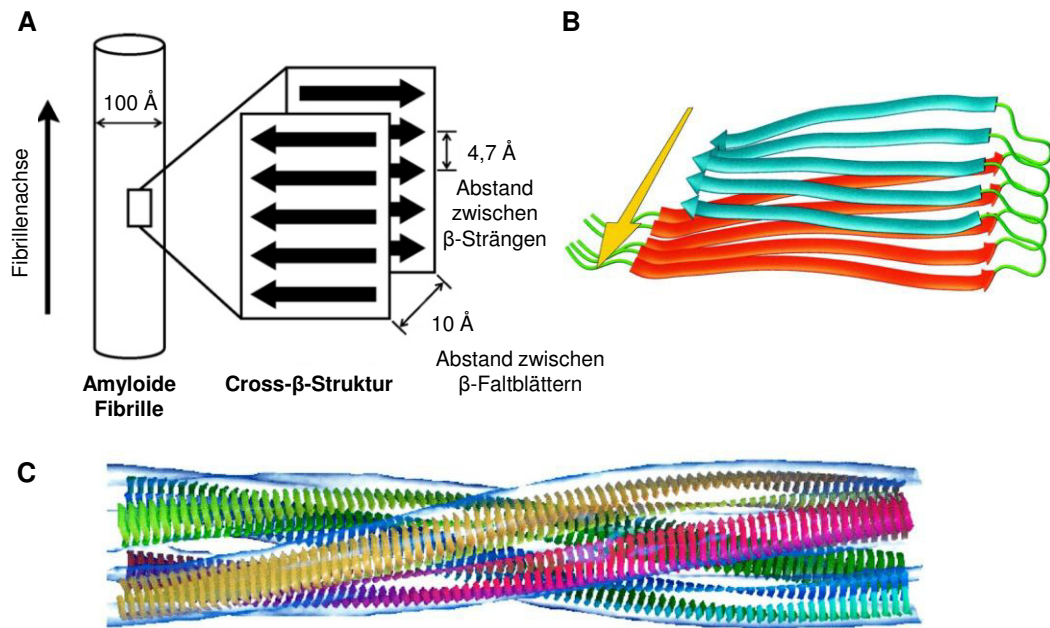


Abbildung 1: Struktur amyloider Fibrillen. (A) Schematische Darstellung der *cross-β*-Struktur. Eine amyloide Fibrille mit einem Durchmesser von 100 Å ist als Zylinder dargestellt. Senkrecht zur Fibrillenachse angeordnete  $\beta$ -Stränge (schwarze Pfeile) mit einem Abstand von 4,7 Å bilden  $\beta$ -Faltblätter (Rahmen). Die  $\beta$ -Faltblätter sind zueinander parallel, entlang der Fibrillenachse ausgerichtet und haben einen Abstand von 10 Å. Modifiziert nach [45]. (B) Strukturmodell der *cross-β*-Struktur des Peptides  $A\beta_{1-40}$ . Ein gelber Pfeil kennzeichnet die Fibrillenachse. Die  $\beta$ -Stränge der Reste 12-24 (blau) und der Reste 30-40 (orange) sind als Bänder gezeigt. *Loop*-Strukturen sind grün dargestellt. Die Reste 1-8 sind nicht gezeigt [42]. (C) Strukturmodell einer Insulin-Fibrille basierend auf elektronenmikroskopischen Daten (blaue Umrandung). Die vier Protofilamente weisen eine *cross-β*-Struktur auf und sind in blau, grün, gelb und rot dargestellt [46].

### 1.4.2 Grundlagen der Entstehung amyloider Fibrillen

Verglichen mit der nativ gefalteten Konformation nehmen Proteine in Fibrillen vermutlich einen nochmals energieärmeren Zustand ein [15, 47]. In globulären Proteinen kontrollieren die Aminosäure-Seitenketten die Strukturbildung. Im Gegensatz dazu bestimmen Wechselwirkungen des Peptidrückgrates die Ausbildung der Struktur amyloider Fibrillen [1, 23]. Die Tendenz einer Polypeptidkette zu aggregieren oder Fibrillen zu bilden wird von Parametern wie Hydrophobizität, Sekundärstruktur und Ladung bestimmt [14]. Auch die experimentellen Bedingungen haben *in vitro* einen entscheidenden Einfluss auf die Morphologie und die strukturellen und biochemischen Eigenschaften der Fibrillen sowie die Fibrillierungskinetik. Die Pufferzusammensetzung, der pH-Wert und die Ionenstärke beeinflussen die ionischen und hydrophoben Wechselwirkungen, welche bei der strukturellen Umlagerung und der Assoziation von Proteinmonomeren zu Fibrillen beteiligt sind [48-50]. Ebenso haben die Temperatur, die Proteinkonzentration und mechanischer

Stress einen Einfluss auf den Fibrillierungsmechanismus [50-54]. Jedoch wurden auch innerhalb einer Proteinpräparation morphologisch verschiedene Fibrillenspezies gefunden [46].

Die Bildung amyloider Fibrillen aus löslichen Vorläufermolekülen zeigt *in vitro* typischerweise einen sigmoiden Zeitverlauf. Nach einer anfänglichen *lag*-Phase folgt ein exponentielles Wachstum der Fibrillen. Die Fibrillierung geht anschließend in eine Plateau-Phase über, wenn nicht mehr genügend lösliche Monomere zur Anlagerung an die Fibrillen zur Verfügung stehen [55-58]. Die *lag*-Phase wird durch den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt verursacht, welcher die Bildung eines Nukleationskeims ist. Dabei kann es sich beispielsweise um lösliche Oligomere mit erhöhtem Anteil an  $\beta$ -Faltblatt-Struktur handeln [18, 21]. Für die Ausbildung der *cross*- $\beta$ -Struktur sind Konformationsänderungen der monomeren Proteine notwendig. Zahlreiche Studien gehen davon aus, dass eine Fibrillierung von Proteinen ausgehend von einer ungefalteten oder partiell gefalteten Konformation stattfindet [59-61]. In partiell gefalteten Proteinen kann es zur Exposition hydrophober Bereiche kommen [51]. Die Ausbildung intermolekularer Wechselwirkungen begünstigt deren Abschirmung vor dem Lösungsmittel. Dem gegenüber verzögert eine stabile, dicht gepackte, native Struktur die Umlagerung zu Fibrillen. Vermutlich ist außerdem die Flexibilität einer nur teilweise gefalteten Struktur erforderlich, um die strukturelle Umlagerung zu Fibrillen zu ermöglichen [62]. Den Ausgangspunkt für die Fibrillierung kann sowohl die teilweise Entfaltung nativ gefalteter Proteine, als auch die Ausbildung gefalteter Strukturen in nativ ungefalteten Proteinen darstellen (Abbildung 2) [61, 63].

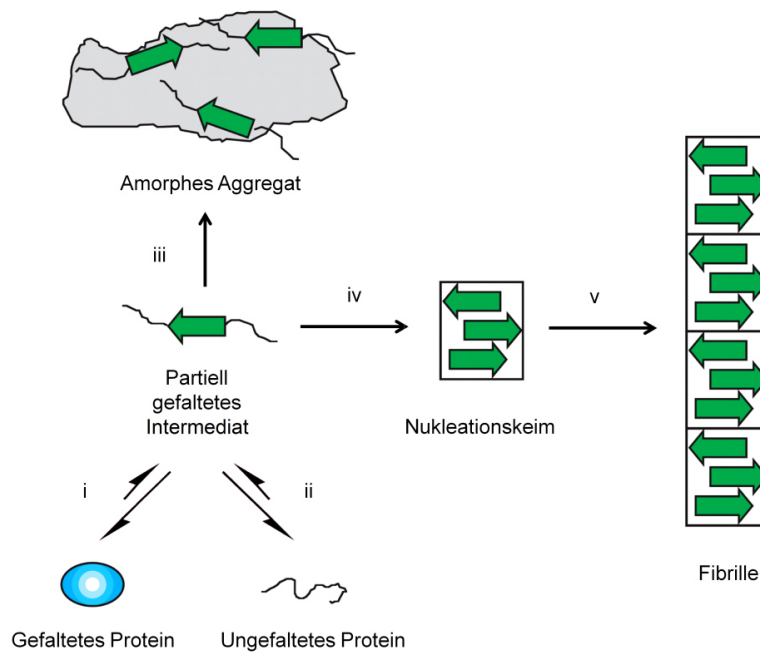


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Entstehung amyloider Fibrillen aus partiell gefalteten Proteinspezies. Ein partiell gefaltetes Intermediat entsteht durch teilweise Entfaltung eines nativ gefalteten Proteins (i) oder durch die Bildung strukturierter Bereiche in einem ungefalteten Protein (ii). Partiell gefaltete Intermediate können sich zu amorphen Aggregaten (iii) oder zu einem Nukleationskeim zusammenlagern (iv). Ausgehend von dem Nukleationskeim erfolgt das Wachstum von Fibrillen (v) durch die Assoziation weiterer partiell gefalteter Intermediate. Modifiziert nach [58].

### 1.4.3 Entstehung von Fibrillen durch *domain swapping*

Der Begriff *domain swapping* oder auch dreidimensionales *domain swapping* bezeichnet den Austausch identischer Strukturelemente zwischen Proteinmonomeren [64]. Die ausgetauschten Elemente reichen von Sekundärstrukturelementen bis zu vollständigen Domänen [65]. Dieser Prozess erfolgt durch partielles Entfalten der Proteinmonomere und der anschließenden Wiederherstellung einer nativen Faltung, indem das Strukturelement eines Proteinmonomers die entsprechende Position in einem anderen Monomer einnimmt [65]. Eine Dimerisierung von Proteinen durch *domain swapping* wurde beispielsweise für Diphtherietoxin, Cystatin C, RNase A und das humane Prion-Protein beschrieben [66-69] (Abbildung 3 A). Durch *domain swapping* können Proteine auch höhermolekulare Strukturen wie Fibrillen ausbilden [70].  $\beta$ -2-Mikroglobulin bildet Dimere durch *domain swapping* unter Erhalt der nativen Struktur. Die Dimere assoziieren weiter zu Tetrameren und Hexameren, welche vermutlich Ausgangspunkte der Fibrillenbildung von  $\beta$ -2-Mikroglobulin sind [71]. Für Cystatin C wird eine Fibrillenbildung durch *domain swapping* vermutet, welche ohne eine Umlagerung zur *cross- $\beta$* -Struktur erfolgt [67, 72, 73] (Abbildung 3 B). Es ist unwahrscheinlich, dass die Fibrillierung durch *domain swapping* einen generellen Mechanismus bei der

Entstehung amyloider Fibrillen darstellt [73]. Trotzdem können mit diesem Modell spezielle Eigenschaften einiger Fibrillen erklärt werden. Beispielsweise wurde eine Fibrillierung durch *domain swapping* für die RNase A beschrieben [74]. Die Fibrillen enthielten trotz einer *cross-β*-Struktur native, enzymatisch aktive RNase A-Moleküle (Abbildung 3 C).

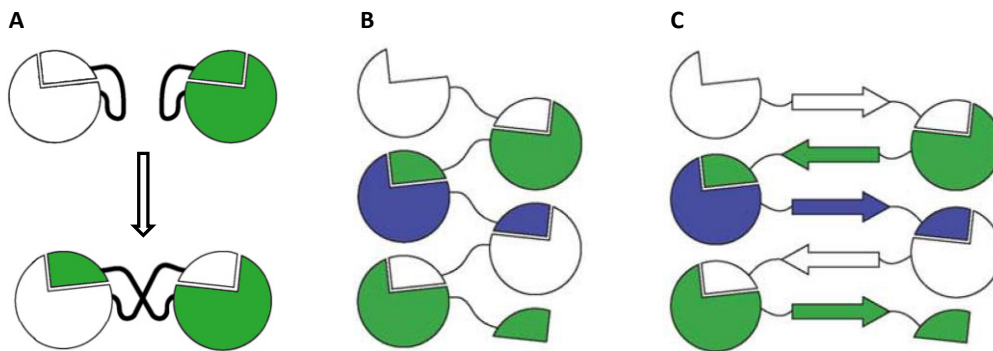


Abbildung 3: Schematische Darstellung verschiedener *domain swapping*-Modelle. Die Proteinmonomere sind farblich verschieden gekennzeichnet. (A) Bildung eines Proteindimers. (B) Fibrille ohne *cross-β*-Struktur. (C) Fibrille mit *cross-β*-Struktur. Abbildung modifiziert nach [45, 73].

## 1.5 Ursachen für Fibrillierungs-Erkrankungen

Das Auftreten von Proteinablagerungen steht in Zusammenhang mit einem zellulärem Funktionsverlust oder Absterben von Zellen. Ob die amyloiden Fibrillen jedoch der Auslöser oder ein Nebenprodukt der pathologischen Veränderungen darstellen, ist weitgehend ungeklärt [21]. Die molekularen Ursachen für das Auftreten amyloider Fibrillen sind vielseitig, wie beispielsweise die intrinsische Neigung einzelner Proteine, alternative Konformationen anzunehmen, unnatürlich hohe Konzentrationen des entsprechenden Proteins, abnormale posttranslationale Modifikationen oder der Einfluss von Umweltfaktoren [21]. Die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit oder Kuru können durch den Kontakt mit infektiösen Prion-Proteinspezies ausgelöst werden [75]. Während es auch zum spontanen Auftreten von Krankheiten wie beispielsweise der Alzheimer'schen Krankheit, der Parkinson'schen Krankheit oder der Leichtketten-Amyloidose ohne erkennbare Ursache kommen kann, spielen oft genetische Faktoren bei der Bildung amyloider Fibrillen eine Rolle [18, 76]. Bereits mutationsbedingte Veränderungen einer einzelnen Aminosäure können zur Ausbildung der Lysozym-Amyloidose oder der Transthyretin-Amyloidose führen [77, 78].

### 1.5.1 Glutaminexpansions-Erkrankungen

Eine Gruppe neurodegenerativer, genetisch bedingter Fibrillierungs-Erkrankungen wird durch die Expansion von Polyglutaminsequenzen hervorgerufen. Dazu zählen neben Chorea Huntington verschiedene Formen der spinocerebralen Ataxie. Die Ursache der Polyglutaminexpansion ist die Verlängerung von CAG-Trinukleotid-Codon-Wiederholungen [79, 80]. Polyglutaminexpansionen sind dynamisch und können sich innerhalb von Geweben oder über Generationen verändern. Längere Sequenzen unterliegen einer höheren Wahrscheinlichkeit zur Expansion als kürzere Sequenzen [81]. Ein krankheitsassoziierter Phänotyp tritt auf, wenn die Polyglutaminsequenzen einen Schwellenwert von ca. 35-45 Resten überschreiten [80]. Mit steigender Länge der Polyglutaminsequenz auf bis zu 200 Reste kommt es zu einer Auslösung der Krankheit im Jugend- oder frühen Erwachsenen-Alter und einer hohen Progressivität des Krankheitsverlaufs [81]. Bei Polyglutamin-Erkrankungen wurden Ablagerungen der mutierten Proteine vorwiegend im Zellkern festgestellt [82, 83]. Eine Ausnahme bildet die spinocerebrale Ataxie 6 mit cytoplasmatisch lokalisierten Aggregaten [84].

### 1.5.2 Alaninexpansions-Erkrankungen

Auch die Expansion von Oligoalaninsequenzen steht im Zusammenhang mit verschiedenen Erkrankungen. Derzeit sind neun Krankheiten bekannt, welche auf die Expansion von Oligoalaninsequenzen zurückgeführt werden können [85-87]. Wie bei Polyglutaminexpansionen liegt die Ursache in einer Verlängerung von Trinukleotid-Wiederholungen. Oligoalaninexpansionen sind jedoch nicht dynamisch und bleiben stabil über Generationen erhalten [86]. Außerdem sind Oligoalaninexpansionen mit maximal 33 Resten deutlich kürzer als dies bei Polyglutaminexpansionen der Fall ist [88]. Mit Ausnahme der Okulopharyngealen Muskeldystrophie (OPMD), welche erst in höherem Alter auftritt, betreffen alle Alaninexpansions-Erkrankungen Transkriptionsfaktoren und führen zu frühen Entwicklungsstörungen [86]. Beispielsweise bewirkt die Expansion der Alanin-Sequenz von HOXD13 Fehlbildungen der Hände und Füße [89]. Neben der Veränderung von Händen und Füßen kommt es bei Mutationen im CBFA1-Gen zu Deformationen von Kopf und Thorax [90]. Eine Expansion im SOX3-Gen bewirkt eine geringe Körpergröße und geistige Behinderung [91].

Die Expansion der natürlichen Polyalanin-Sequenzen führte in vielen Fällen zur Aggregation entsprechender Proteine im Zellkern oder dem Cytoplasma [92-96]. Anhand von *in vitro-Studien* wurde gezeigt, dass Oligoalaninpeptide in wässriger Lösung eine  $\alpha$ -helikale Struktur einnehmen [97, 98]. Abhängig von Konzentration, Temperatur und Inkubationszeit wandelten sich Oligoalaninpeptide mit mehr als sieben Resten von einer löslichen,  $\alpha$ -

helikalen Form zu Fibrillen mit einem erhöhten Anteil an  $\beta$ -Struktur um [99, 100]. Röntgenbeugungsmuster der Fibrillen deuteten auf eine Anordnung der Polypeptidketten hin, welche mit der *cross*- $\beta$ -Struktur vergleichbar ist. Jedoch wiesen die Fibrillen eine geringe Affinität zu den Farbstoffen ThT oder Kongorot auf [100].

## 1.6 Okulopharyngeale Muskeldystrophie (OPMD)

Die autosomal vererbte Okulopharyngeale Muskeldystrophie (OPMD) ist eine Erkrankung, welche ab dem fünfzigsten bis sechzigsten Lebensjahr in Erscheinung tritt [101]. Die Symptome sind herabhängende Augenlider (Ptosis), Schluckbeschwerden (Dysphagie) und eine Muskelschwäche in den Extremitäten [101, 102]. Als Folge der Schluckbeschwerden kommt es häufig zu einer Unterernährung und einer Aspirationspneumonie [103]. Bei entsprechender Behandlung haben die Patienten eine normale Lebenserwartung. Die Lebensqualität ist jedoch deutlich eingeschränkt, weil eine Nahrungsaufnahme nur schwer möglich ist (Prof. Dr. Elisabeth Schwarz, mündliche Information). Als genetische Ursache der Krankheit wurden Mutationen eines Gens im Chromosomenabschnitt 14q11.2-q13 identifiziert, welches für das nukleäre Polyadenylat-Bindeprotein 1 (PABPN1) kodiert. Eine (GCG)-Trinukleotidsequenz, welche für die ersten sechs von zehn Alanin-Resten am N-Terminus von PABPN1 kodiert, war bei OPMD-Patienten von sechs auf bis zu 13 Wiederholungen expandiert [104, 105]. Es wird angenommen, dass die Mutation durch ungleiches *crossing-over* hervorgerufen wird [106, 107]. Bereits eine Verlängerung der Alaninsequenz von 10 auf 11 Reste bewirkt einen rezessiven Phänotyp. Eine Länge von 12 bis maximal 17 Alanin-Resten führt zum dominanten Phänotyp [105]. Es besteht ein tendenzieller Zusammenhang, dass bei längeren Alaninexpansionen ein früheres Ausbrechen der Krankheitssymptome auftritt [102].

Obwohl PABPN1 ubiquitär exprimiert wird, sind die OPMD-Symptome auf die Skelettmuskulatur beschränkt [108]. Das charakteristische, pathologische Merkmal sind intranukleäre Einschlüsse (*intranuclear inclusions*) in den Muskelzellen von OPMD-Patienten. Diese Ablagerungen enthalten tubuläre Filamente mit einem Durchmesser von ca. 8,5 nm und sind nur in 2-5 % der Muskelzellkerne zu finden (Abbildung 4) [109, 110]. Spätere Studien zeigten, dass die Ablagerungen PABPN1 enthalten [111, 112]. Außerdem wurden in den Einschlüssen Proteinkomponenten des Ubiquitin-Proteasom-Systems und Hitzeschockproteine detektiert. Dies könnte darauf hindeuten, dass in den Ablagerungen falsch gefaltetes PABPN1 vorliegt [112-114]. Aus diesen Beobachtungen resultierte die Fragestellung, ob die Einschlüsse PABPN1-Fibrillen enthalten, ähnlich wie dies für Proteine mit Polyglutaminexpansionen beschrieben wurde (siehe Abschnitt 1.8).



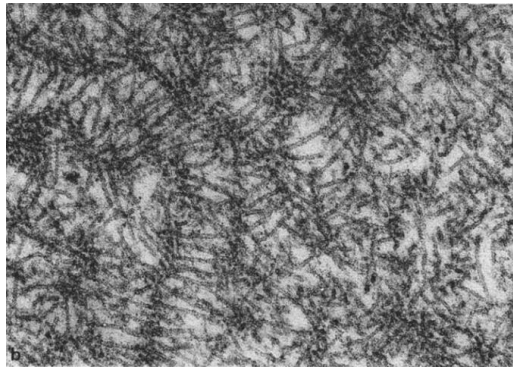


Abbildung 4: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer intranukleären Ablagerung im Muskelgewebe eines OPMD-Patienten (100 000 fache Vergrößerung). Abbildung entnommen aus [101].

## 1.7 Die biologische Funktion von PABPN1

PABPN1 bindet an Polyadenylat-RNA (Poly(A)-RNA) und erfüllt im Zellkern wichtige Funktionen bei der Prozessierung von mRNA. Das Protein stimuliert die Poly(A)-Polymerase (PAP) zur prozessiven Verlängerung des Poly(A)-Schwanzes von pre-mRNAs [115, 116]. Dabei wird ein Komplex aus PAP, PABPN1 und dem *cleavage and polyadenylation specificity factor* (CPSF) gebildet, wodurch die Bindung der PAP an das 3'-Ende der RNA stabilisiert wird [117]. Außerdem ist PABPN1 an der Längenkontrolle des Poly(A)-Schwanzes beteiligt, womit eine Limitierung auf etwa 250 Adenylat-Nukleotide erfolgt [118, 119]. PABPN1 kann zwischen dem Zellkern und dem Cytoplasma pendeln, sodass auch eine Funktion des Proteins beim Transport von mRNA diskutiert wird [120]. Die Länge des Poly(A)-Schwanzes der mRNA von OPMD-Patienten ist gegenüber gesunden Individuen unverändert [112].

PABPN1 kann in verschiedene Abschnitte eingeteilt werden: Die N-terminale Domäne, einen  $\alpha$ -helikalen Bereich, die RNP-Domäne (*ribonucleoprotein-type RNA binding domain*) und die C-terminale Domäne [121] (Abbildung 5). Ob es sich bei diesen Abschnitten um Domänen im Sinne von eigenständig faltenden Polypeptidketten handelt, ist mit Ausnahme der RNP-Domäne nicht vollständig geklärt. Zur Vereinfachung und in Bezug auf die PABPN1-Literatur wird in dieser Arbeit die Bezeichnung „Domäne“ beibehalten. Die N-terminale Domäne weist kaum Sekundärstruktur auf [34]. Direkt nach dem Start-Methionin folgt eine Sequenz von zehn Alanin-Resten. Vermutlich spielt die N-terminale Domäne eine Rolle bei der Interaktion mit anderen Proteinen wie beispielsweise Transkriptionsfaktoren [122]. Der  $\alpha$ -helikale Bereich ist für die Stimulation der PAP notwendig [123]. Sowohl die RNP-Domäne als auch die C-terminale Domäne sind an der Bindung von PABPN1 an Poly(A)-RNA beteiligt. Die RNP-Domäne (Reste 167-254) enthält zwei RNA-Bindungsmotive (RNP1 und RNP2) mit

hochkonservierter Aminosäuresequenz und vermittelt die spezifische Bindung an Poly(A)-RNA. Eine essentielle Funktion bei der Substratbindung kommt den lösungsmittel-exponierten, aromatischen Aminosäuren Tyrosin 175 und Phenylalanin 215 zu [124, 125].

Die C-terminale Domäne von PABPN1 enthält 13 asymmetrisch dimethylierte Arginin-Reste [126]. Die Arginin-Reste sind häufig zusammen mit Glycin in „RG-“ oder in „RXR Motiven“ zu finden. Damit hat die C-terminale Domäne eine Ähnlichkeit zu RNA-bindenden Domänen mit „RGG-Motiv“ [125, 127]. Die C-terminale Domäne interagiert unspezifisch mit RNA und erhöht die Bindungsaffinität von PABPN1 an RNA [125]. Außerdem vermittelt die C-terminale Domäne die Selbstassoziation von PABPN1 und bewirkt eine moderat kooperative Bindung mehrerer PABPN1-Moleküle an Poly(A)-RNA [125, 128]. Vollängen-PABPN1 zeigt *in vitro* eine hohe Tendenz zur amorphen Aggregation [34]. In Zusammenhang mit den filamentartigen Einschlüssen bei OPMD-Patienten ist interessant, dass PABPN1 im Komplex mit Poly(A)-RNA sowohl Filamente mit einem Durchmesser von ca. 7 nm als auch Partikel mit einem Durchmesser von ca. 21 nm bildet [129].

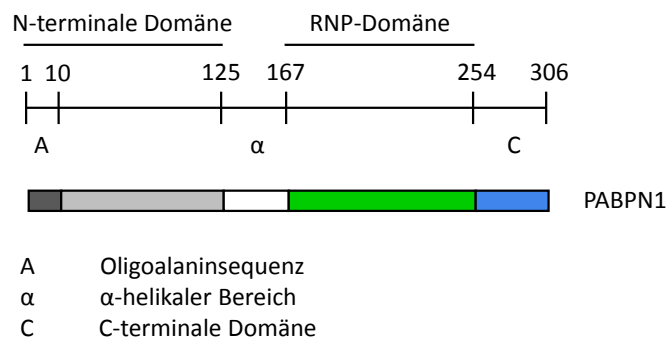


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Aufbaus von PABPN1. Der obere Balken markiert die Anfangs- und Endaminosäuren der verschiedenen Abschnitte. Der farblich markierte, untere Balken zeigt den Aufbau von PABPN1. Dargestellt ist die Oligoalaninsequenz (dunkelgrau), die N-terminale Domäne (hellgrau), der  $\alpha$ -helikale Bereich (weiß), die RNP-Domäne (grün) und die C-terminale Domäne (hellblau).

## 1.8 Aktueller Stand der Erforschung von OPMD

Zahlreiche Zellkultur- und Tiermodelle wurden eingesetzt, um den Zusammenhang zwischen der Expansion der Alaninsequenz von PABPN1, der Bildung der intranukleären Einschlüsse und den OPMD-Symptomen zu erklären. Nach der Expression von Alanin-expandiertem PABPN1 in Zellkulturmodellen wurden im Zellkern Bereiche ungewöhnlich hoher Konzentration von PABPN1 identifiziert, welche den Ablagerungen bei OPMD-Patienten entsprechen könnten [113, 114, 130]. Bei elektronenmikroskopischen Studien wurden Einschlüsse mit partikelförmigen und filamentartigen Strukturen in OPMD-Zellkultur- und

Mausmodellen gefunden [131, 132]. Ob die Expansion der Alaninsequenz dabei tatsächlich der Auslöser für die Bildung von Ablagerungen ist, konnte nicht endgültig geklärt werden. Bei einem Teil der Studien wurde eine Alanin-abhängige Bildung von Ablagerungen festgestellt [130, 133, 134]. In anderen Studien wiederum spielte die Expansion der Alaninsequenz keine Rolle bei der Bildung der Ablagerungen [122, 135-137]. Über die biochemischen Eigenschaften der Ablagerungen ist bisher wenig bekannt. Biochemische Untersuchungen beschrieben eine hohe Resistenz der intranukleären Einschlüsse gegenüber der Solubilisierung mit Detergenzien und Hochsalzbedingungen [112, 133, 138-140].

Zusätzlich zu den Tier- und Zellkulturmodellen, erfolgten detaillierte *in vitro*-Untersuchungen zur Fibrillierung von PABPN1. Wegen der ausgeprägten Neigung des Volllängen-Proteins amorphe Aggregate zu bilden, wurden erste Studien mit der N-terminalen Domäne durchgeführt. Für diese Domäne wurde eine Fibrillenbildung abhängig von der Anwesenheit der Alaninsequenz festgestellt [34]. Die entstandenen Fibrillen wiesen typische Eigenschaften amyloider Fibrillen auf [34, 35]. Sie zeigten eine hohe Resistenz gegenüber der Solubilisierung mit chaotropen Salzen oder Detergenzien, sowie gegenüber der hydrolytischen Spaltung durch Proteasen [34, 35]. Untersuchungen mittels fouriertransformierter Infrarotspektroskopie deuteten auf antiparallele  $\beta$ -Faltblattstrukturen hin. Überraschenderweise wurde in späteren Untersuchungen eine Alanin-unabhängige Umlagerung von Volllängen-PABPN1 zu Fibrillen nachgewiesen. Die Fibrillen des Volllängen-Proteins hatten zudem völlig andere Eigenschaften [87]. Die Resistenz gegenüber Proteasen und der Solubilisierung durch Detergenzien oder chaotrope Salze war gering [141]. Vermutlich kann eine Fibrillierung von PABPN1 sowohl durch einen Alanin-abhängigen als auch einen Alanin-unabhängigen Mechanismus ausgelöst werden, welche zu Fibrillen mit unterschiedlichen Eigenschaften führen [87]. Ob die Eigenschaften der Fibrillen mit denen der Ablagerungen von OPMD-Patienten vergleichbar sind und welcher Fibrillen-Typ biologisch relevant ist, konnte bisher nicht geklärt werden.

## **1.9 Untersuchungen der Fibrillenbildung von PABPN1**

Bei der Alanin-unabhängigen Fibrillierung von Volllängen-PABPN1 spielen vermutlich Abschnitte des Proteins außerhalb der Oligoalaninsequenz eine wichtige Rolle. Anhand von Zellkulturstudien wurden zwei „Oligomerisierungsdomänen“ (ODs) postuliert, welche für eine Selbstassoziation des Proteins essentiell sind [133]. Eine OD umfasst die Aminosäuren 264-306 und liegt damit in der C-terminalen Domäne. Die andere OD beinhaltet die Reste 155-294 und schließt die RNP-Domäne ein. Auch *in vitro* war die C-terminalen Domäne notwendig für eine Alanin-unabhängige Fibrillierung von PABPN1 [141]. Bisher ist wenig über

die Bedeutung der RNP-Domäne bei der Fibrillierung von PABPN1 bekannt. Einige Beobachtungen weisen auf eine Rolle der RNP-Domäne bei der Fibrillierung hin. So verhinderte ein zweifacher Aminosäureaustausch in der RNP-Domäne (Y175A/F215A), welcher auch die Bindungsaffinität zu Polyadenylat-RNA deutlich herabsetzte, *in vivo* eine Bildung von PABPN1-Ablagerungen [125, 135, 142]. Weiterhin war in einem *Drosophila melanogaster*-Modell die RNP-Domäne notwendig für die Bildung von PABPN1-Ablagerungen [142].

Strukturbiologische Studien deuten auf eine mögliche Dimerisierung der RNP-Domäne hin. Das cytoplasmatische, embryonale Poly(A)-Bindungsprotein des Krallenfrosches *Xenopus laevis* XlePABP2 (*Xenopus laevis* embryonic PABP2) besitzt ein RNA-Erkennungsmotiv (RRM) ähnlich der RNP-Domäne von PABPN1 [143]. Dieses RRM liegt als Homodimer vor, welches erst während der RNA-Bindung zu Monomeren dissoziiert [144]. Anhand der Auswertung der Röntgenkristallstruktur der RNP-Domäne von humanem PABPN1 wurde ebenso eine Dimerisierung vermutet. Dabei wurden mittels bioinformatischer Analysen Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den  $\beta$ 2-Strängen zweier Monomere identifiziert. Zusätzliche Wechselwirkungen gehen von Helix- $\alpha$ 1 und *loop* 1 aus [145]. Anhand dieser Ergebnisse könnte eine Dimerisierung durch *domain swapping* als Ursache für die Fibrillierung von PABPN1 in Frage kommen. Für Cystatin C und das Prion-Protein konnte gezeigt werden, dass eine Dimerisierung durch *domain swapping* der Fibrillenbildung voraus geht [67, 69]. Ein zielgerichtete kovalente Verbindung von Sekundärstrukturelementen mit künstlichen Disulfidbrücken verhinderte die Umwandlung beider Proteine zu Fibrillen [146, 147].

## 1.10 Zielstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zwei Fragestellungen bearbeitet werden. Der erste Schwerpunkt beschäftigte sich mit der Aufgabe, Fibrillen aus Zellkulturen zu isolieren und dem Ziel der biochemischen Charakterisierung der Fibrillen. Um die Detektion und Isolierung von PABPN1 zu erleichtern, wurde es C-terminal mit einem Twin-Strep-Tag® versehen. In einem OPMD-Zellkulturmodell sollten drei verschiedene Varianten von PABPN1 untersucht werden, welche sich in der N-terminalen Alaninsequenz unterscheiden: das Wildtyp-PABPN1 mit 10 N-terminal gelegenen Alaninresten (WT-PABPN1-Strep); die am stärksten expandierte, bei OPMD-Patienten beobachtete Variante mit 17 Alaninresten (+7Ala-PABPN1-Strep) und eine nicht natürlich auftretende Variante mit deletierter Alaninsequenz ( $\Delta$ Ala-PABPN1-Strep). Nach der Etablierung stabil transfizierter Säugerzelllinien, welche eine relativ

konstante Genexpression aufweisen und die Bereitstellung ausreichender Mengen PABPN1-Strep ermöglichen, sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

I.1 Ist eine Isolierung von fibrillärem PABPN1 aus Zellkulturen möglich?

I.2 Sind isolierte Fibrillen für eine Charakterisierung mittels proteinchemischer Methoden hinsichtlich ihrer Reinheit und erzielbaren Ausbeute geeignet? Wenn ja, welche Gemeinsamkeiten oder Unterschiede weisen die aus dem Zellkultur-Modell isolierten Fibrillen zu den bisher *in vitro* untersuchten Fibrillen auf?

Eine zweite Fragestellung stellte die Untersuchung der Rolle der RNP-Domäne bei der Fibrillierung von PABPN1 *in vitro* dar. Die Charakteristika von fibrillärem PABPN1 unterscheiden sich deutlich von den typischen Eigenschaften amyloider Fibrillen hinsichtlich der Resistenz gegenüber Proteasen und der Solubilisierung mit Detergenzien. Außerdem kann die Fibrillierung von PABPN1 nicht durch *seeding* mit Fibrillenbruchstücken beschleunigt werden [87]. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte darum die Möglichkeit einer Fibrillierung durch *domain swapping* untersucht werden. Dazu wurde die Auswirkung einer künstlich eingefügten Disulfidbrücke zwischen Helix- $\alpha$ 1 und Strang- $\beta$ 2 innerhalb der RNP-Domäne auf die Fibrillierung analysiert. Drei verschiedene Varianten von PABPN1 sollten rekombinant in *Escherichia coli* hergestellt, gereinigt und biophysikalisch charakterisiert werden: das Wildtyp-Protein (WT-PABPN1), die Cystein-freie Variante ( $\Delta$ Cys-PABPN1) und eine Variante mit einer Disulfidbrücke (A185C/V201C-PABPN1). Das disulfidverbrückte Protein wird im Folgenden als dS-PABPN1 und die entsprechende reduzierte Proteinspezies als SH-PABPN1 bezeichnet. Um thermodynamische Untersuchungen zu ermöglichen, sollte die isolierte RNP-Domäne mit den gleichen Aminosäureaustauschen exprimiert und untersucht werden: WT-RNP;  $\Delta$ Cys-RNP und A185C/V201C-RNP. Bei letzterer Variante wurde ebenfalls zwischen der disulfidverbrückten Variante dS-RNP und der reduzierten Variante SH-RNP unterschieden. Folgende Fragestellungen sollten untersucht werden:

II.1 Welchen Einfluss hat eine kovalente Verbindung der Sekundärstrukturelemente Helix- $\alpha$ 1 und Strang- $\beta$ 2 auf die biophysikalischen Eigenschaften der RNP-Domäne?

II.2. Welche Auswirkungen lassen sich auf die Fibrillierung von PABPN1 feststellen?

II 3. Welche Rückschlüsse ergeben sich für die Rolle der RNP-Domäne bei der Fibrillenbildung von PABPN1?

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

In diesem Abschnitt sind Materialien aufgeführt, welche im Text nicht genauer benannt sind.

#### 2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Applichem GmbH (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) bezogen, wenn nicht anders angegeben. Puffer und andere Lösungen wurden in bidestilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) hergestellt.

#### 2.1.2 Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller
Ampicillin	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Bacitracin	Roche Diagnostics (Mannheim)
Carbenicillin	Applichem GmbH (Darmstadt)
Chloramphenicol	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Puromycin	Applichem GmbH (Darmstadt)

Tabelle 1: Verwendete Antibiotika.

#### 2.1.3 Standards und Proteaseinhibitor

Standard	Hersteller
<i>Complete Mini</i> Proteaseinhibitor	Roche Diagnostics (Mannheim)
<i>GeneRuler</i> 1 kb DNA Ladder	ThermoFisher Scientific (St. Leon-Rot)
<i>GeneRuler</i> 100 bp DNA Ladder	ThermoFisher Scientific (St. Leon-Rot)
<i>peqGOLD</i> Protein-Marker I	peqlab (Erlangen)
<i>peqGOLD</i> Protein-Marker II	peqlab (Erlangen)
<i>peqGOLD</i> Protein-Marker IV	peqlab (Erlangen)

Tabelle 2: Verwendete Standards und Proteaseinhibitor.

#### 2.1.4 *E. coli*-Stämme

Name	Herkunft
BL21 (DE3) <i>Rosetta</i> 2 <sup>TM</sup> pLysS	Novagen (Bad Soden)
<i>XL1-Blue</i>	Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)

Tabelle 3: Verwendete *E. coli*-Stämme.

### 2.1.5 Zelllinien

Name	Zelltyp	Herkunft
HEK293	menschliche, embryonale Nierenzellen	AG Prof. Dr. Mechthild Hatzfeld

Tabelle 4: Verwendete Zelllinien.

### 2.1.6 Plasmide, RNA und Primer

Plasmid oder RNA	Herkunft
pET11a	Novagen (Bad Soden)
pEXPR-IBA103	IBA GmbH (Göttingen)
pLVX-Puro	Clontech Laboratories (Mountain View, CA, USA)
+7Ala-PABPN1 in pET11a	Reno Winter (AG Prof. Dr. Elisabeth Schwarz)
$\Delta$ Ala-PABPN1 in pET11a	Reno Winter (AG Prof. Dr. Elisabeth Schwarz)
WT-PABPN1 in pET11a	Reno Winter (AG Prof. Dr. Elisabeth Schwarz)
$\Delta$ Cys-PABPN1 in pET11a	Victoria Junghans (AG Prof. Dr. Elisabeth Schwarz)
A185C/V201C-PABPN1 in pET11a	Reno Winter (AG Prof. Dr. Elisabeth Schwarz)
16S- und 23S-rRNA aus <i>E. coli</i>	Roche Diagnostics (Mannheim)
tRNA aus <i>S. cerevisiae</i>	Roche Diagnostics (Mannheim)

Tabelle 5: Verwendete Plasmide und RNA.

Primer	Basensequenz
RNP-for	5'-TAT GTG CAT ATG GAG GCT GAT GCC C-3'
RNP-rev	5'-AT TAT GGA TCC TTA TTA GAT GCC TGG TCT GTT GG-3'

Tabelle 6: Verwendete Primer.

### 2.1.7 Proteine

Protein	Herkunft
Aprotinin	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Benzonase (25 U/ $\mu$ l)	Merck KGaA (Darmstadt)
<i>FastDigest</i> <sup>®</sup> -Restriktionsendonukleasen: <i>Bam</i> HI, <i>Bgl</i> II, <i>Nde</i> I, <i>Xba</i> I	ThermoFisher Scientific (St. Leon-Rot)
<i>FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase</i> (1 U/ $\mu$ l)	ThermoFisher Scientific (St. Leon-Rot)
Lysozym (mind. 20000 U/mg)	Applichem GmbH (Darmstadt)
methyliertes BSA	Uwe Kühn (AG Prof. Dr. Elmar Wahle)
Polynukleotidkinase	Uwe Kühn (AG Prof. Dr. Elmar Wahle)

Protein	Herkunft
Proteinase K (30 U/mg)	Roche Diagnostics (Mannheim)
<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase	peqlab (Erlangen)
T4-DNA-Ligase (5U/ $\mu$ l)	ThermoFisher Scientific (St. Leon-Rot)

Tabelle 7: Verwendete Proteine.

### 2.1.8 Antikörper

Primäre Antikörper			
Antikörper	Herkunft	Hersteller	Verdünnung
Anti-PABPN1	Kaninchen	Dauids Biotechnologie GmbH (Regensburg)	1:5000
Anti-Strep-Tag (StrepMAB-Classic)	Maus	IBA GmbH (Göttingen)	1:2000
Anti-Aktin	Kaninchen	dianova (Hamburg)	1:1000
Sekundäre Antikörper			
Antikörper	Herkunft	Hersteller	Verdünnung
Anti-IgG Kaninchen (HRP-konjugiert)	Ziege	dianova (Hamburg)	1:50000
Anti-IgG Maus ( <i>DyLight</i> <sup>®</sup> 488-konjugiert)	Esel	dianova (Hamburg)	1:1000

Tabelle 8: Verwendete Antikörper.

### 2.1.9 Reagenzien und Material für die Zellkultur

Produkt	Hersteller
DMEM <i>high Glucose</i> (4,5 g/l)	PAA (Pasching, Österreich)
PBS	PAA (Pasching, Österreich)
FBS	GIBCO (Karlsruhe)
AB/AM 100x (antibiotic/antimycotic solution)	PAA (Pasching, Österreich)
200 mM L-Glutamin	PAA (Pasching, Österreich)
Trypsin/EDTA-Lösung	PAA (Pasching, Österreich)
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 150 cm <sup>2</sup> )	PAA (Pasching, Österreich)
Zellkulturplatten (6-well, 12-well, 24-well)	PAA (Pasching, Österreich)
Abkühlgefäß 5100 <i>Cryo</i> 1 °C	Nalgene (Roskilde, Dänemark)

Tabelle 11: Verwendete Reagenzien und Material für die Zellkultur.



### 2.1.10 Säulen und Säulenmatrices

Produkt	Hersteller
<i>HiPrep Q XL 16/10 (20 ml)</i>	GE Healthcare (Freiburg)
<i>HiPrep Phenyl HP 16/10 (20 ml)</i>	GE Healthcare (Freiburg)
<i>HiPrep SP FF 16/10 (20 ml)</i>	GE Healthcare (Freiburg)
<i>HiLoad™ Superdex 75™ prep grade 16/60 (120 ml)</i>	GE Healthcare (Freiburg)
<i>Blue Sepharose™ 6 Fast Flow (250 ml)</i>	GE Healthcare (Freiburg)
<i>Strep-Tactin® Superflow® 50 % Suspension</i>	Qiagen (Hilden)

Tabelle 9: Verwendete Säulen und Säulenmatrices

### 2.1.11 Geräte und Zubehör

Gerät	Hersteller
<i>Amicon® Stirred Ultrafiltration Cell 8200</i>	Millipore Corporation (Billerica, MA, USA)
<i>Vivaflow® 200 (MWCO 10 kDa)</i>	Sartorius Biotech (Göttingen)
<i>Electroporator 2510</i>	Eppendorf AG (Hamburg)
Elektroporationsküvetten 2 mm	peqlab (Erlangen)
<i>Electrophoresis Power Supply EPS600</i>	Pharmacia Biotech (Freiburg)
Elektrophoreselaufkammern	Hoefer (San Francisco, USA)
<i>Semi-Phor Blot-Apparatur</i>	Hoefer Scientific Instruments (San Francisco)
<i>Centrifuge 5702 R und Centrifuge 5415 R</i>	Eppendorf AG (Hamburg)
<i>Avanti® J-20 und J-25 Zentrifuge</i>	Beckmann Coulter (Krefeld)
Rotoren JA-25.50, JLA-16.250, JLA 8.1000	Beckmann Coulter (Krefeld)
<i>J-810 Spectropolarimeter</i>	Jasco (Groß-Umstadt)
<i>Fluoromax-3 Fluoreszenzspektrometer</i>	HORIBA Jobin Yvon GmbH (Unterhaching)
<i>NanoPhotometer™ UV/Vis Spectrophotometer</i>	Implen GmbH (München)
Brutschrank <i>Hera Cell</i>	Heraeus (Hanau)
Sterilbank <i>Hera Safe</i>	Heraeus (Hanau)
<i>Phosphor-Imager Storm 860</i>	Molecular Dynamics (Sunnyvale, CA, USA)
<i>Storage-Phosphor-Screen</i>	Molecular Dynamics (Sunnyvale, CA, USA)
<i>Mini Labroller „orbital shaker“</i>	Labnet International (Edison, NJ, USA)

Tabelle 10: Verwendete Geräte und Zubehör.

## 2.1.12 Sonstige Materialien

Produkt	Hersteller
<i>C4-Zip Tips</i>	Millipore Corporation (Billerica, MA, USA)
Dialyseschläuche: MWCO 3500 Da für RNP-Domäne, MWCO 6000-8000 Da für PABPN1	Spectrum Laboratories (Rancho Dominguez, CA, USA)
Formvar/Kohle-Film auf 200-mesh-Netzchen S 162 (Kupfer)	Plano GmbH (Wetzlar)
<i>Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film</i>	Roche Diagnostics (Indianapolis, IN, USA)
Nitrozellulosefilter NC 20, Porengröße 0,2 µm	Whatman (Dassel)
Nitrozellulose-Membran <i>Protran</i> BA 83 (0,2 µm)	Whatman (Dassel)
Ultrafiltrationsmembran MWCO 3 kDa für RNP-Domäne, MWCO 10 kDa für PABPN1	Millipore Corporation (Billerica, MA, USA)
<i>Whatman-Papier Gel Blotting Paper</i> GB005	Whatman (Dassel)

Tabelle 12: Sonstige verwendete Materialien.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Mikrobiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Kultivierung von *E. coli*

Wenn nicht anders erwähnt, erfolgte die Kultivierung von *E. coli*-Zellen auf LB-Agarplatten oder in LB-Medium bei 37 °C. Bei der rekombinanten Genexpression wurde stattdessen TB-Medium eingesetzt (Kapitel 2.2.1.3). Schüttelkolben wurden stets bei 120 rpm geschüttelt. Alle zur Kultivierung verwendeten Medien oder Puffer wurden vor der Nutzung 20 min bei 121 °C autoklaviert oder sterilfiltriert (Porengröße 0,22 µM).

**LB-Medium:** 10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl

**LB-Agar:** LB-Medium mit 10 g/l Agar-Agar

#### 2.2.1.2 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

##### Transformation durch Elektroporation

Ein 40 µl-Aliquot elektrokompente Zellen wurde auf Eis aufgetaut, mit 10-400 ng Plasmid-DNA versetzt und in eine, auf Eis vorgekühlte, Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei einer Spannung von 2,5 kV. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml bei 37 °C vortemperiertem SOC-Medium resuspendiert und 30 min bei 37 °C geschüttelt. Die weitere Kultivierung erfolgte in Gegenwart entsprechender Antibiotika zur Selektion auf das transformierte Plasmid.

### Transformation durch Hitzeschock

Für diese Methode wurden chemokompetente XL1-*Blue E. coli*-Zellen verwendet. Nach dem Auftauen auf Eis wurden die Zellen mit Plasmid-DNA versetzt. Nach einer Inkubation für 30 min auf Eis wurden die Zellen 45 s im Wasserbad bei 42 °C dem Hitzeschock unterzogen. Danach folgte erneut eine zweiminütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml SOC-Medium versetzt und 30 min bei 37 °C geschüttelt. Die weitere Kultivierung erfolgte wie oben beschrieben.

**SOC-Medium:** 20 g/l Trypton; 0,5 g/l Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 10 mM MgSO<sub>4</sub>; 2,5 mM KCl; 0,4 % (w/v) D-Glucose

### **2.2.1.3 Rekombinante Genexpression**

Die PABPN1- und RNP-Domäne-Varianten wurden rekombinant im *E. coli* BL21 (DE3) *Rosetta 2*<sup>TM</sup> pLysS in der Gegenwart von 50 µg/ml Chloramphenicol und 100 µg/ml Carbenicillin hergestellt.

### Produktion der PABPN1-Varianten durch Fed-Batch-Fermentation

Die Kultivierung der Bakterienzellen zur Herstellung der PABPN1-Varianten erfolgte in einem 10-Liter-Fermenter *Biostat C-DCU3* (B. Braun Biotech International) in Hefeextrakt-Komplexmedium [148]. Zur Vorbereitung der Fermentation wurden 300 g Hefeextrakt, 3 g Ammoniumchlorid und 1 ml *antifoam* in 5 l ddH<sub>2</sub>O gelöst und direkt im Fermenter für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Anschließend wurden steril 250 ml 12 % (w/v) D-Glucose, 250 ml 1,6 % (w/v) MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O-Lösung und 13,2 % (w/v) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösungen zugesetzt. Als *feeding*-Lösung wurden 600 g Hefeextrakt und 250 g Glycerol in 2 l ddH<sub>2</sub>O gelöst und autoklaviert. Die Luftzufuhr und die Rührgeschwindigkeit wurden elektronisch gesteuert, sodass mindestens 30 % Sauerstoffsättigung im Medium vorlag. Der pH-Wert wurde mit 20 % (w/v) Phosphorsäure und 10 % (w/v) KOH-Lösung reguliert.

Als erste Vorkultur für die Fermentation wurde ein 50 ml-Schüttelkolben mit 10 ml TB-Medium gefüllt, mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 5 ml der ersten Vorkultur in einen 1-Liter-Schüttelkolben mit 200 ml TB-Medium überführt. Diese zweite Vorkultur wurde ca. 8 h kultiviert und die Zellen anschließend durch Zentrifugation (4000 x g; 20 min; 4 °C) geerntet. Das Zellpellet wurde in 50 ml autoklaviertem Leitungswasser resuspendiert und als Inokulum für die Fermentation eingesetzt. Das *feeding* wurde 5 h nach der Inokulation gestartet. Die Zuflussgeschwindigkeit lag bei ca. 4 ml/min. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 50 wurde die Kultivierungstemperatur auf 30 °C gesenkt und die Genexpression 3 h durch 1 mM IPTG induziert.

## Produktion der RNP-Domäne-Varianten in Schüttelkolben

Die Anzucht von Bakterien im Schüttelkolben erfolgte bei 37 °C und 120 rpm. Als Vorkultur diente ein 1-Liter-Schüttelkolben, welcher mit 250 ml TB-Medium befüllt war und mit einer Einzelkolonie angeimpft wurde. Die Herstellung der RNP-Domäne-Varianten erfolgte in 5-Liter-Schüttelkolben, welche mit 1 l TB-Medium befüllt waren. Diese wurden im Verhältnis 1:50 (v/v) mit der Vorkultur angeimpft. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,5 wurde die Genexpression 3 h durch 1 mM IPTG induziert.

**TB-Medium:** 900 ml TB-Grundmedium; 100 ml TB-Puffer

**TB-Grundmedium:** 25 g/l Hefeextrakt; 12 g/l Trypton

**TB-Puffer:** 0,5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,5 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,25 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,5 % (w/v) Glucose; pH 7,0

## 2.2.2 Zellkultur-Methoden

### 2.2.2.1 Kultivierung von HEK293-Zellen

Die Kultivierung von HEK293-Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> Sättigung in Kultivierungsmedium. Wenn nicht anderes angegeben, wurden 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen verwendet. Bevor die Zellen 100 % Konfluenz erreichten, wurden sie vereinzelt. Dazu wurde der Kulturüberstand abgenommen und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen 1 min mit einer Trypsin/EDTA-Lösung behandelt, anschließend in frischem Kultivierungsmedium resuspendiert und auf eine Konfluenz von 5 bis 20 % in einer neuen Kulturflasche ausgesät. Die Zellen wurden auf diese Weise maximal 40-mal passagiert. Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen in Kryo-Medium resuspendiert und zu je 1 ml aliquotiert. In einem speziellen Abkühlgefäß wurden die Aliquots (ca. 1 K/min) auf -80 °C heruntergekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Verwendung wurden die Kryo-Aliquots schnell bei 37 °C aufgetaut, mit 10 ml frischem Kultivierungsmedium versetzt und die Kultivierung, wie oben beschrieben, fortgesetzt.

**Kultivierungsmedium:** DMEM *high Glucose*; 10 % (v/v) FBS; 2 mM L-Glutamin; 1 % (v/v) AB/AM

**Kryo-Medium:** Kultivierungsmedium mit 10 % (v/v) DMSO

### 2.2.2.2 Transfektion von HEK293-Zellen

Die Transfektion von Plasmid-DNA in HEK293-Zellen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll (AG Prof. Dr. Mechthild Hatzfeld) der Methode von GRAHAM und VAN DER EB [149]. Die Zellen waren einen Tag zuvor in 6-*well*-Platten derart ausgesät worden, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 80 % hatten. Vor der Transfektion wurde der Kulturüberstand entfernt und pro *well* 0,8 ml frisches Kultivierungsmedium (Kapitel 2.2.2.1)

zugegeben. Zur Herstellung des DNA-Präzipitats wurden 100 µl verdünnte Plasmid-DNA (0,1 µg/µl Plasmid-DNA und 0,25 M CaCl<sub>2</sub> in ddH<sub>2</sub>O) tropfenweise mit 100 µl 2x Präzipitationspuffer vermischt. Das Gemisch wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tropfenweise zu den Zellen gegeben. Nach 6 h Inkubation der Zellen im Brutschrank erfolgte ein „Glycerolschock“. Dazu wurden die Zellen mit serumfreien Medium gewaschen und danach für 1 min mit 0,5 ml des Glycerolschock-Puffers inkubiert. Anschließend wurde erneut mit serumfreien Medium gewaschen. Die Zellen wurden, wie beschrieben, weiter kultiviert (Kapitel 2.2.2.1).

**2x Präzipitationspuffer:** 50 mM HEPES; 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,05; 280 mM NaCl; 10 mM KCl; 12 mM Glucose

**Serumfreies Medium:** DMEM *high Glucose*; 2 mM L-Glutamin; 1 % (v/v) AB/AM

**Glycerolschock-Puffer (0,5 ml):** 150 µl 50 % Glycerol; 100 µl ddH<sub>2</sub>O; 250 µl 2x Präzipitationspuffer

### 2.2.2.3 Selektion stabiler Zelllinien

Zur Selektion stabiler Zelllinien wurden Zellen 24 h nach der Transfektion (Kapitel 2.2.2.2) auf eine Konfluenz von 0,5 % in einer 75 cm<sup>2</sup>-Schale ausgesät. Weitere 24 h später wurde der Kulturüberstand abgenommen und neues Kultivierungsmedium mit einer Endkonzentration von 4 µg/ml Puromycin zugegeben. Die verwendeten pLVX-Puro Expressionsplasmide vermittelten die Resistenz gegen diesen Selektionsmarker. Durch die starke Vereinzelung der Zellen bildeten sich nach einer Inkubationszeit von mindestens zehn Tagen mit bloßem Auge sichtbare Kolonien, welche aus transfizierten Einzelzellen hervorgegangen waren. Die Kolonien wurden mit einer 20 µl-Pipette abgenommen und als isolierter Klon in Gegenwart von 4 µg/ml Puromycin weiter kultiviert.

## 2.2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA wurde mit dem *peqGOLD Plasmid Miniprep Kit 1* (peqlab, Erlangen) isoliert. Dazu wurde eine Einzelkolonie transformierter XL1-*Blue E. coli*-Zellen in 6 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4000 x g; 4 °C; 10 min) geerntet und entsprechend den Herstellerangaben des *Kits* aufgearbeitet. Die Elution erfolgte mit 50 µl ddH<sub>2</sub>O.

Die Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA in hoher Reinheit für die Zellkultur aus 150 ml Kulturen erfolgte mit dem *NucleoBond® Xtra Midi Plus Kit* (Macherey-Nagel, Düren) entsprechend der Herstellerangaben. Eluiert wurde mit zwei Mal 200 µl ddH<sub>2</sub>O.

### **2.2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten aus Plasmid-DNA wurde mit der *Pwo*-DNA-Polymerase nach den Herstellerangaben durchgeführt. Die 50 µl-Reaktionen enthielten 250 ng Plasmid-DNA, 300 nM je Primer und 2,25 U Polymerase. Die *annealing*-Temperatur betrug 50 °C. Es wurden 25 Amplifikationszyklen durchgeführt.

### **2.2.3.4 Phenol-Chloroform-Extraktion**

Das Volumen der DNA-Lösung wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf 200 µl eingestellt. Die Probe wurde danach mit 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 25:24:1) versetzt und gründlich gemischt. Nach einer Zentrifugation (16000 x g; 20 °C; 5 min) wurde die obere, wässrige Phase abgenommen und mit 1 Vol. Chloroform versetzt. Es wurde gründlich gemischt und erneut zentrifugiert (16000 x g; 20 °C; 1 min). Die obere Phase wurde einer Ethanol-Fällung unterzogen (Kapitel 2.2.3.5).

### **2.2.3.5 Ethanol-Fällung von Nukleinsäuren**

DNA-Lösungen oder RNA-Lösungen wurden mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 2,5 Vol. 96 % (v/v) Ethanol versetzt. Anschließend wurde die DNA oder RNA für 2 h bei -20 °C gefällt. Danach folgte ein Zentrifugationsschritt (16000 x g; 4 °C; 20 min). Das Pellet wurde mit 0,5 ml eiskaltem 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (16000 x g; 4 °C; 5 min). Anschließend wurde die DNA oder RNA in ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

### **2.2.3.6 Hydrolyse von DNA durch spezifische Restriktionsendonukleasen**

Mittels PCR amplifizierte DNA-Fragmente wurden vor der Hydrolyse mit Phenol-Chloroform-Extraktion (Kapitel 2.2.3.4) und Ethanol-Fällung (Kapitel 2.2.3.5) gereinigt. Isolierte Plasmid-DNA wurde direkt eingesetzt. Die Hydrolyse erfolgte mit *FastDigest*<sup>®</sup>-Restriktionsenzymen entsprechend der Herstellerangaben. Die Inkubationszeit wurde bei der Hydrolyse von Plasmid-DNA auf bis zu 2 h verlängert und für DNA-Fragmente auf bis zu 5 h. Anschließend wurden die Enzyme durch 10 min Inkubation bei 80 °C inaktiviert.

Vektoren wurden während der Spaltung dephosphoryliert, um eine intramolekulare Ligierung zu vermeiden. Dazu wurde den Reaktionen 1 µl alkalische Phosphatase (*FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase*) zugesetzt.

### 2.2.3.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA erfolgte in Agarosegelen. Zur Herstellung der Gele wurde je nach Molekulargewicht der DNA-Fragmente 1 % (w/v) bis 2 % (w/v) Agarose unter Aufkochen in TAE-Puffer gelöst. Die DNA-Lösungen wurden mit 1/5 Volumen an Ladepuffer versetzt und auf das abgekühlte, ausgehärtete Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in TAE-Puffer für 60 min bei einer Spannung von 90 V und einer Stromstärke von 300 mA durchgeführt. Danach wurde das Gel in TAE-Puffer mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid 30 min lang inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch Anregung mit UV-Licht sichtbar gemacht.

DNA-Fragmente wurden aus Agarosegelen mit dem *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit* (Macherey-Nagel, Düren) nach den Herstellerangaben isoliert. Die DNA wurde mit 20 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert. Anschließend wurden die DNA-Fragmente nochmals mittels Ethanol-Fällung (Kapitel 2.2.3.5) gereinigt.

**TAE-Puffer:** 40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA

**Ladepuffer:** *DNA Loading Dye & SDS Solution (6X)* (Thermo Scientific)

### 2.2.3.8 Ligierung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase in linearisierte Vektoren inseriert. Von den DNA-Fragmenten wurden die fünffachen molaren Stoffmengen, bezogen auf den Vektor, eingesetzt. Die Ligierungsansätze wurden nach den Herstellerangaben pipettiert. Jedoch wurden 2,5 U statt 1 U der T4-DNA-Ligase verwendet. Die Ligierung erfolgte zunächst 1 h bei Raumtemperatur und danach über Nacht bei 4 °C.

### 2.2.3.9 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde von der Firma *Eurofins MWG Operon* vorgenommen. Als Probe wurde 1,5 µg Plasmid-DNA in 15 µl ddH<sub>2</sub>O versandt. Die Ergebnisse wurden mit dem Programm *Vector NTI Advance 11* (Invitrogen) ausgewertet.

### 2.2.3.10 5'-Markierung von RNA mit [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP

Zur 5'-Markierung von RNA wurde die Polynukleotidkinase (PNK) eingesetzt. A14-RNA-Oligonukleotide und A98-RNA-Polynukleotide wurden von Dr. Uwe Kühn (AG Prof. Dr. Elmar Wahle) zur Verfügung gestellt. Bei der PNK-Reaktion wird das radioaktive  $\gamma$ -Phosphat eines Moleküls [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP auf die 5'-Hydroxylgruppe eines RNA-Nukleotids übertragen. Die Reaktion wurde 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die RNA durch eine Ethanolfällung (Kapitel 2.2.3.5) präzipitiert. Mononukleotide blieben in Lösung und wurden somit abgetrennt. Anschließend wurde die RNA in 10 mM Tris/HCl pH 8,0 resuspendiert.

Pipettierschema für eine 30 µl PNK-Reaktion:

- 3 µl 10x PNK-Reaktionspuffer (Fermentas)
- 0,3 µM A98-RNA oder 10 µM A14-RNA
- 20 µCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP (5000 Ci/nmol)
- 1,5 µl PNK 10 U/µl (Fermentas)
- ad 30 µl mit RNase freiem ddH<sub>2</sub>O

### 2.2.3.11 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurde durch Extinktionsmessung bestimmt. Eine Extinktion von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml oder einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml.

## 2.2.4 Biochemische Methoden

### 2.2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die analytische Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts erfolgte durch diskontinuierliche Elektrophorese in SDS-Polyacrylamid-Gelen. Das denaturierende Detergens SDS bindet an Proteine und verleiht ihnen ein meist konstantes Verhältnis von Ladung pro Masseinheit. Dadurch steht die Laufstrecke der SDS-Protein-Komplexe im Gel in einem logarithmischen Zusammenhang mit dem Molekulargewicht der Proteine [150].

	<b>Trenngel 14 % (v/v)</b>	<b>Sammelgel 6 % (v/v)</b>
<b>Acrylamid-Lösung</b>	9 ml	1,5 ml
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	5 ml	4,1 ml
<b>Trenngelpuffer (4x)</b>	5 ml	-
<b>TEMED</b>	50 µl	20 µl
<b>APS</b>	100 µl	40 µl
<b>Sammelgelpuffer (4x)</b>	-	1,9 ml

Tabelle 13: Pipettierschema für 4 Minigele oder 1 großes Gel (weitere Informationen siehe Text).

- Acrylamid-Lösung**                      30 % (w/v) Acrylamid; 0,8 % (w/v) Bisacrylamid
- 4x Trenngelpuffer:**                      3 M Tris/HCl pH 8,85; 0,4 % (w/v) SDS
- 4x Sammelgelpuffer:**                      500 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,4 % (w/v) SDS
- 10x Laufpuffer:**                      250 mM Tris/HCl pH 8,3; 1 % (w/v) SDS; 1,87 M Glycin

Proteinlösungen wurden mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt und anschließend der elektrophoretischen Trennung unterzogen. Für nicht-reduzierende Bedingungen wurde 5x SDS-Probenpuffer ohne β-Mercaptoethanol verwendet. Bei Minigelen (8,5 cm x 10 cm) wurde die



Elektrophorese 1 h bei einer Spannung von 175 V und einer Stromstärke von 150 mA durchgeführt. Bei großen Gelen (14 cm x 16,5 cm) geschah dies für 2 h bei 200 V und 150 mA. Um die Proteine sichtbar zu machen, wurden die Gele 1 h in Färbelösung geschwenkt. Der Hintergrund wurde durch drei zehnmütige Waschschrirte in Entfärbelösung entfärbt.

**5x SDS-Probenpuffer:** 100 mM Tris/HCl pH 8,0; 4,8 % (w/v) SDS; 16 % (v/v) Glycerol; 2 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau  
**Färbelösung:** 10 % (v/v) Essigsäure; 1 g/l Brilliant Blau G250  
**Entfärbelösung:** 10 % (v/v) Essigsäure; 10 % (v/v) Ethanol

#### 2.2.4.2 Western-Blot

Die immunologische Detektion mittels SDS-PAGE aufgetrennter Proteine (Kapitel 2.2.4.1) wurde mit einem Western-Blot unter Verwendung spezifischer Antikörper durchgeführt. Nach 10 min Einweichen in WB-Transferpuffer wurden drei *Whatman*-Papierblätter, eine Nitrozellulose-Membran, das SDS-Polyacrylamid-Gel und nochmals drei *Whatman*-Papierblätter in einer *semi-dry*-Apparatur übereinander gelegt. Die Proteine wurden bei einer Spannung von 40 V und einer Stromstärke von 2 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche 1,5 h lang auf die Membran übertragen. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4 °C in Blockierpuffer inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3 h bei 4 °C mit dem primären Antikörper, verdünnt in Blockierpuffer, geschwenkt. Als Nächstes folgten drei zehnmütige Waschschrirte mit Waschlösung. Danach wurde die Membran 1 h bei 4 °C mit dem sekundären Antikörper, ebenfalls in Blockierpuffer verdünnt, inkubiert. Es folgten erneut drei zehnmütige Waschschrirte. Die Membran wurde 1 min in ddH<sub>2</sub>O geschwenkt und 1 min mit 1 ml des *enhanced chemiluminescence reagent* (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg) inkubiert. Die Chemilumineszenz wurde mit einem „*Lumi-Film*“ detektiert.

**WB-Transferpuffer:** 20 mM Tris/HCl pH 8,5; 150 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol; 0,05 % (w/v) SDS  
**Blockierpuffer:** 10 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,05 % (v/v) Tween 20; 5 % (w/v) Magerilchpulver; 5 % (w/v) BSA  
**WB-Waschpuffer:** 10 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,1 % Tween 20

#### 2.2.4.3 Dot-Blot

Bei einem Dot-Blot wurden Proteinlösungen direkt auf eine Nitrozellulose-Membran pipettiert. Nach kurzem Trocknen wurde die Membran dreimal mit 10 ml WB-Waschpuffer (Kapitel 2.2.4.2) gewaschen. Die weiteren Arbeiten ab der Inkubation in Blockierpuffer wurden wie bei einem Western-Blot durchgeführt (Kapitel 2.2.4.2).

#### 2.2.4.4 Filter trap assay

Der *filter trap assay* diente zur Bestimmung des löslichen und unlöslichen Anteils an PABPN1 in Zellkulturen [114]. Dazu wurden HEK293-Zellen einer 80-100 % konfluenten 25 cm<sup>2</sup>-Flasche in 200 µl Lysepuffer resuspendiert und mit 10 µl 20x *Complete Mini* Proteaseinhibitor versetzt. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen zentrifugiert (16000 x g; 10 min; 4 °C). Der Überstand bildete die Probe der löslichen Fraktion. Das Pellet wurde in 200 µl Lysepuffer resuspendiert und mit einer Ultraschallsonde drei Mal zehn Pulsen bei 70 % Amplitude unterzogen. Diese Suspension stellte die Probe der unlöslichen Fraktion dar. Je 10 µl der Proben der löslichen und der unlöslichen Fraktion wurden in jeweils 200 µl Lysepuffer verdünnt und 3 min bei 95 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 5 µl der Proben auf die Nitrozellulose-Membran aufgetragen.

Nach 1 min Trocknen wurde die Membran 1 min in PBS geschwenkt und unter angelegtem Vakuum dreimal mit 20 ml Waschpuffer gewaschen. Danach wurde die Membran 3 min in WB-Transferpuffer (Kapitel 2.2.4.2) und 1 min in PBS geschwenkt. Die weiteren Schritte ab der Inkubation in Blockierpuffer waren zu denen in Kapitel 2.2.4.2 identisch. Die densitometrische Auswertung des *filter trap assay* wurde mit dem Programm *ImageQuant* (GE Healthcare) durchgeführt. Der Anteil an unlöslichem PABPN1 in Prozent wurde nach Gleichung 1 bestimmt.

$$\text{Gleichung 1: } U_{\%} = \frac{U_{\text{absolut}}}{U_{\text{absolut}} + L_{\text{absolut}}} \cdot 100 \%$$

$U_{\%}$       prozentualer Anteil an unlöslichem PABPN1

$U_{\text{absolut}}$     absoluter Anteil an unlöslichem PABPN1

$L_{\text{absolut}}$     absoluter Anteil an löslichem PABPN1

**Lysepuffer:**                                    10 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 2,0 % (w/v) SDS

**Waschpuffer:**                                    10 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,1 % (w/v) SDS

**20x *Complete Mini* Proteaseinhibitor:**    1 Tablette gelöst in 0,5 ml ddH<sub>2</sub>O

#### 2.2.4.5 Immunfluoreszenzmikroskopie

Diese Methode diente zur Analyse der subzellulären Lokalisation von PABPN1. Zur Vorbereitung wurden Deckgläschen mit einem Durchmesser von 10 mm in 40 % HCl; 60 % Ethanol über Nacht angeätzt. Die Deckgläschen wurden unter fließendem Wasser gewaschen und in 70 % Ethanol gelagert. Die vorbereiteten Deckgläschen wurden in Kulturschalen gelegt. HEK293-Zellen wurden in einer Konfluenz von etwa 30 % in den Kulturschalen ausgesät. Am nächsten Tag wurden der Kulturüberstand abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Es folgte ein Fixierungsschritt mit 3,7 % (w/v) Paraformaldehyd in

PBS für 45 min. Als nächstes wurden die Zellen in 0,5 % (v/v) Triton X-100 in PBS 3 min permeabilisiert. Ein Blockierungsschritt wurde mit 1 % (w/v) BSA in PBS 40 min lang durchgeführt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (Anti-Strep-Tag StrepMAB Classic; 1:2000 verdünnt in 1 % (w/v) BSA in PBS) erfolgte für 1 h. Es folgten drei fünfminütige Waschschrte mit PBS. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper fand im Dunklen für 1 h statt (Anti-IgG Maus; konjugiert mit *DyLight*<sup>®</sup> 488; 1:1000 verdünnt in 1 % (w/v) BSA in PBS). Es folgten zwei fünfminütige Waschschrte mit PBS und eine Inkubation mit 300 nM DAPI in ddH<sub>2</sub>O für weiter 5 min. Daraufhin wurden die Zellen zweimal für 5 min mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und danach in absolutem Ethanol dehydriert. Die Deckgläschen mit den präparierten Zellen wurden mit 5 µl *ProLong Antifade* (Invitrogen) auf Objekträgern fixiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten an einem E600-Mikroskop (Nikon, Düsseldorf) mit einer C4742-95-Kamera (Hamamatsu, Herrsching am Ammersee).

#### **2.2.4.6 Filterbindungsexperiment**

Dieses Experiment diente der Bestimmung der Bindungsaffinität von PABPN1 an <sup>32</sup>P-markierte A14-RNA und A98-RNA nach einer Methode von SACHS und KORNBERG [151]. Das Prinzip beruht auf der Bindung von PABPN1 bzw. PABPN1-RNA-Komplexen an einen Nitrozellulosefilter. Freie RNA wird jedoch nicht gebunden. Die 50 µl-Reaktionen in Filterbindungspuffer enthielten 1,43 fmol A98-RNA oder 10 fmol A14-RNA. PABPN1 wurde zu einer Endkonzentration von 1 nM bis 1 µM zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurden 45 µl der Ansätze auf einen Nitrozellulosefilter pipettiert. Um eine unspezifische Bindung der RNA zu verhindern, wurden die Filter zuvor in Waschpuffer eingeweicht, welcher mit 0,5 µg/ml rRNA versetzt war. Anschließend wurden die Filter mit je 5 ml eiskaltem Waschpuffer gewaschen, in Szintillationsröhrchen überführt und mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt (*LumasafePlus*, Perkin Elmer). Die Menge an gebundener RNA wurde durch einen Szintillationszähler (TRI-CARB 2100TR, Packard) quantifiziert. Das Hintergrundsignal wurde durch einen Ansatz ohne PABPN1 gemessen und von den Proben subtrahiert. Die Auswertung erfolgte nach einer hyperbolen mathematischen Anpassung (Gleichung 2) der direkt aufgetragenen Daten oder einer linearen Anpassung (Gleichung 3) der doppelt-reziproken Auftragung nach LINEWEAVER-BURK [125, 152, 153]. Der Abszissenschnittpunkt von Gleichung 3 entspricht  $-1/K_D$ .

Gleichung 2:  $[R] = \frac{[R]_{\max} \cdot [P]}{[P] + K_D}$

Gleichung 3:  $\frac{1}{[R]} = \frac{1}{[R]_{\max}} + a \cdot \frac{1}{[P]}$

[R]	Stoffmenge gebundener RNA	[P]	eingesetzte Stoffmenge Protein
$[R]_{\max}$	maximale Stoffmenge gebundener RNA	a	Anstieg
$K_D$	apparente Dissoziationskonstante		

**Filterbindungspuffer (FBK100):** 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 100 mM KCl; 1 mM EDTA; 10 % (v/v) Glycerol; 0,5 mM DTT; 0,01 % (v/v) NP-40; 0,2 mg/ml methyliertes BSA

**Waschpuffer:** 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 100 mM KCl; 1 mM EDTA

#### 2.2.4.7 Gel shift-Experiment

Diese Methode ermöglicht den Nachweis von PABPN1-RNA-Komplexen in einem nativen Polyacrylamid-Agarose-Komposit-Gel [154] und erlaubt Aussagen über die Stöchiometrie und Kooperativität der Bindung von PABPN1 an radioaktiv markierte RNA. Die 20 µl-Reaktionen in Filterbindungspuffer (Kapitel 2.2.4.6) enthielten 0,77 nM <sup>32</sup>P-markierte A98-RNA und 0,5 nM bis 27 nM PABPN1. Die Ansätze wurden 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 360 V. Als Laufpuffer diente 0,5x TBE-Puffer. Nach der Trocknung des Gels wurde zur Detektion der radioaktiven RNA ein *Storage-Phosphor-Screen* aufgelegt. Für die Auswertung kam ein *Phosphor-Imager* zum Einsatz.

Pipettierschema für ein Polyacrylamid-Agarose-Komposit-Gel:

- 50 ml 1 % Agarose in ddH<sub>2</sub>O
- 50 ml 6 % Acrylamid-Lösung; bestehend aus:
  - 10 ml 30 % Acrylamid / Bisacrylamid im Verhältnis 80:1
  - 5 ml 10x TBE-Puffer
  - 35 ml ddH<sub>2</sub>O

**10x TBE-Puffer:** 890 mM Tris; 890 mM Borsäure pH 8,0; 20 mM EDTA

#### 2.2.4.8 Polyadenylierungs-Experiment

Mit diesem Experiment wurde die Stimulation der Poly(A)-Polymerase (PAP) durch PABPN1 untersucht (Wahle 1995). Die 20 µl-Reaktionsansätze in 1x SPAB-Puffer enthielten 4 nM <sup>32</sup>P-markierte A98-RNA, 1 µg tRNA, 2 nM PAP und 1 mM ATP. Den Ansätzen wurde PABPN1 zu einer Endkonzentration von 0 - 72 nM zugesetzt. Die Polyadenylierung erfolgte für 20 min bei 30 °C. Anschließend wurden die Reaktionen mit 200 µl eines Stop-Mix versetzt. Dieser enthielt 0,1 mg/ml Proteinase K und 25 µg/ml tRNA in 1x PK-Puffer. Nach 30 min Inkubation

bei 37 °C wurde die A98-RNA durch eine Ethanol-Fällung präzipitiert (Kapitel 2.2.3.5). Die Proben wurden in 10 µl Formamid-Ladepuffer aufgenommen, 5 min bei 95 °C erhitzt und auf das Gel aufgetragen. Die Verlängerung der A98-RNA wurde mittels eines denaturierenden Polyacrylamid-Harnstoff-Gels untersucht [155]: 8 % (Acrylamid / Bisacrylamid im Verhältnis 19:1) in 1x TBE-Puffer (Kapitel 2.2.4.7) versetzt mit 8,3 M Harnstoff. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Leistung von 20 W. Detektiert wurde wie in Kapitel 2.2.4.7 beschrieben.

**2x SPAB-Puffer:** 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 100 mM KCl; 20 % (v/v) Glycerol; 0,1 mM EDTA; 0,8 mg/ml methyliertes BSA; 0,02 % (v/v) NP-40; 4 % (w/v) PEG 6000; 4 mM Magnesiumacetat; 1,25 mM DTT

**2x PK-Puffer:** 0,2 M Tris/HCl pH 7,5; 25 mM EDTA; 0,3 M NaCl; 2 % (w/v) SDS

**Formamid-Ladepuffer:** 80 % Formamid, 1 mM EDTA, 200 µg/ml Bromphenolblau, 200 µg/ml Xylencyanol

#### 2.2.4.9 Präparation von Zellkernextrakt

Zellkernextrakt wurde nach einem Protokoll von Elmar Wahle und Walter Keller präpariert [156]. Ca. 0,5 g Zellfeuchtmasse an HEK293-Zellen wurde in 0,5 ml eiskaltem Puffer A resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden durch 20-faches Auf- und Abziehen in einem 2 ml *Dounce Homogenizer* auf Eis aufgeschlossen. Die Zellkerne wurden danach durch Zentrifugation (2000 x g; 15 min; 4 °C) sedimentiert. Anschließend wurden die Zellkerne in 0,25 ml Puffer B resuspendiert. Unter vorsichtigem Mischen wurde 0,25 ml Puffer C zugegeben. Die Zellkerne wurden als Nächstes durch 20-faches Auf- und Abziehen im *Dounce Homogenizer* auf Eis homogenisiert. Die Suspension wurde 30 min bei 4 °C geschwenkt und anschließend zentrifugiert (16000 x g; 30 min; 4 °C). Der Zellkernextrakt wurde als Überstand abgenommen, gegen PABPN1-Puffer dialysiert und bei -70 °C gelagert.

**Puffer A:** 10 mM HEPES/KOH pH 7,9; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM KCl; 0,5 mM DTT

**Puffer B:** 20 mM HEPES/KOH pH 7,9; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM EDTA; 20 mM NaCl; 25 % Glycerol; 0,5 mM DTT; 0,5 mM PMSF

**Puffer C:** wie Puffer B, jedoch mit 1,2 M NaCl

**PABPN1-Puffer:** 50 mM Tris/HCl pH 7,9; 1,5 M KCl; 10 % Glycerol; 1 mM EDTA; 1 mM DTT

## 2.2.5 Biophysikalische Methoden

### 2.2.5.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde durch Extinktionsmessung bestimmt. Aus der Extinktion bei 280 nm wurde nach dem LAMBERT-BEER-Gesetz die Proteinkonzentration bestimmt (Gleichung 4):

Gleichung 4:  $E_{280} = \epsilon_{280} \cdot c \cdot d$

$E_{280}$	Extinktion bei 280 nm	$c$	Proteinkonzentration (M)
$\epsilon_{280}$	Molarer Extinktionskoeffizient eines Proteins bei 280 nm ( $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )	$d$	Schichtdicke (cm)

Die molaren Extinktionskoeffizienten der Proteine bei 280 nm ( $\epsilon_{280}$ ) wurden anhand der Aminosäurezusammensetzung über das *ProtParam tool* (<http://web.expasy.org/protparam/>) bestimmt [157]. Eine Zusammenstellung der Extinktionskoeffizienten ist in Tabelle 14 gegeben.

Protein	$\epsilon_{280} (M^{-1} \text{ cm}^{-1})$	Protein	$\epsilon_{280} (M^{-1} \text{ cm}^{-1})$
WT-PABPN1	20400	WT-RNP	4470
$\Delta$ Cys-PABPN1	20400	$\Delta$ Cys-RNP	4470
dS-PABPN1	20525	dS-RNP	4595
SH-PABPN1	20400	SH-RNP	4470

Tabelle 14: Molare Extinktionskoeffizienten der untersuchten Proteinvarianten.

### 2.2.5.2 Konzentrierung von Proteinlösungen

Proteinlösungen mit einem Volumen unter 160 ml wurden mit einer *Amicon® Stirred Ultrafiltration Cell 8200* konzentriert. Bei Volumina über 160 ml wurde die Konzentrierung mit einer *Vivaflow® 200* Tangentialflusszelle durchgeführt. Es wurden Membranen mit einem MWCO von 3 kDa (RNP-Domäne) oder 10 kDa (PABPN1) genutzt.

### 2.2.5.3 Ultrazentrifugation

Zur Abtrennung von Fibrillen oder amorphen Proteinaggregaten aus Proteinlösungen erfolgte eine Ultrazentrifugation für 1 h bei 4 °C und 60000 rpm in einer *Optima TLX CE* Ultrazentrifuge (Beckman Coulter, Krefeld).

### 2.2.5.4 Analytische Ultrazentrifugation

Mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation lassen sich Aussagen zur Homogenität und zum apparenten Molekulargewicht von Proteinproben treffen (Svedberg & Pedersen 1940). Die Experimente wurden bei 20 °C und einer Proteinkonzentration von 0,3 mg/ml in AUC-Puffer durchgeführt. Zur Untersuchung der Proteinvariante SH-RNP wurde dem Puffer 5 mM TCEP zugesetzt. Die Sedimentationsgeschwindigkeit wurde für 5 h bei 40000 rpm analysiert. Anschließend wurde die Einstellung des Sedimentationsgleichgewichtes bei 20000 rpm verfolgt. Alle Experimente wurden an einer *Optima™ XL-A Analytical Ultracentrifuge* mit

einem *AnTi50*-Rotor in Doppelsektorzellen (Beckman Coulter, Krefeld) durchgeführt. Die Detektion von WT-RNP,  $\Delta$ Cys-RNP und dS-RNP erfolgte bei 280 nm. Bei der Variante SH-RNP wurde wegen des Reduktionsmittels TCEP im Puffer bei 230 nm detektiert. Die Experimente und die Datenauswertung mit der *Beckman Instruments* Software wurden von PD Dr. Hauke Lilie (MLU Halle-Wittenberg, Institut für Biochemie und Biotechnologie) durchgeführt.

**AUC-Puffer:** 20 mM Tris/HCl pH 7,5; 5 mM EDTA

### 2.2.5.5 Circular dichroismus

Die Sekundär- und Tertiärstrukturanteile von Proteinen wurden durch die Aufnahme von CD-Spektren an einem *J-810 Spectropolarimeter* analysiert. Für die Messungen wurden Quarzglas-Küvetten (Hellma, Müllheim) verwendet. Bei einer Messgeschwindigkeit von 50 nm/min wurde alle 0,2 nm ein Datenpunkt aufgenommen. Die Spaltbreite betrug 1 nm. Die untersuchten Proteinlösungen hatten eine Konzentration zwischen 0,5 und 1,5 mg/ml und die Temperatur lag bei 20 °C. Die Spektren wurden 60-fach akkumuliert und pufferkorrigiert. Fern-UV CD-Spektren wurden in einer Küvette mit einer Schichtdicke von 0,01 cm gemessen und auf die mittlere residuelle Elliptizität  $[\Theta]_{MRW}$  normiert (Gleichung 5). Bei der Messung von Nah-UV CD-Spektren wurde eine Küvette mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet und das Messsignal in die molare Elliptizität  $[\Theta]$  umgerechnet (Gleichung 6).

$$\text{Gleichung 5: } [\Theta]_{MRW} = \frac{\Theta \cdot M}{c \cdot d \cdot N \cdot 10}$$

$$\text{Gleichung 6: } [\Theta] = \frac{\Theta \cdot M}{c \cdot d \cdot 10}$$

$[\Theta]_{MRW}$	mittlere residuelle Elliptizität (deg cm <sup>2</sup> d mol <sup>-1</sup> )	c	Proteinkonzentration (mg/ml)
$[\Theta]$	molare Elliptizität (deg cm <sup>2</sup> d mol <sup>-1</sup> )	d	Schichtdicke der Küvette (cm)
$\Theta$	gemessene Elliptizität (mdeg)	N	Anzahl der Aminosäuren
M	Molekulargewicht (g/mol)		

### 2.2.5.6 Fluoreszenzspektroskopie

Durch die Messung der intrinsischen Fluoreszenz der aromatischen Aminosäuren wurden Informationen zur Tertiärstruktur von Proteinen gewonnen. Die Messungen wurden an einem *Fluoromax-3* Fluoreszenzspektrometer durchgeführt. Es wurden Quarzglasküvetten mit der Schichtdicke 1 cm (Hellma, Müllheim) verwendet und die Temperatur lag bei 20 °C. Die Spaltbreite für die Anregung betrug 5 nm und für die Emission 8 nm. Es wurde alle 1 nm ein Messpunkt aufgenommen und das Signal für 0,2 s integriert. Spektren wurden 10-fach akkumuliert und pufferkorrigiert. Die Messungen von Vollängen-PABPN1 erfolgten bei einer Protein-konzentration von 4,5  $\mu$ M und einer Anregungswellenlänge von entweder 280 nm

oder 295 nm. Die Analysen der RNP-Domäne erfolgten bei einer Proteinkonzentration von 10  $\mu\text{M}$ . Die Anregungswellenlänge lag bei 274 nm.

### 2.2.5.7 Entfaltungs- und Faltungsexperimente

#### Harnstoff-induzierte Entfaltungsübergänge

Die thermodynamische Stabilität der RNP-Domäne-Varianten wurde durch Harnstoff-induzierte-Entfaltungsübergänge bestimmt [158]. Zur Vereinfachung wird in dieser Arbeit die Gibbs'sche freie Entfaltungsenthalpie in Gegenwart von Denaturans als  $\Delta G_D(\text{obs})$  bezeichnet und die Gibbs'sche freie Entfaltungsenthalpie in Abwesenheit von Denaturans als  $\Delta G_D$ . Die freie Gibbs'sche Entfaltungsenthalpie  $\Delta G_D(\text{obs})$  ist ein Maß für die Stabilität eines Proteins unter definierten Bedingungen (Gleichung 7). Die Gleichgewichtskonstante  $K_D$  entspricht dem Verhältnis von denaturiertem zu nativem Protein (Gleichung 8). Die Gibbs'sche freie Entfaltungsenthalpie steht in einer linearen freien Enthalpiebeziehung zur Konzentration des Denaturierungsmittels. Durch Harnstoff-induzierte Entfaltungsübergänge lässt sich die Gibbs'sche freie Entfaltungsenthalpie in Abwesenheit von Harnstoff  $\Delta G_D$  bestimmen (Gleichung 9). Am Übergangsmittelpunkt gilt  $\Delta G_D(\text{obs})$  gleich Null, sodass die Harnstoffkonzentration am Übergangsmittelpunkt nach Gleichung 10 berechnet werden kann. Die genaue Harnstoffkonzentration jeder Probe wurde refraktometrisch bestimmt. Dazu wurde der Brechungsindex gemessen und um den Wert des Puffers korrigiert ( $\Delta N$ ). Die Harnstoffkonzentration wurde anschließend nach Gleichung 11 berechnet [159]. Das Gleichgewicht von denaturiertem und nativem Protein wurde durch Fluoreszenz- und CD-Spektroskopie untersucht. Das gemessene Signal wurde unter Annahme eines Zweizustandsmodells gegen die Harnstoffkonzentration aufgetragen und nach Gleichung 12 ausgewertet [160]. Die Normierung der Entfaltungsübergänge auf den Anteil an gefaltetem Protein wurde nach Gleichung 13 vorgenommen [158, 160].

$$\text{Gleichung 7: } \Delta G_D(\text{obs}) = -R \cdot T \cdot \ln K_D$$

$$\text{Gleichung 8: } K_D = \frac{[U]}{[N]}$$

$$\text{Gleichung 9: } \Delta G_D(\text{obs}) = \Delta G_D - m \cdot [D]$$

$$\text{Gleichung 10: } [D]_{1/2} = \frac{\Delta G_D}{m}$$

$$\text{Gleichung 11: } [D] = 117,66 \cdot \Delta N + 29,753 \cdot \Delta N^2 + 185,56 \cdot \Delta N^3$$

$$\text{Gleichung 12: } y = \frac{(y_N + m_N \cdot [D]) + (y_D + m_D \cdot [D]) \cdot e^{-\left(\frac{\Delta G_D - m \cdot [D]}{R \cdot T}\right)}}{1 + e^{-\left(\frac{\Delta G_D - m \cdot [D]}{R \cdot T}\right)}}$$



Gleichung 13: 
$$A_N = \frac{y - (y_D + m_D \cdot [D])}{(y_N + m_N \cdot [D]) - (y_D + m_D \cdot [D])}$$

$\Delta G_D(\text{obs})$	Gibbs'sche freie Entfaltungsenthalpie ( $\text{J mol}^{-1}$ )
$\Delta G_D$	Gibbs'sche freie Entfaltungsenthalpie in Abwesenheit von Harnstoff ( $\text{J mol}^{-1}$ )
R	universelle Gaskonstante ( $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ )
T	absolute Temperatur (K)
$K_D$	Gleichgewichtskonstante der Entfaltung
[U]	Anteil denaturiertes Protein
[N]	Anteil natives Protein
m	m-Wert bzw. Kooperativität ( $\text{J mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ )
[D]	Harnstoffkonzentration (M)
$[D]_{1/2}$	Harnstoffkonzentration am Übergangsmittelpunkt (M)
$\Delta N$	Differenz des Brechungsindex von Probe und Puffer
y	Messwert
$y_N$	Ordinatenschnittpunkt des Plateaus für natives Protein
$y_D$	Ordinatenschnittpunkt des Plateaus für denaturiertes Protein
$m_N$	Anstieg des Plateaus für natives Protein
$m_D$	Anstieg des Plateaus für denaturiertes Protein
$A_N$	Anteil an nativem Protein

Alle Inkubationsschritte und Messungen erfolgten in RNP-Puffer bei einer Temperatur von 20 °C. Für die Variante SH-RNP enthielt der Puffer zusätzlich 5 mM TCEP. Entfaltungsexperimente erfolgten ausgehend von den nativen Proteinen in RNP-Puffer. Für Rückfaltungsexperimente wurden die Proteine zunächst zur vollständigen Denaturierung gegen 8 M Harnstoff in RNP-Puffer dialysiert. Um die Entfaltung oder Faltung zu untersuchen, wurde natives oder denaturiertes Protein in RNP-Puffer mit verschiedenen Harnstoffkonzentrationen auf eine Endkonzentration von 2,5  $\mu\text{M}$  verdünnt. Die Proben wurden mindestens 8 h vor der Messung inkubiert.

Die Harnstoff-induzierte Entfaltung der RNP-Domäne-Varianten wurde mittels Fluoreszenz an einem *Fluoromax-3* Fluoreszenzspektrometer in Quarzglasküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm (Hellma, Müllheim) gemessen. Als Anregungswellenlänge wurde 274 nm gewählt. Die Fluoreszenz wurde bei 307 nm aufgezeichnet. Die Spaltbreite für die Anregung betrug 5 nm und für die Emission 8 nm. Über eine Dauer von 30 s wurde alle 0,2 s ein Messpunkt aufgenommen. Aus den Messpunkten wurde ein Mittelwert gebildet. Die Pufferkorrektur erfolgte anhand einer Kalibriergeraden von 0 - 8 M Harnstoff in RNP-Puffer.

Die Entfaltung der Sekundärstruktur der RNP-Domäne-Varianten wurde an einem *J-810 Spectropolarimeter* (Jasco) mittels CD-Spektroskopie bei 220 nm untersucht. Die Spaltbreite betrug 1 nm. Die Messungen wurden in Quarzglasküvetten der Schichtdicke 1 cm (Hellma, Müllheim) bei 20 °C durchgeführt. Für eine Messzeit von 2 min wurde jede Sekunde ein Messpunkt aufgenommen. Aus den Messpunkten wurde ein Mittelwert gebildet. Die Pufferkorrektur wurde, wie bei der Fluoreszenzmessung beschrieben, vorgenommen.

**RNP-Puffer:** 20 mM Tris/HCl pH 7,5

#### Untersuchung der Faltungskinetik mittels *stopped-flow*-Messungen

Die Faltungskinetik der RNP-Domäne-Varianten wurde mittels *stopped-flow*-Messungen verfolgt. Die Faltungskinetiken wurden unter Annahme eines Zweizustandsmodells entsprechend einer exponentiellen Reaktion 1. Ordnung nach Gleichung 14 ausgewertet. Zwischen dem natürlichen Logarithmus der Geschwindigkeitskonstante der Faltung bzw. Entfaltung eines Proteins und der Konzentration des Denaturierungsmittels besteht eine lineare freie Enthalpiebeziehung (Gleichung 15). Die apparenten Geschwindigkeitskonstanten der aufgezeichneten Faltungskinetiken wurden in einem Chevron-Plot gegen die entsprechende Harnstoffkonzentration aufgetragen. Durch Auswertung des Chevron-Plots nach Gleichung 16 wurden die Geschwindigkeitskonstanten der Faltung  $k_f^0$  und Entfaltung  $k_u^0$  in Abwesenheit von Harnstoff, sowie die Anstiege der Faltungs- und Entfaltungssäste  $m_f$  und  $m_u$  erhalten [161]. Aus den ermittelten Werten wurden die Gleichgewichtskonstante  $K_D$ , die Gibbs'sche freie Entfaltungsenthalpie  $\Delta G_D$  und der  $m$ -Wert, welcher der Kooperativität von Harnstoff-induzierten Entfaltungsübergängen entspricht, berechnet (Gleichung 17, Gleichung 18 und Gleichung 19) [162]. Der Übergangsmittelpunkt wurde nach Gleichung 10 berechnet und entspricht dem Schnittpunkt des Faltungssastes mit dem Entfaltungssast.

$$\text{Gleichung 14: } y = y_0 + a \cdot e^{-k_{\text{obs}} \cdot t}$$

$$\text{Gleichung 15 a: } \ln k_f = \ln k_u^0 - m_f \cdot [D]$$

$$\text{Gleichung 15 b: } \ln k_u = \ln k_u^0 + m_u \cdot [D]$$

$$\text{Gleichung 16: } \ln k_{\text{obs}} = \ln \left( k_f^0 \cdot e^{-m_f \cdot [D]} + k_u^0 \cdot e^{m_u \cdot [D]} \right)$$

$$\text{Gleichung 17: } K_D = \frac{k_u^0}{k_f^0}$$

$$\text{Gleichung 18: } \Delta G_D = -R \cdot T \cdot \ln \frac{k_u^0}{k_f^0}$$

$$\text{Gleichung 19: } m = R \cdot T \cdot (m_u - m_f)$$

y	Messwert
$y_0$	Ordinatenschnittpunkt
a	Signalamplitude
$k_{\text{obs}}$	apparente Geschwindigkeitskonstante ( $\text{s}^{-1}$ )
t	Zeit (s)
$k_f$	Geschwindigkeitskonstante der Faltung ( $\text{s}^{-1}$ )
$k_u$	Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung ( $\text{s}^{-1}$ )
$k_f^0$	Geschwindigkeitskonstante der Faltung in Abwesenheit von Harnstoff ( $\text{s}^{-1}$ )
$k_u^0$	Geschwindigkeitskonstante der Entfaltung in Abwesenheit von Harnstoff ( $\text{s}^{-1}$ )
$m_f$	Anstieg Faltungsast ( $\text{M}^{-1}$ )
$m_u$	Anstieg Entfaltungsast ( $\text{M}^{-1}$ )
[D]	Harnstoffkonzentration (M)
$K_D$	Gleichgewichtskonstante der Entfaltung
$\Delta G_D$	Gibbs'sche freie Entfaltungsenthalpie in Abwesenheit von Harnstoff ( $\text{J mol}^{-1}$ )
m	m-Wert bzw. Kooperativität ( $\text{J mol}^{-1} \text{M}^{-1}$ )
R	universelle Gaskonstante ( $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ )
T	absolute Temperatur (K)

Die Messungen erfolgten in RNP-Puffer bei einer Temperatur von 20 °C. Natives Protein in RNP-Puffer oder denaturiertes Protein in 8 M Harnstoff in RNP-Puffer wurden in eine Spritze des Gerätes geladen. In die andere Spritze wurde RNP-Puffer mit verschiedenen Harnstoffkonzentrationen geladen. Zur Messung wurde ein Volumenanteil Proteinlösung zusammen mit zehn Volumenanteilen Puffer in eine Mischzelle geschossen und in eine Küvette weitergeleitet. Zur Ermittlung der apparenten Geschwindigkeitskonstanten wurden für jede Harnstoffkonzentration 4-12 Einzelkinetiken aufgezeichnet und gemittelt.

Die Messungen der Faltungskinetiken mittels des Fluoreszenzsignals wurden an einem SX20 *stopped-flow fluorimeter* (Applied Photophysics, Leatherhead, UK) durchgeführt. Die Endkonzentration an Protein betrug 5  $\mu\text{M}$ . Die Anregung erfolgte bei 280 nm. Unter Einsatz eines *cut-off*-Filters wurde die Integralfluoreszenz oberhalb von 305 nm aufgezeichnet.

Die Untersuchungen der Faltungskinetiken anhand des CD-Signals wurden an einem *Pi-Star-180 Spectrometer* (Applied Photophysics, Leatherhead, UK) vorgenommen. Die Signale wurden bei 235 nm und einer Spaltbreite von 1 nm aufgezeichnet. Die finale Proteinkonzentration lag bei 25  $\mu\text{M}$ .

## Temperatur-induzierte Denaturierung

Die thermische Stabilität der RNP-Domäne-Varianten wurde durch Temperatur-induzierte Entfaltungsübergänge untersucht. Die Entfaltung wurde anhand der Sekundärstrukturen durch Messung des CD-Signals bei 208 nm verfolgt. Vor der Messung wurden die Proben gegen RNP<sup>K</sup>-Puffer dialysiert. Die Messungen wurden an einem *J-810 Spectropolarimeter* (Jasco) in einer Quarzglasküvette mit einer Schichtdicke von 1 mm (Hellma, Müllheim) und bei einer Spaltbreite von 1 nm durchgeführt. Die Temperaturänderung pro Zeiteinheit lag bei 1 K/min. Alle 0,2 K wurde ein Messpunkt aufgezeichnet. Die gemessene Elliptizität wurde gegen die Temperatur aufgetragen und nach Gleichung 20 ausgewertet [163]. Die Temperatur-induzierten Entfaltungsübergänge wurden auf den Anteil an gefaltetem Protein nach Gleichung 13 normiert.

Entsprechend der GIBBS-HELMHOLTZ-GLEICHUNG besteht ein Zusammenhang zwischen der Gibbs'schen freien Entfaltungsenthalpie, der Entfaltungsenthalpie und der Entfaltungsentropie (Gleichung 21). Am Übergangsmittelpunkt ist die Gibbs'sche freie Entfaltungsenthalpie gleich Null. Folglich kann dort die Entfaltungsentropie direkt berechnet werden (Gleichung 22). Um die Entfaltungsenthalpie und die Entfaltungsentropie für verschiedene Proteine besser vergleichen zu können, wurden die Werte mit Hilfe von Gleichung 23 und Gleichung 24 auf eine Temperatur von 20 °C umgerechnet [164].

$$\text{Gleichung 20: } y = \frac{(y_N + m_N \cdot T) + (y_D + m_D \cdot T) \cdot e^{-\left[\left(\frac{\Delta H_m(\text{vH})}{R \cdot T}\right) \cdot \left(\frac{T - T_m}{T_m}\right)\right]}}{1 + e^{-\left[\left(\frac{\Delta H_m(\text{vH})}{R \cdot T}\right) \cdot \left(\frac{T - T_m}{T_m}\right)\right]}}$$

$$\text{Gleichung 21: } \Delta G_D^T = \Delta H_D^T - T \cdot \Delta S_D^T$$

$$\text{Gleichung 22: } \Delta S_m = \frac{\Delta H_m(\text{vH})}{T_m}$$

$$\text{Gleichung 23: } \Delta H_D^T = \Delta H_m + \Delta C_p \cdot (T - T_m)$$

$$\text{Gleichung 24: } \Delta S_D^T = \Delta S_m + \Delta C_p \cdot \ln(T/T_m)$$

y	Gemessene Elliptizität (mdeg)
y <sub>N</sub>	Ordinatenschnittpunkt des Plateaus für natives Protein
y <sub>D</sub>	Ordinatenschnittpunkt des Plateaus für denaturiertes Protein
m <sub>N</sub>	Anstieg des Plateaus für natives Protein
m <sub>D</sub>	Anstieg des Plateaus für denaturiertes Protein
T	absolute Temperatur (K)
T <sub>m</sub>	Temperatur am Übergangsmittelpunkt (K)
ΔH <sub>m</sub> (vH)	Entfaltungsenthalpie am Übergangsmittelpunkt nach Van't Hoff (J mol <sup>-1</sup> )

$\Delta H_D^T$	Entfaltungsenthalpie bei einer Temperatur T (J mol <sup>-1</sup> )
$\Delta S_m$	Entfaltungsentropie am Übergangsmittelpunkt (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
$\Delta S_D^T$	Entfaltungsentropie bei einer Temperatur T (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
R	universelle Gaskonstante (8,314 J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
$\Delta G_D^T$	Gibbs'sche freie Entfaltungsenthalpie bei einer Temperatur T (J mol <sup>-1</sup> )
$\Delta C_p$	Änderung der spezifische Wärmekapazität (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )

**RNP<sup>K</sup>-Puffer:** 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,5

### 2.2.5.8 Temperatur-induzierte Denaturierung von Vollängen-PABPN1

Die Stabilität von PABPN1 wurde durch Temperatur-induzierte Denaturierung mit verschiedenen Detektionsmethoden verfolgt. Die Messungen erfolgten in PABPN1<sup>K</sup>-Puffer.

#### Streulicht-Messung

Die Experimente wurden an einem *Fluoromax-3* Fluoreszenzspektrometer in Quarzglas-küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm (Hellma, Müllheim) durchgeführt. Das Streulicht wurde bei steigenden Temperaturen im Abstand von 1 K gemessen. Während der Messung wurde bei 2000 rpm gerührt. Die Temperaturänderung pro Zeiteinheit lag zwischen 0,5 und 2 K/min. Eine exaktere Einstellung war gerätebedingt nicht möglich. Bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm wurde von 353 nm bis 367 nm alle 1 nm ein Messpunkt mit einer Integrationszeit von 0,5 s aufgezeichnet. Die Spaltbreite für Anregung und Emission betrug je 5 nm. Die Proteinkonzentration lag bei 0,12 mg/ml. Die Spektren wurden fünffach akkumuliert. Zur Auswertung wurde das Integral des Spektrums gegen die Temperatur aufgetragen.

#### ANS-Fluoreszenz-Messung

Die Temperatur-induzierte Denaturierung erfolgte wie für die Streulicht-Messung beschrieben. Im Messansatz wurde eine Endkonzentration von 50 µM ANS und eine Proteinkonzentration von 0,12 mg/ml eingestellt. Bei einer Anregungswellenlänge von 370 nm wurde von 470 nm bis 500 nm alle 1 nm ein Messpunkt aufgezeichnet. Die Integrationszeit war 0,2 s. Die Spaltbreite für Anregung und Emission lag jeweils bei 5 nm. Die Spektren wurden fünffach akkumuliert. Das Integral des Spektrums wurde gegen die Temperatur aufgetragen.

## CD-Messung

Die Messungen wurden an einem *J-810 Spectropolarimeter* (Jasco) in einer Quarzglasküvette mit einer Schichtdicke von 1 mm (Hellma, Müllheim) bei 220 nm und einer Spaltbreite von 1 nm durchgeführt. Die Temperaturänderung pro Zeiteinheit lag bei 1 K/min. Alle 0,2 K wurde ein Messpunkt aufgezeichnet. Die Proteinkonzentration betrug 0,24 mg/ml.

**PABPN1<sup>K</sup>-Puffer:** 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,9; 1,5 M KCl; 10 % Glycerol; 1 mM EDTA

### 2.2.5.9 Dynamische Differenzkalorimetrie

Die Temperatur-induzierte Denaturierung von WT-RNP wurde durch dynamische Differenzkalorimetrie (*differential scanning calorimetry*, DSC) untersucht. Dazu wurde ein Kompensationskalorimeter verwendet, welches die Unterschiede der erforderlichen Wärmemenge zur gleichmäßigen Aufheizung einer Probenzelle und einer Referenzzelle registriert. Das Messsignal (cal min<sup>-1</sup>) wurde um eine gerätespezifische Basislinie und das Puffersignal korrigiert und in die spezifische Wärmekapazität  $C_p$  (J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>) umgerechnet. Die spezifische Wärmekapazität wurde gegen die Temperatur aufgetragen und mittels Gleichung 25 ausgewertet. Die Temperatur am Übergangsmittelpunkt  $T_m$  wurde am Scheitelpunkt der Auftragung abgelesen. Die kalorimetrische Entfaltungsenthalpie am Übergangsmittelpunkt  $\Delta H_m(\text{cal})$  wurde nach Gleichung 23 (Kapitel 2.2.5.7) berechnet. Aus den Parametern  $\Delta H_m(\text{cal})$  und  $T_m$  wurde mittels Gleichung 26 die Gibbs'sche freie Entfaltungsenthalpie berechnet [159].

$$\text{Gleichung 25: } C_p = C_{p,N} + \frac{K_D}{1+K_D} \cdot \Delta C_p + \frac{\Delta H_D^2}{R \cdot T^2} \cdot \frac{K_D}{(1+K_D)^2}$$

$$\text{Gleichung 26: } \Delta G_D = \Delta H_m(\text{cal}) \cdot \left[ 1 - \frac{T}{T_m} \right] - \Delta C_p \cdot \left[ (T_m - T) + T \cdot \ln \frac{T}{T_m} \right]$$

$C_p$	spezifische Wärmekapazität (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
$C_{p,N}$	spezifische Wärmekapazität des nativen Proteins (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
$\Delta C_p$	Differenz der spezifischen Wärmekapazität zwischen nativem und denaturiertem Protein (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
$K_D$	Gleichgewichtskonstante der Entfaltung
$\Delta H_D$	Entfaltungsenthalpie (J mol <sup>-1</sup> )
$\Delta H_m(\text{cal})$	kalorimetrische Entfaltungsenthalpie am Übergangsmittelpunkt (J mol <sup>-1</sup> )
T	absolute Temperatur (K)
$T_m$	Temperatur am Übergangsmittelpunkt (K)
$\Delta G_D$	Gibbs'sche freie Entfaltungsenthalpie (J mol <sup>-1</sup> )

Die Messungen erfolgten an einem *VP-DSC microcalorimeter* (GE Healthcare). Die Temperaturänderung pro Zeiteinheit betrug 1 K/min. Die Proben wurden vor der Messung 5 min entgast. Die Proteinkonzentration betrug 0,24 mg/ml. Vor der Messung wurden die Proben dreifach gegen RNP<sup>K</sup>-Puffer (Kapitel 2.2.5.7) dialysiert. Die Referenzzelle wurde mit RNP<sup>K</sup>-Puffer gefüllt.

#### **2.2.5.10 Transmissionselektronenmikroskopie**

Die Anwesenheit von Fibrillen wurde durch Elektronenmikroskopie überprüft. Hierfür wurden Kupfer-Netzchen 1 min mit 15 µl einer 0,1 mg/ml Bacitracin-Lösung inkubiert. Es folgte eine Inkubation für 3 min mit 5 µl der Proteinlösung. Anschließend wurde fünfmal je 1 min mit 15 µl ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Danach wurden die Netzchen für 15 s mit 5 µl 1 % (w/v) Uranylacetat in ddH<sub>2</sub>O inkubiert. Zwischen jedem Schritt wurden die Lösungen mit Filterpapier von den Kupfer-Netzchen abgesaugt. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Dr. Dr. Gerd Hause (MLU Biozentrum) an einem *EM 600* (Zeiss, Jena) durchgeführt.

#### **2.2.5.11 Massenspektrometrie**

Zu untersuchende Proteine wurden entweder mit Hilfe von *C4-Zip Tips* entsprechend der Herstellerangaben entsalzt oder entsprechende Banden wurden nach der SDS-PAGE (Kapitel 2.2.4.1) aus dem Gel ausgeschnitten. Die Messungen nach dem ESI-QTOF-MS/MS-Verfahren wurden von Dr. Angelika Schierhorn (MLU Halle-Wittenberg, Serviceeinheit für Massenspektrometrie) an einem ESI-Q-TOF 2 *mass spectrometer* (Waters, Manchester, UK) oder einem SYNAPT<sup>®</sup> G2 HDMS *mass spectrometer* (Waters, Manchester, UK) durchgeführt.

### **2.2.6 Proteinbiochemische Methoden**

#### **2.2.6.1 Fibrillierung von PABPN1**

Vor der Fibrillierung wurden PABPN1-Lösungen ultrazentrifugiert (Kapitel 2.2.5.3), um eventuell vorhandene Proteinaggregate zu entfernen. Zur Fibrillierung wurde PABPN1 in PABPN1-Puffer (Kapitel 2.2.4.9) auf eine Endkonzentration von 60 µM (2,2 mg/ml) verdünnt. Die Ansätze wurden zur Fibrillierung bei 20 °C inkubiert.

#### **2.2.6.2 Detektion von Fibrillen**

Die Fibrillenbildung wurde durch den Fluoreszenzfarbstoff Thioflavin T (ThT) nachgewiesen. In Anwesenheit von Fibrillen zeigt der Farbstoff eine Intensitätserhöhung der Fluoreszenzemission bei 482 nm [18, 28, 141]. Zur Detektion von Fibrillen wurden Proben der

Fibrillierungsansätze entnommen und in 200 µl 50 µM ThT in PABPN1-Puffer (Kapitel 2.2.4.9) auf eine PABPN1-Endkonzentration von 2 µM verdünnt. Die Messung erfolgte bei 20 °C in einer Quarzglasküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm (Hellma, Müllheim) an einem *Fluoromax-3* Fluoreszenzspektrometer. Die Anregungswellenlänge war 450 nm. Es wurden Fluoreszenzemissionsspektren von 460-550 nm aufgezeichnet. Alle 1 nm wurde ein Messpunkt aufgenommen und das Signal für 0,2 s integriert. Die Spaltbreite für die Anregung betrug 5 nm, jene für die Emission 8 nm. Die Spektren wurden zweifach akkumuliert und pufferkorrigiert. Zur Auswertung wurde die Fluoreszenzemission bei 482 nm ausgewertet.

### 2.2.6.3 Solubilisierung von Fibrillen

Mit dieser Methode wurde die Resistenz von Fibrillen gegenüber denaturierenden Substanzen untersucht. Je 30 µl Probe eines Fibrillierungsansatzes wurden der Ultrazentrifugation (Kapitel 2.2.5.3) unterzogen, um fibrilläres Protein zu sedimentieren. Danach wurden die Pellets für 30 min mit 500 µl PABPN1-Puffer (Kapitel 2.2.4.9) gewaschen und erneut ultrazentrifugiert. Anschließend wurden die Fibrillen mit 150 µl PABPN1-Puffer versetzt, welcher verschiedene Konzentrationen Guanidiniumchlorid enthielt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 20 °C erfolgte eine Ultrazentrifugation, um solubilisiertes Protein im Überstand von verbliebenen Fibrillen im Pellet zu separieren. Die Proteinkonzentration des Überstands wurde durch Messung der Extinktion bei 280 nm bestimmt. Die unlösliche Fraktion wurde für 1 h mit 150 µl 6 M Guanidiniumchlorid in PABPN1-Puffer vollständig solubilisiert. Danach wurde wie zuvor die Proteinkonzentration durch eine Extinktionsmessung bei 280 nm bestimmt. Der Anteil an unlöslichem Protein wurde für jede Probe durch Gleichung 27 bestimmt.

$$\text{Gleichung 27: } A_U = \frac{c_U}{c_U + c_L} \cdot 100 \%$$

$c_U$  Proteinkonzentration unlösliche Fraktion

$c_L$  Proteinkonzentration lösliche Fraktion

$A_U$  Anteil unlösliches Protein in %

Zur genauen Bestimmung des Solubilisierungsmittelpunktes wurde der Anteil unlöslichen Proteins in Abhängigkeit von der Guanidiniumchloridkonzentration aufgetragen und nach Gleichung 28 ausgewertet. Der Wert  $x_0$  entspricht dem Solubilisierungsmittelpunkt.



Gleichung 28: 
$$y = y_0 + \frac{a}{1 + e^{-\left(\frac{x - x_0}{b}\right)}}$$

y Anteil unlösliches Protein (%)

x Konzentration an Guanidiniumchlorid (M)

$y_0$  *offset*

a, b Gleichungsvariablen

#### 2.2.6.4 Limitierte Proteolyse

Durch limitierte Proteolyse kann die konformationelle Umlagerung von löslichem zu fibrillärem PABPN1 nachgewiesen werden. Ein 60 µl-Reaktionsansatz in PABPN1-Puffer (Kapitel 2.2.4.9) enthielt 240 ng PABPN1-Strep und 25 ng Chymotrypsin. Die Reaktionen wurden für verschiedene Zeiten bei 20 °C inkubiert. Zum Abstoppen der Hydrolyse wurden die Ansätze mit 80 ng Aprotinin versetzt. Die Proben wurden anschließend mit einer Natriumdesoxycholat/TCA-Fällung konzentriert [165]. Dazu wurden die Proben mit 940 µl ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Als Nächstes wurde die Lösung mit 100 µl einer 1% (w/v) Natriumdesoxycholat-Lösung und 200 µl 50% (w/v) TCA gemischt. Es folgte eine Zentrifugation (16000 x g; 15 min; 20 °C). Die Pellets wurden mit 1 ml eiskaltem Aceton gewaschen und erneut zentrifugiert. Danach wurden die Pellets in 15 µl 1x Probenpuffer (Kapitel 2.2.4.1) resuspendiert. Auf Grund der geringen Proteinmenge wurden die Proteolysefragmente mittels Western-Blot (Kapitel 2.2.4.2) detektiert.

#### 2.2.7 Computergestützte Modellierung von Disulfidbrücken

Um eine Disulfidbrücke zwischen den Sekundärstrukturelementen Helix-α1 und Faltblatt-β2 in die RNP-Domäne von PABPN1 einzufügen, wurden mit dem Programm MODIP geeignete Aminosäuren für einen Austausch gegen Cystein-Reste identifiziert [166, 167]. Das Programm berechnet geeignete Positionen unter Berücksichtigung der Abstände zwischen den C<sub>α</sub>- und C<sub>β</sub>-Atomen auf Basis der Röntgenkristallstruktur der WT-RNP-Domäne [145]. Der Berechnungsalgorithmus des Programms bewertet stereochemische Parameter, wie die möglichen Torsionswinkel und den Abstand der Schwefelatome in einer Disulfidbrücke, um die optimale Position für einen Austausch zu finden [166]. Die computergestützte Modellierung wurde von Dr. Christoph Parthier (AG Prof. Dr. Milton T. Stubbs) durchgeführt.

#### 2.2.8 Proteinreinigung

Für Reinigungsschritte mit Chromatographiesäulen wurden die Geräte ÄKTA® *explorer* oder ÄKTA® *purifier* verwendet (GE Healthcare, München). Die Flussgeschwindigkeiten wurden entsprechend der Herstellerangaben gewählt. Die verwendeten Puffer wurden filtriert (Porengröße 0,45 µm) und mindestens 15 min entgast.

### 2.2.8.1 Isolierung von PABPN1-Strep aus HEK293-Zellen

Stabil transfizierte HEK293-Zellen wurden in sieben 150 cm<sup>2</sup>-Flaschen ausgesät und solange kultiviert, bis 100 % Konfluenz erreicht war. Zur Zellernte wurde das Kultivierungsmedium abgesaugt, die Zellen mit 25 ml PBS pro Flasche gewaschen und 1 min mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung pro Flasche behandelt. Als Nächstes wurden die Zellen in 10 ml Kultivierungsmedium resuspendiert und durch Zentrifugation (2500 x g; 10 min; 4 °C) sedimentiert. Die gesammelten Zellpellets wurden in 25 ml RIPA-Puffer aufgenommen und 5 min bei 4 °C lysiert. Zuvor wurde der RIPA-Puffer mit einer Tablette *Complete Mini* Proteaseinhibitor versetzt. Nach Abtrennung der Zelltrümmer durch Zentrifugation (100 x g; 2 min; 4 °C) wurde der Überstand mit 300 µl Strep-Tactin®-Material 1 h im *orbital shaker* inkubiert. Das Material wurde anschließend zweimal für je 5 min mit 10 ml RIPA-Puffer gewaschen. Es folgten vier Waschschrte mit 10 ml PABPN1-Waschpuffer für je 5 min. Danach wurde gebundenes PABPN1-Strep dreimal mit 400 µl Elutionspuffer eluiert. Zwischen den Wasch- und Elutionschritten wurde das Strep-Tactin®-Material durch Zentrifugation (100 x g; 2 min; 4 °C) sedimentiert und die Überstände abgenommen. Die Elutionsfraktionen, welche PABPN1-Strep enthielten, wurden vereinigt und gegen PABPN1-Puffer (Kapitel 2.2.4.9) dialysiert. Der Dialyseschlauch wurde anschließend in eine mit PEG 35000 gefüllte Schale gelegt und die Proteinlösung auf 4 µg/ml konzentriert.

Für einen analytischen Aufschluss wurden HEK293-Zellen einer 75 cm<sup>2</sup>-Schale verwendet. Beim Aufschluss und den Waschschrten wurden 1/10 der oben genannten Volumina eingesetzt. Die Volumina an Strep-Tactin®-Material und für die Elution blieben unverändert.

**RIPA-Puffer:** 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 % (v/v) NP-40; 0,5 % (w/v) Natriumdesoxycholat; 0,1 % (w/v) SDS; 1 mM DTT

**PABPN1-Waschpuffer:** 50 mM Tris/HCl pH 7,9; 150 mM KCl; 1 % Glycerol; 1 mM EDTA; 1 mM DTT

**Elutionspuffer:** PABPN1-Waschpuffer versetzt mit 10 mM D-Desthiobiotin

### 2.2.8.2 Reinigung der RNP-Domäne-Varianten

Die angegebenen Zusammensetzungen der Puffer gelten für WT-RNP. Beim Zellaufschluss und der Reinigung von  $\Delta$ Cys-RNP enthielten die verwendeten Puffer kein DTT. Der Zellaufschluss für die Variante A185C/V201C-RNP erfolgte in Gegenwart von DTT. A185C/V201-RNP wurde entweder als disulfidverbrücktes dS-RNP oder reduziertes SH-RNP renaturiert. Die Puffer zur Reinigung von dS-RNP enthielten kein DTT. Die Puffer zur Reinigung von reduziertem SH-RNP enthielten 10 mM DTT.

### Zellaufschluss

Die gefrorenen Zellpellets wurden pro 1 g Zellfeuchtmasse in 4 ml Zellausschlusspuffer resuspendiert. Als Nächstes wurde Lysozym zu einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml zugegeben. Nach einer Inkubation von 20 min bei 4 °C wurden MgCl<sub>2</sub> zu einer Endkonzentration von 8 mM sowie 5 U Benzonase pro 1 g Zellfeuchtmasse zugesetzt. Nach weiteren 30 min Inkubation erfolgte der mechanische Zellaufschluss mittels Hochdruckdispersion in vier Durchgängen an einem *Gaulin Micron Lab 40*<sup>®</sup> Homogenisator (APV, Lübeck) bei ca. 600 bar. Danach wurde erneut 5 U Benzonase pro 1 g Zellfeuchtmasse zugesetzt und der Ansatz 1 h inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden anschließend durch Zentrifugation (75600 x g; 4 °C; 20 min) abgetrennt. WT-RNP und ΔCys-RNP wurden aus dem löslichen Überstand isoliert. A185C/V201C-RNP war ausschließlich in der unlöslichen Fraktion zu finden und wurde daher einer Renaturierung unterzogen.

**Zellaufschluss-Puffer:** 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 5 mM EDTA; 1 mM DTT; 1 Tablette *Complete Mini* Proteaseinhibitor pro 250 ml

### Renaturierung

Vor der Renaturierung von A185C/V201C-RNP wurde zunächst die unlösliche Fraktion des Zellaufschlusses pro 1 g Pellet in 5 ml Solubilisierungspuffer aufgenommen. Nach einer Inkubationszeit von 2 h wurden unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (16000 x g; 4 °C; 10 min) abgetrennt. Danach wurde der pH-Wert des Überstands mit Essigsäure auf einen Wert von 4 bis 5 eingestellt. Das Reduktionsmittel DTT wurde durch dreimalige Dialyse gegen Dialysepuffer entfernt. Erneut wurden unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (16000 x g; 4 °C; 10 min) abgetrennt. Die Proteinkonzentration im Überstand wurde näherungsweise nach Gleichung 29 [168] bestimmt.

$$\text{Gleichung 29: } c = (1,552 \cdot E_{280}) - (0,757 \cdot E_{260})$$

c Proteinkonzentration (mg/ml)

E<sub>280</sub> Extinktion bei 280 nm

E<sub>260</sub> Extinktion bei 260 nm

Zur Renaturierung wurde der Überstand unter Rühren nach dem *rapid dilution*-Verfahren tropfenweise in Renaturierungspuffer verdünnt. Dabei wurde eine Endkonzentration im Renaturierungsansatz von 0,2 mg/ml Protein und 0,1 M Guanidiniumchlorid nicht überschritten. Um die disulfidverbrückte Variante dS-RNP zu erhalten, wurde Renaturierungspuffer A verwendet. Zur Herstellung der reduzierten Variante SH-RNP wurde Renaturierungspuffer B eingesetzt. Nach einer Inkubation von 48 h wurde der Ansatz von

ca. 1 l auf ca. 200 ml konzentriert. Als nächster Schritt folgte sowohl für dS-RNP als auch SH-RNP die Kationenaustausch-Chromatographie.

**Solubilisierungspuffer:** 100 mM Tris/HCl pH 8,5; 6 M GdmCl; 5 mM EDTA; 100 mM DTT

**Dialysepuffer:** 10 mM Natriumacetat pH 4,0; 5 M GdmCl

**Renaturierungspuffer A:** 100 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 M L-Arginin; 5 mM EDTA; 5 mM GSSG; 2 mM GSH

**Renaturierungspuffer B:** 100 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 M L-Arginin; 5 mM EDTA; 10 mM DTT

### Anionenaustausch-Chromatographie

Im ersten Reinigungsschritt von WT-RNP und  $\Delta$ Cys-RNP wurde mit dem Überstand nach dem Zellaufschluss eine Anionenaustausch-Chromatographie durchgeführt. Die *HiPrep Q XL 16/10*-Säule wurde mit Q-Puffer äquilibriert. Danach wurde der Überstand über die Säule gegeben. Die RNP-Domäne-Varianten befanden sich im Durchfluss, während ein Teil der endogenen *E. coli*-Proteine auf der Säule gebunden blieb.

**Q-Puffer:** 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 5 mM EDTA; 1 mM DTT

### Hydrophobe Interaktionschromatographie

Für den zweiten Reinigungsschritt von WT-RNP und  $\Delta$ Cys-RNP erfolgte zunächst eine Ammoniumsulfat-Fällung. Dazu wurde mit H-Einstellpuffer im Durchlauf der Anionenaustausch-Chromatographie eine Endkonzentration von 1,2 M Ammoniumsulfat eingestellt. Anschließend an eine Inkubation von 1 h bei 4 °C wurden ausgefallene Bestandteile durch Zentrifugation (38400 x g; 4°C; 10 min) abgetrennt. Nach dem Äquilibrieren der *HiPrep Phenyl HP 16/10*-Säule mit HA-Puffer wurde der Überstand über die Säule gegeben und mit 60 ml HA-Puffer gewaschen. Es wurde mit einem linearen Gradienten von 1,2 M bis 0 M Ammoniumsulfat durch HB-Puffer über 300 ml eluiert. Fraktionen, welche die RNP-Domäne enthielten, wurden vereinigt und gegen SA-Puffer dialysiert.

**H-Einstellpuffer:** 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 5 mM EDTA; 1 mM DTT; 3,5 M Ammoniumsulfat

**HA-Puffer:** 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 5 mM EDTA; 1 mM DTT; 1,2 M Ammoniumsulfat

**HB-Puffer:** 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 5 mM EDTA; 1 mM DTT

### Kationenaustausch-Chromatographie

Dieser Reinigungsschritt wurde für alle RNP-Domäne-Varianten durchgeführt. Nachdem die *HiPrep SP FF 16/10*-Säule mit SA-Puffer äquilibriert war, folgte das Beladen mit der Proteinlösung. Anschließend wurde die Säule mit 60 ml SA-Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte durch einen linearen Gradienten von 0 M bis 0,6 M NaCl durch Zusatz von SB-Puffer

über 300 ml. Fraktionen, welche die RNP-Domäne enthielten, wurden vereinigt und von ca. 100 ml auf ein Volumen von ca. 25 ml konzentriert.

**SA-Puffer:** 20 mM MOPS pH 6,5; 1 mM DTT

**SB-Puffer:** 20 mM MOPS pH 6,5; 1,5 M NaCl; 1 mM DTT

### Größenausschluss-Chromatographie

Den letzten Schritt der Reinigung aller RNP-Domäne-Varianten stellte die Größenausschluss-Chromatographie dar. Die *HiLoad Superdex 75 prep grade 16/60*-Säule wurde mit 200 ml SA-Puffer äquilibriert. Maximal 6 ml an Proteinlösung wurden mit der Säule in einem Lauf aufgetrennt. Fraktionen, welche ausschließlich die RNP-Domäne enthielten, wurden vereinigt und gegen RNP-Puffer (Kapitel 2.2.5.7) dialysiert. Bei der Variante SH-RNP enthielt der Puffer zusätzlich 5 mM TCEP. Die Lösungen wurden auf eine finale Proteinkonzentration von etwa 1 mg/ml konzentriert und bei -70 °C gelagert.

### **2.2.8.3 Reinigung der PABPN1-Varianten**

Die angegebenen Puffer-Zusammensetzungen beziehen sich auf WT-PABPN1. Die Puffer für den Zellaufschluss und die Reinigung von  $\Delta$ Cys-PABPN1 waren frei von DTT. Der Zellaufschluss bei der Variante A185C/V201C-PABPN1 erfolgte in Gegenwart von DTT. Bei der Affinitäts-Chromatographie wurde die Bildung der Disulfidbrücke durch Zugabe von oxidiertem Glutathion zum Elutionspuffer induziert. Die weitere Reinigung der resultierenden Variante dS-PABPN1 fand in Abwesenheit von DTT statt.

### Zellaufschluss

Der Zellaufschluss erfolgte bis auf wenige Modifikationen wie in Kapitel 2.2.8.2 beschrieben. Es wurde Zellaufschluss-Puffer II verwendet. Die Endkonzentration an  $MgCl_2$  betrug 3 mM. Zentrifugiert wurde bei 38400 x g und 4 °C für 20 min. Der lösliche Überstand wurde anschließend der Affinitäts-Chromatographie unterzogen.

**Zellaufschluss-Puffer II:** 50 mM  $KH_2PO_4$  pH 7,9; 150 mM KCl; 10 % Glycerol; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 1 Tablette *Complete Mini* Proteaseinhibitor pro 250 ml

### Affinitäts-Chromatographie

Für die Affinitätsreinigung wurde eine 250 ml-Säule mit *Blue Sepharose™ 6 Fast Flow*-Material verwendet. Dieses Material enthält den immobilisierten Farbstoff *Cibarcron™ Blue 3G*, an welchen PABPN1 bindet. Die Flussgeschwindigkeit betrug 3 ml/min. Nach dem Äquilibrieren der Säule mit BA-Puffer, wurde der lösliche Überstand des Zellaufschlusses

geladen. Es folgten Waschschritte mit 450 ml BA-Puffer, 900 ml BB-Puffer und nochmals 450 ml BA-Puffer. Die Elution erfolgte mit 450 ml BC-Puffer. A185C/V201C-PABPN1 wurde während des Zellaufschlusses durch 1 mM DTT vollständig reduziert. Zur Ausbildung der Disulfidbrücke wurde der BC-Puffer mit 5 mM oxidiertem Glutathion versetzt. Die resultierende Variante wurde als dS-PABPN1 bezeichnet. PABPN1 enthaltende Fraktionen wurden vereinigt, 1:2 mit QA-Puffer verdünnt und dreimal gegen QA-Puffer dialysiert.

**BA-Puffer:** 50 mM Tris/HCl pH 7,9; 150 mM KCl; 10 % Glycerol; 1 mM EDTA; 1 mM DTT

**BB-Puffer:** 50 mM Tris/HCl pH 7,9; 150 mM KCl; 10 % Glycerol; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 4 M NaCl

**BC-Puffer:** 50 mM Tris/HCl pH 7,9; 150 mM KCl; 10 % Glycerol; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 1 M L-Arginin

#### Anionenaustausch-Chromatographie

Die *HiPrep Q XL 16/10*-Säule wurde mit QA-Puffer äquilibriert und anschließend mit der Proteinlösung beladen. Nach einem Waschschritt mit 60 ml QA-Puffer wurden gebundene Proteine durch einen linearen Gradienten von 150 mM bis 500 mM KCl über 300 ml durch QB-Puffer eluiert. Fraktionen, welche PABPN1 enthielten, wurden vereinigt und gegen SPA-Puffer dialysiert.

**QA-Puffer:** 50 mM Tris/HCl pH 7,9; 150 mM KCl; 10 % Glycerol; 1 mM EDTA; 1 mM DTT

**QB-Puffer:** 50 mM Tris/HCl pH 7,9; 500 mM KCl; 10 % Glycerol; 1 mM EDTA; 1 mM DTT

#### Kationenaustausch-Chromatographie

Die *HiPrep SP FF 16/10*-Säule wurde mit SPA-Puffer äquilibriert, mit der Proteinlösung beladen und mit 60 ml SPA-Puffer gewaschen. Die Elution gebundener Proteine erfolgte durch einen linearen Gradienten von 150 mM bis 500 mM KCl durch SPB-Puffer über 300 ml. Fraktionen mit PABPN1 wurden gegen PABPN1-Puffer (2.2.4.9) dialysiert, auf eine Proteinkonzentration von ca. 70 µM konzentriert und bei -70 °C gelagert.

**SPA-Puffer:** 50 mM HEPES/KOH pH 7,9; 150 mM KCl; 10 % Glycerol; 1 mM EDTA; 1 mM DTT

**SPB-Puffer:** 50 mM HEPES/KOH pH 7,9; 500 mM KCl; 10 % Glycerol; 1 mM EDTA; 1 mM DTT

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Etablierung eines OPMD-Zellkulturmodells in HEK293-Zellen

Die Krankheit Okulopharyngeale Muskeldystrophie (OPMD) wird durch Expansionen der N-terminalen Oligoalaninsequenz von PABPN1 verursacht [105]. Ein typisches pathologisches Merkmal stellen intranukleäre Einschlüsse dar, welche PABPN1 enthalten [109, 112]. Ob PABPN1 in diesen Ablagerungen im Patientenmaterial in Form von Proteinaggregaten oder strukturierten Fibrillen vorliegt, ist nicht geklärt. Zur Vereinfachung werden in dieser Arbeit die Bezeichnungen „Fibrillen“ oder „fibrilläres PABPN1“ verwendet. Verschiedene *in vivo*- als auch *in vitro*-Studien deuten auf einen Zusammenhang zwischen einer Expansion der Oligoalaninsequenz und einer Fibrillenbildung von PABPN1 hin [34, 35, 114, 131]. Im ersten Teil dieser Arbeit sollte ein Zellkulturmodell etabliert werden, welches geeignet ist, eine potentielle *in vivo*-Fibrillenbildung von PABPN1 zu untersuchen und eine Isolierung und biophysikalische Charakterisierung der Fibrillen zu ermöglichen.

Drei verschiedene PABPN1-Varianten, welchen sich in der Länge der N-terminalen Oligoalaninsequenz unterschieden, sollten in stabil transfizierten HEK293-Zellen exprimiert werden: eine OPMD-assoziierte Expansionsvariante (+7Ala-PABPN1), eine nicht natürlich vorkommende Variante mit deletierter Alaninsequenz ( $\Delta$ Ala-PABPN1) und die Wildtyp-Variante mit zehn Alaninen (WT-PABPN1). Zur Unterscheidung von endogenem PABPN1 und um eine Abtrennung von fibrillärem Protein aus Zelllysaten zu ermöglichen, diente ein C-terminal fusionierter Twin-Strep-Tag® (+7Ala-,  $\Delta$ Ala- und WT-PABPN1-Strep) (Abbildung 6).

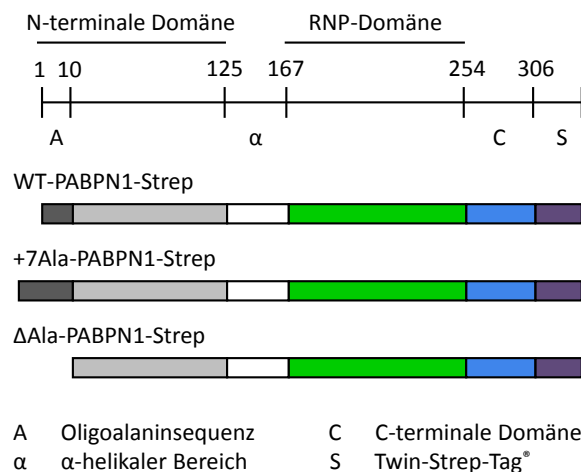


Abbildung 6: Schematische Darstellung der untersuchten PABPN1-Strep-Varianten. Der obere Balken gibt die Anfangs- und Endaminosäuren der Domänen an. Die Domänenstruktur ist bei den untersuchten Varianten farblich hervorgehoben. Dargestellt sind die Oligoalaninsequenz (dunkelgrau), die N-terminale Domäne (hellgrau), der  $\alpha$ -helikale Bereich (weiß), die RNP-Domäne (grün), die C-terminale Domäne (hellblau) und der Twin-Strep-Tag® (violett).

### 3.1.1 Charakterisierung von PABPN1-Strep

Die für die PABPN1-Varianten kodierende cDNA wurde aus vorhandenen pET11a-Plasmiden (Reno Winter, MLU Halle-Wittenberg) ausgeschnitten und zum Anfügen des Twin-Strep-Tag® in den pEXPR-IBA103-Vektor ligiert. Anschließend wurden die Konstrukte inklusive *tag* in den pLVX-Puro-Vektor überführt (Kapitel 2.2.3.6 bis 2.2.3.8; Daten nicht gezeigt). Zunächst sollte der Einfluss des C-terminalen Twin-Strep-Tag® auf die biophysikalischen Eigenschaften von PABPN1 untersucht werden. In der vorausgegangenen Diplomarbeit von Steffen Damm wurden die PABPN1-Strep-Varianten rekombinant in *E. coli* hergestellt und biophysikalisch charakterisiert [169]. Analysen mittels CD- und Fluoreszenzspektroskopie ließen hinsichtlich der Sekundär- und Tertiärstrukturen keine Unterschiede zu den authentischen Proteinen erkennen. In Fibrillierungsstudien waren die PABPN1-Strep-Varianten nach etwa sechs Tagen vollständig fibrilliert, Varianten ohne *tag* jedoch erst nach etwa 15 Tagen [169]. Bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen sowie der biochemischen Charakterisierung konnten keine Unterschiede zwischen PABPN1-Strep-Fibrillen und denen des authentischen Proteins festgestellt werden. Dies ließ auf die Umlagerung zu strukturell ähnlichen Fibrillen schließen.

Rückschlüsse auf die strukturelle Integrität von PABPN1 lassen sich auch aus RNA-Bindungsstudien ziehen. Sowohl die RNP-Domäne als auch die C-terminale Domäne sind für die hochaffine Bindung von PABPN1 an RNA notwendig [125]. Aus der Analyse der RNA-Bindungsaffinität ließ sich auch feststellen, ob der Twin-Strep-Tag® die Interaktion von PABPN1 mit RNA stört. Anhand der apparenten Dissoziationskonstanten wurde keine Beeinträchtigung der Bindungsfähigkeit der PABPN1-Strep Varianten an A14-RNA-Oligonukleotide im Vergleich zu WT-PABPN1 festgestellt [169]. Diese Analysen lagen zu Beginn der Arbeit bereits vor. Weiterführend wurde näher untersucht, ob der Twin-Strep-Tag® einen Einfluss auf die C-terminale Domäne von PABPN1 ausübt.

Die C-terminale Domäne vermittelt die Selbstassoziation des Proteins und ist damit vermutlich für die Kooperativität der Bindung an RNA verantwortlich [125]. Am deutlichsten würde sich ein Einfluss des Twin-Strep-Tag® auf die Struktur der C-terminalen Domäne vermutlich durch Bindungsstudien an Polyadenylat-RNA mit mehreren Bindungsstellen für PABPN1 feststellen lassen. Dazu wurden Filterbindungsexperimente mit A98-Polynukleotiden durchgeführt, welche mindestens sechs Bindungsstellen aufwiesen [121, 128]. Die Bildung der Protein-RNA-Komplexe wurde bei verschiedenen PABPN1-Konzentrationen untersucht (Abbildung 7). Die Auswertung wurde sowohl anhand einer hyperbolen Anpassung der direkten Auftragung, als auch einer linearen Regression der doppelt-reziproken Auftragung nach LINEWEAVER-BURK vorgenommen (Kapitel 2.2.4.6). Die ermittelten  $K_{50}$ -Werte stellen keine Dissoziationskonstanten dar, weil ein A98-Polynukleotid



mehrere PABPN1-Bindungsstellen besitzt. Die  $K_{50}$ -Werte entsprechen der PABPN1-Konzentration, bei welcher 50 % der maximal möglichen Protein-RNA-Komplexe gebildet wurden. Die anhand der doppelt-reziproken Anpassung bestimmten Werte zeigten hohe experimentelle Fehler, entsprachen jedoch in der Tendenz den Ergebnissen der direkten Auftragung. Mit Beachtung der Abweichung waren die Messwerte der PABPN1-Strep-Varianten vergleichbar mit WT-PABPN1 (Tabelle 15). Unter Berücksichtigung der eingeschränkten Vergleichbarkeit stimmten diese Ergebnisse mit einem für A70-RNA publizierten Wert von für 0,1 nM überein [125].

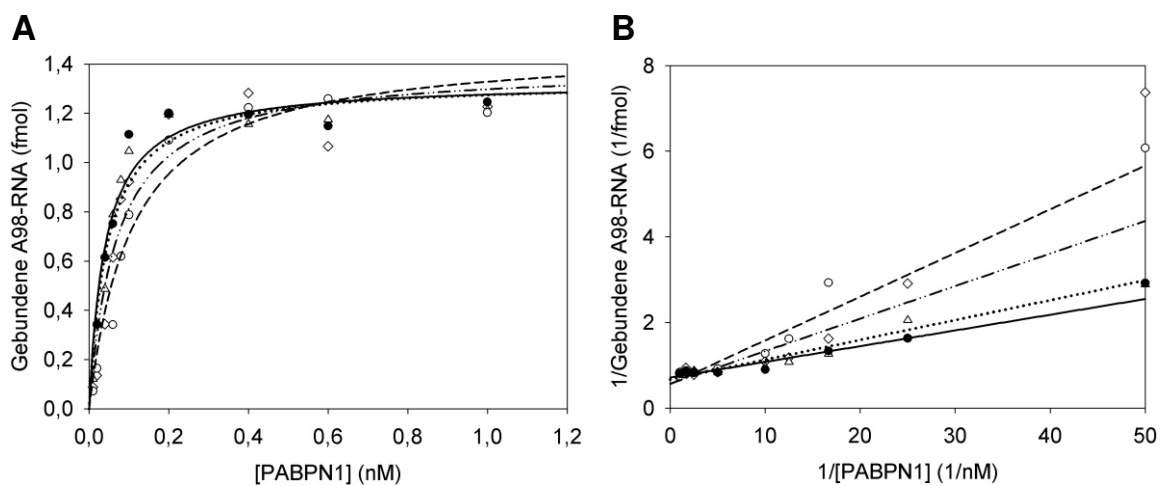


Abbildung 7: Filterbindungsexperimente der PABPN1-Strep-Varianten. Es wurde radioaktiv markierte A98-Polyadenylat-RNA verwendet. (A) Direkte Auftragung. (B) Doppelt-reziproke Auftragung nach LINEWEAVER-BURK. +7Ala-PABPN1-Strep ( $\diamond$ ),  $\Delta$ Ala-PABPN1-Strep ( $\triangle$ ), WT-PABPN1-Strep ( $\circ$ ) und WT-PABPN1 ( $\bullet$ ). Die hyperbolen Anpassungen der direkten Auftragungen und die linearen Regressionen zur Bestimmung der  $K_{50}$ -Werte sind für +7Ala-PABPN1-Strep (Strich, Punkt, Punkt),  $\Delta$ Ala-PABPN1-Strep (Punkte), WT-PABPN1-Strep (gestrichelt) und WT-PABPN1 (durchgezogene Linie) gezeigt.

Protein	$K_{50}$	
	Direkte Auftragung	Doppelt-reziproke Auftragung
<b>+7Ala-PABPN1-Strep</b>	$70,9 \pm 19,8 \text{ pM}$	$133,5 \pm 137,7 \text{ pM}$
<b><math>\Delta</math>Ala-PABPN1-Strep</b>	$45,9 \pm 9,4 \text{ pM}$	$69,8 \pm 99,6 \text{ pM}$
<b>WT-PABPN1-Strep</b>	$109,3 \pm 26,2 \text{ pM}$	$182,5 \pm 162,8 \text{ pM}$
<b>WT-PABPN1</b>	$40,7 \pm 9,2 \text{ pM}$	$51,6 \pm 96,3 \text{ pM}$

Tabelle 15:  $K_{50}$ -Werte der Filterbindungsexperimente der PABPN1-Strep Varianten und von WT-PABPN1 bei der Bindung von A98-Polyadenylat-RNA. Die Werte wurden entsprechend einer hyperbolen Anpassung der direkten Auftragung (Abbildung 7 A) als auch einer linearen Regression der doppelt-reziproken Auftragung (Abbildung 7 B) nach LINEWEAVER-BURK bestimmt.

Eine weitere geeignete Methode, um das Bindungsverhalten von PABPN1 an RNA zu untersuchen, stellt ein *gel shift*-Experiment dar [129]. A98-RNA wird dabei mit verschiedenen Mengen PABPN1 inkubiert und die Bildung von Protein-RNA-Komplexen durch Elektrophorese in Polyacrylamid-Agarose-Komposit-Gelen untersucht (Kapitel 2.2.4.7). Jedes gebundene Proteinmolekül verringert die elektrophoretische Mobilität der RNA im Gel. Somit kann unterschieden werden, ob zunächst die Mehrheit der RNA-Moleküle von einem oder wenigen Molekülen PABPN1 gebunden wird oder einzelne RNA-Moleküle bevorzugt vollständig mit PABPN1 besetzt werden. In einem vergleichenden Experiment zwischen WT-PABPN1 und WT-PABPN1-Strep waren im Gel bei steigender Proteinkonzentration bis zu sechs Banden sichtbar, welche den langsamer migrierenden Protein-RNA-Komplexen entsprachen. Anhand des konzentrationsabhängigen Bandenmusters waren keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Bindungsverhaltens zwischen WT-PABPN1 und WT-PABPN1-Strep feststellbar (Abbildung 8 A). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass der C-terminale Bereich trotz des fusionierten Twin-Strep-Tag<sup>®</sup> strukturell intakt ist.

Eine wichtige Funktion von PABPN1 ist die Stimulation der Poly(A)-Polymerase. Dafür ist neben der N-terminalen Domäne ebenso die C-terminale Domäne von PABPN1 entscheidend [119, 123]. Ein Einfluss des C-terminalen Twin-Strep-Tag<sup>®</sup> auf die PABPN1-vermittelte Steigerung der Prozessivität der Poly(A)-Polymerase sollte daher ausgeschlossen werden. Für ein Polyadenylierungs-Experiment wurden Poly(A)-Polymerase (PAP) und A98-RNA mit verschiedenen Mengen PABPN1 gemischt. Die Verlängerung der RNA konnte durch Elektrophorese in einem denaturierenden Polyacrylamid-Harnstoff-Gel analysiert werden (Kapitel 2.2.4.8; Abbildung 8 B). PAP allein bewirkt eine Verlängerung der A98-RNA um nur wenige Nukleotide. Nach der Zugabe steigender Konzentrationen an PABPN1 war eine Verlängerung um 250 bis 300 Nukleotide ersichtlich. Diese Beobachtung stimmte mit Literaturangaben überein [118]. WT-PABPN1-Strep erreichte eine vergleichbare Stimulation der Poly(A)-Polymerase wie WT-PABPN1. Folglich kann angenommen werden, dass der C-terminale Bereich von PABPN1-Strep strukturell intakt vorliegt.

Zusammenfassend wurde keine Beeinträchtigung der strukturellen Integrität oder der biologischen Funktion von PABPN1 durch den C-terminalen Twin-Strep-Tag<sup>®</sup> nachgewiesen. Diese Untersuchungen beugen einer Detektion von Aggregationsartefakten in den folgenden Experimenten vor, welche durch die Akkumulation von funktionslosem, falsch gefaltetem Protein verursacht werden könnten. Folglich war PABPN1-Strep geeignet für die Untersuchung einer *in vivo*-Fibrillenbildung.

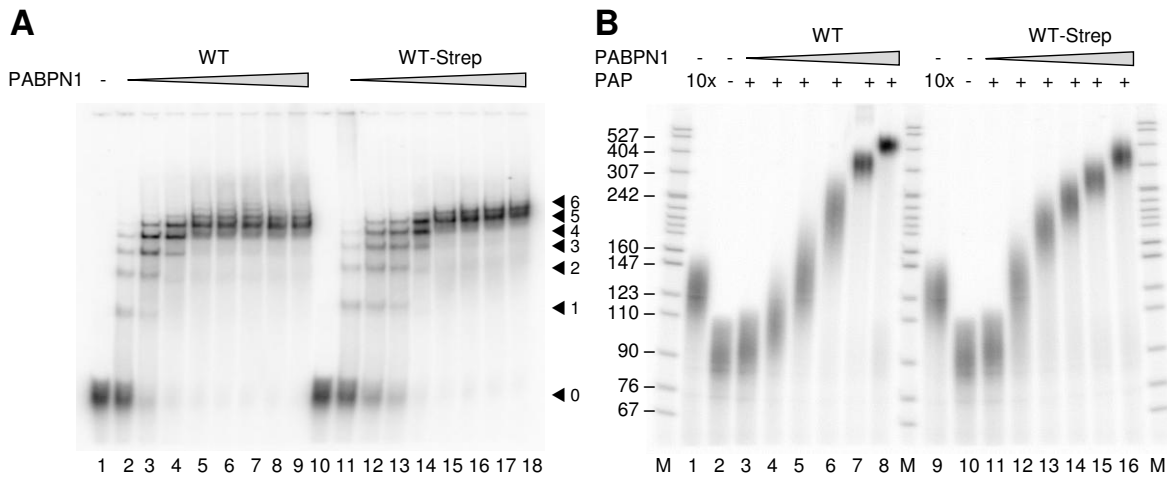


Abbildung 8: Untersuchung der Funktionalität von PABPN1-Strep. (A) *Gel shift*-Experiment. 0,77 nM A98-RNA wurden mit verschiedenen Konzentrationen WT-PABPN1 (WT) oder WT-PABPN1-Strep (WT-Strep) inkubiert. Spuren 1 und 10, Nullwert ohne PABPN1. Spuren 2-9 und 11-18, Reaktionen mit 0,5 nM; 2,7 nM; 4,1 nM; 5,4 nM; 6,8 nM, 8,1 nM; 10,8 nM; 27,0 nM PABPN1. Die radioaktiv markierte A98-RNA wurde mittels Phosphor-Imager detektiert. Die Anzahl gebundener PABPN1-Moleküle ist auf der rechten Seite des Gels mit Pfeilspitzen hervorgehoben. (B) Stimulierung der Polyadenylierung. 4 nM A98-RNA wurden mit 2 nM Poly(A)-Polymerase (PAP) und verschiedenen Konzentrationen WT-PABPN1 (WT) oder WT-PABPN1-Strep (WT-Strep) versetzt. Spuren 1 und 9, Positivkontrolle mit zehnfacher Menge PAP. Spuren 2 und 10, Negativkontrolle ohne PAP und ohne PABPN1. Spuren 3-8 und 11-16, Reaktionen mit 6 nM; 12 nM; 18 nM; 24 nM; 36 nM; 72 nM PABPN1. Als Referenz dient ein DNA-Marker (M; Größenangabe in Nukleotiden). Die Detektion der radioaktiv markierten A98-RNA erfolgte über einen Phosphor-Imager.

### 3.1.2 Isolierung *in vitro* hergestellter PABPN1-Strep-Fibrillen aus Zelllysat

#### Vorversuche

Im folgenden Schritt sollte geprüft werden, ob eine Isolierung von fibrillärem PABPN1-Strep aus Zelllysaten prinzipiell möglich ist. Die Isolierung von fibrillärem PABPN1-Strep wurde getestet, indem zunächst ein Lysat untransfizierter HEK293-Zellen hergestellt wurde. Anschließend wurde das Lysat mit *in vitro* produzierten PABPN1-Strep-Fibrillen gemischt. Die Isolierung der Fibrillen erfolgte mittels Bindung an Strep-Tactin<sup>®</sup>-Material und Elution durch D-Desthiobiotin (Kapitel 2.2.8.1; Abbildung 9).

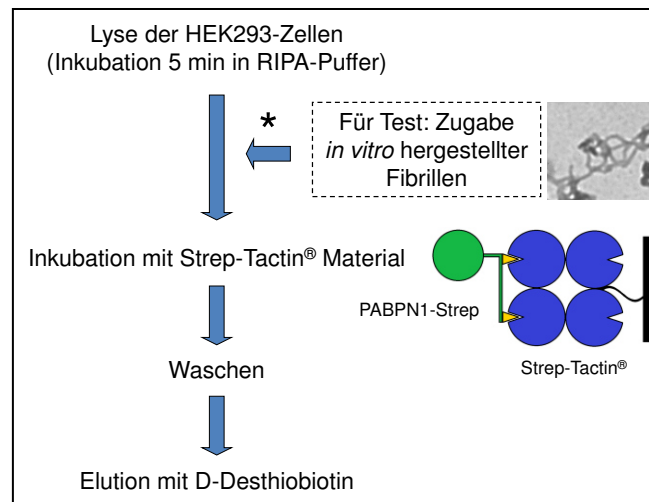


Abbildung 9: Fließschema der Isolation von PABPN1-Strep aus HEK293-Zellen. Zum Test der Methode (★) wurden *in vitro* hergestellte Fibrillen zu einem Lysat untransfizierter HEK293-Zellen gegeben. Anschließend wurden die Fibrillen aus dem Lysat isoliert.

Zuvor musste sichergestellt werden, dass es unter den Bedingungen während des Zellaufschlusses zu keiner Solubilisierung der Fibrillen kommt. Dafür wurden *in vitro* hergestellte  $\Delta$ Ala-PABPN1-Strep-Fibrillen verwendet (Kapitel 2.2.6.1). Zum Test der Stabilität des fibrillären Proteins wurden PABPN1-Strep-Fibrillen 2 h in RIPA-Puffer und ein paralleler Ansatz in PABPN1-Puffer inkubiert. Anschließend wurde fibrilläres Protein durch Ultrazentrifugation abgetrennt, mittels 6 M Guanidiniumchlorid solubilisiert und die Konzentration bestimmt (Kapitel 2.2.5.1). Dabei wurde nach Inkubation in RIPA-Puffer 94 % des Proteinanteils in der unlöslichen Fraktion gefunden und nach Inkubation in PABPN1-Puffer 92 %. Folglich führte der RIPA-Puffer zu keiner Solubilisierung der Fibrillen und war damit für den Zellaufschluss geeignet.

Zur Abtrennung von Zelltrümmern nach dem Zellaufschluss und zur Separation des Strep-Tactin®-Materials vom Zelllysate war ein zweiminütiger Zentrifugationschritt bei 100 x g erforderlich. Durch SDS-PAGE konnte sichergestellt werden, dass bei diesem Schritt PABPN1-Fibrillen nicht sedimentiert werden (Anhang 8.1).

#### Isolierung *in vitro* hergestellter Fibrillen aus Zelllysate

Die Isolierung von fibrillärem PABPN1-Strep wurde wie in Abbildung 9 beschrieben durchgeführt. In den Elutionsfraktionen konnte durch SDS-PAGE  $\Delta$ Ala-PABPN1-Strep gefunden werden. Nach der Elution wurde das Strep-Tactin®-Material mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt, um zu prüfen ob  $\Delta$ Ala-PABPN1-Strep vollständig eluiert wurde. Dabei waren nur noch geringe Mengen gebundenes PABPN1-Strep detektierbar. Der überwiegende Anteil an PABPN1-Strep konnte eluiert werden (Abbildung 10 A). Anhand

elektronenmikroskopischer Aufnahmen (Kapitel 2.2.5.10) wurde das Vorliegen von fibrillärem Protein in den Elutionsfraktionen bestätigt (Abbildung 10 B).

Die gezeigten Vorversuche belegten, dass prinzipiell eine Isolierung von fibrillärem PABPN1-Strep aus Zelllysaten möglich ist. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass hierbei die Annahme getroffen wurde, *in vivo* gebildete Fibrillen würden vergleichbare biophysikalische Eigenschaften besitzen wie *in vitro* mit rekombinantem PABPN1 hergestellte Fibrillen. In wie weit dies zutrifft, konnte noch nicht belegt werden, da eine umfassende Charakterisierung der Einschlüsse von OPMD-Patienten-Material bisher nicht publiziert ist.

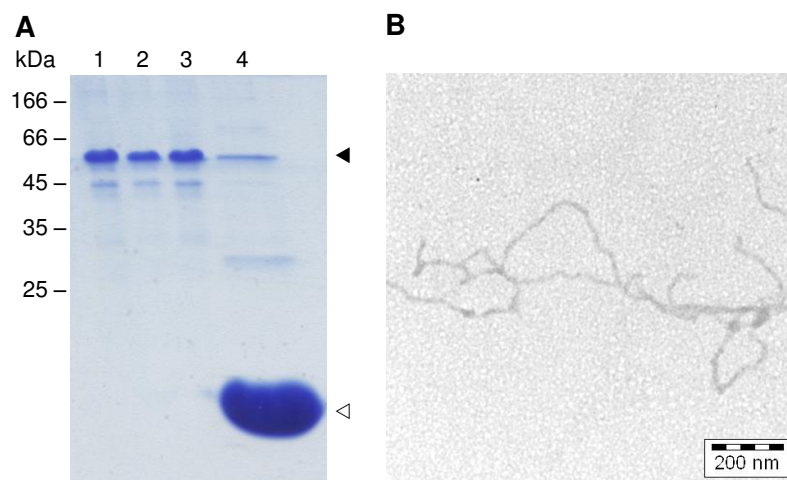


Abbildung 10: Test der Isolierung von *in vitro* produzierten  $\Delta$ Ala-PABPN1-Strep-Fibrillen aus einem HEK293-Zelllysate. (A) SDS-Polyacrylamid-Gel zur Kontrolle der Isolierung. Aufgetragen sind die Elutionsfraktionen (1, 2, 3) und das Strep-Tactin<sup>®</sup>-Material nach der Elution, versetzt mit 5x SDS-Probenpuffer (4).  $\Delta$ Ala-PABPN1-Strep ist mit einer schwarzen und das Protein Strep-Tactin<sup>®</sup> mit einer weißen Pfeilspitze markiert. (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme der Elutionsfraktion 1.

### 3.1.3 Selektion stabiler Zelllinien

Um eine mögliche *in vivo*-Fibrillenbildung zu untersuchen, wurden stabil transfizierte HEK293-Zelllinien zur Expression von +7Ala-,  $\Delta$ Ala- und WT-PABPN1-Strep selektiert (Kapitel 2.2.2.3). Durch eine langfristige, stabile Expression sind reproduzierbare Bedingungen für die folgenden Experimente gegeben und eine Expression im größeren Maßstab wird erleichtert. Die selektierten Klone wurden nach mehreren Zeitpunkten mittels Western-Blot auf die stabile Expression von PABPN1-Strep geprüft. Für  $\Delta$ Ala- und WT-PABPN1-Strep wurden über einen Zeitraum von mindestens 60 Tagen nach Isolation des stabilen Klons keine Veränderungen der detektierten Menge an PABPN1-Strep festgestellt. Endogenes PABPN1 diente hierbei als Ladekontrolle (Abbildung 11). Für +7Ala-PABPN1-Strep wurde ab 34 Tagen nach der Selektion eine deutlich reduzierte Menge des rekombinanten Proteins und des

endogenen PABPN1 gefunden. Als Ladekontrolle diente Aktin (Abbildung 11). Infolge dessen erfolgte die Kultivierung des Klons für anschließende Experimente über einen Zeitraum von maximal 34 Tagen.

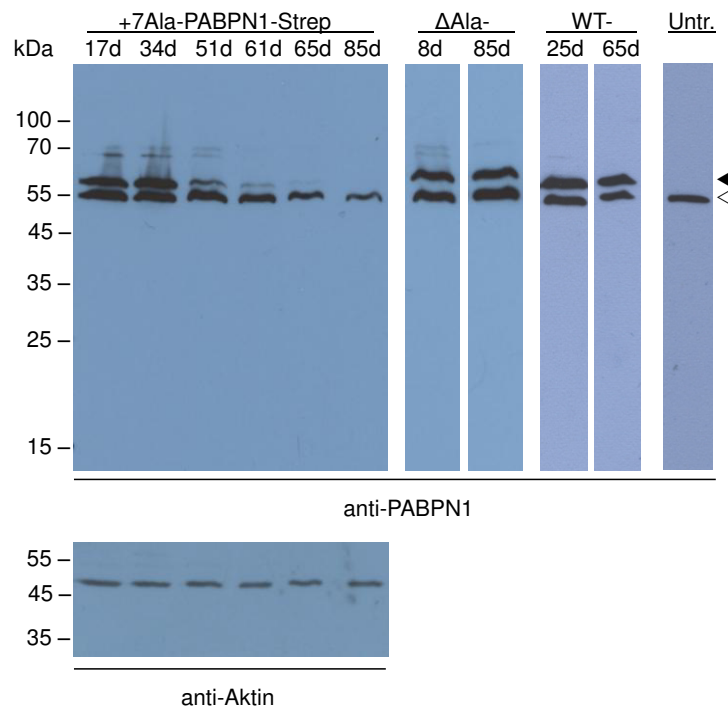


Abbildung 11: Western-Blot stabil transfizierter HEK293-Zellen. Die transfizierten PABPN1-Strep-Varianten (+7Ala-,  $\Delta$ Ala- und WT-) sind angegeben. Untransfizierte Zellen (Untr.) dienen als Kontrolle. Die Produktion des rekombinanten Proteins wurde im Verlauf der Kultivierung zu verschiedenen Zeitpunkten überprüft. Die Kultivierungszeit in Tagen ist über den Blots angegeben. Die Detektion von PABPN1 erfolgte mittels Anti-PABPN1-Antikörper (obere Reihe). PABPN1 ist als Doppelbande sichtbar. Die untere Bande entspricht endogenem PABPN1 der HEK293-Zellen ( $\triangleleft$ ), welches auch als Ladekontrolle für  $\Delta$ Ala- und WT-PABPN1-Strep transfizierte Zellen diente. Die obere Bande entspricht PABPN1-Strep ( $\blacktriangleleft$ ). Als Ladekontrolle für +7Ala-PABPN1-Strep transfizierte Zellen wurde endogenes Aktin mit einem Anti-Aktin-Antikörper (untere Reihe) detektiert.

Das Kernlokalisierungssignal von PABPN1 befindet sich im C-terminalen Bereich des Proteins [120, 170]. Um einen Einfluss des C-terminalen Twin-Strep-Tag<sup>®</sup> auf die Lokalisation auszuschließen, wurde die Kernlokalisierung von PABPN1-Strep mittels Immunfluoreszenzmikroskopie überprüft. Alle Varianten wurden dabei im Zellkern detektiert (Abbildung 12). Eine unspezifische Markierung konnte anhand untransfizierter Zellen ausgeschlossen werden. Hinsichtlich der Verteilung der PABPN1-Varianten gab es keine offensichtlichen Unterschiede zwischen  $\Delta$ Ala- und WT-PABPN1-Strep. Das Protein war weitgehend gleichmäßig, mit einigen Punkten lokaler Anreicherung, im Zellkern verteilt. Diese wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen als *nuclear speckles* beschrieben [120, 171, 172]. Eine vergleichbare Verteilung wurde auch für +7Ala-PABPN1-Strep bei etwa 95 % der untersuchten Zellen gefunden. Bei etwa 5 % der Zellen war jedoch eine unregelmäßigere

Verteilung mit Bereichen deutlich stärkerer Akkumulation des rekombinanten Proteins zu beobachten. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits für Alaninexpansions-Varianten von PABPN1 publiziert. Dabei wurde die Hypothese vertreten, es handle sich um Ablagerungen vergleichbar mit den Einschlüssen in OPMD-Patienten-Material [114, 130, 133, 142].

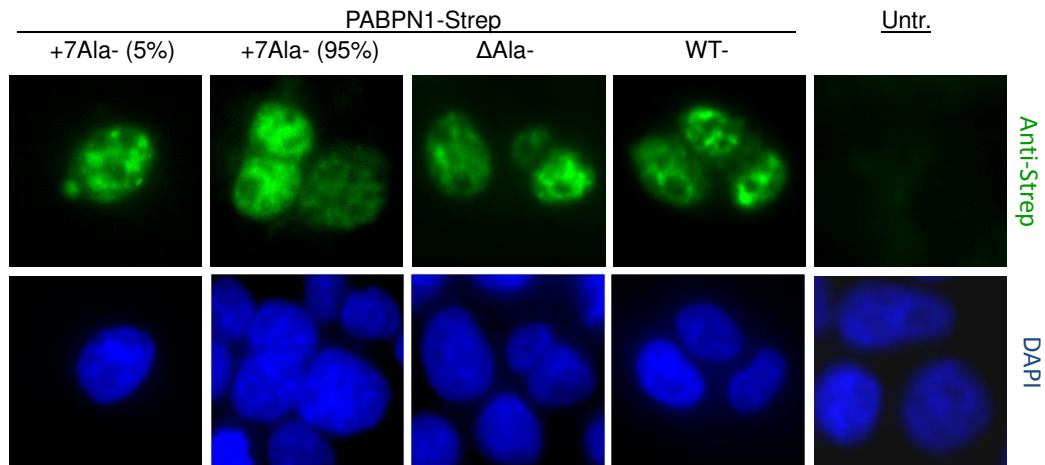


Abbildung 12: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von stabil transfizierten HEK293-Zellen. Die transfizierten PABPN1-Strep-Varianten (+7Ala-,  $\Delta$ Ala- und WT-) sind angegeben. Als Kontrolle dienen untransfizierte Zellen (Untr.). Die Detektion von PABPN1-Strep erfolgte mittels eines Anti-Strep-Tag-Antikörpers (obere Reihe). Die Färbung der Zellkerne wurde mit DAPI durchgeführt (untere Reihe). Bei ca. 5 % der mit +7Ala-PABPN1-Strep transfizierten Zellen wurden Bereiche deutlich erhöhter Anreicherung von PABPN1-Strep gefunden. Bei ca. 95 % der Zellen ist +7Ala-PABPN1-Strep gleichmäßiger verteilt, ähnlich der Verteilung bei Transfektion mit  $\Delta$ Ala- und WT-PABPN1-Strep.

Weiterhin war festzustellen, dass nicht alle analysierten Zellen das rekombinante PABPN1-Strep enthielten, obwohl die Kultivierung stets in Gegenwart des Selektionsmarkers Puromycin stattfand. Vermutlich kann ein Teil der Zellpopulation das entsprechende Resistenzgen unabhängig von PABPN1-Strep exprimieren. Auf eine Subkultivierung zur Anreicherung PABPN1-Strep produzierender Zellen wurde verzichtet, da jede untersuchte Population mindestens 40 % exprimierende Einzelzellen enthielt. Der Anteil positiver Zellen ist vergleichbar mit den Ergebnissen bei transienter Transfektion in der Literatur [173] und sollte für weitere Analysen ausreichende Mengen PABPN1-Strep zur Verfügung stellen.

### 3.1.4 Isolierung von PABPN1-Strep aus stabilen Zelllinien

#### Isolierung im analytischen Maßstab

Damit eine mögliche *in vivo*-Fibrillenbildung von PABPN1-Strep untersucht werden konnte, sollte das Protein mittels Bindung an Strep-Tactin® aus Zellkultur isoliert und anschließend biophysikalisch charakterisiert werden. Die Bedingungen hierfür wurden im analytischen Maßstab für alle drei PABPN1-Strep Varianten getestet (Kapitel 2.2.8.1; Abbildung 9). Der

Erfolg der Isolierung wurde über einen Western-Blot kontrolliert (Abbildung 13 A). Nach dem Zellaufschluss mit RIPA-Puffer wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation abgetrennt. PABPN1 und PABPN1-Strep waren sowohl in der löslichen, als auch unlöslichen Fraktion zu finden. Vermutlich bewirkte der RIPA-Puffer keine vollständige Freisetzung von PABPN1 (Kapitel 3.1.6). Alternativ erfolgte testweise eine Ultraschall-Behandlung oder ein mechanischer Zellaufschluss (Kapitel 2.2.4.9). Die Ergebnisse waren jedoch mit der Lyse durch RIPA-Puffer vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Der Überstand wurde mit dem Strep-Tactin®-Material inkubiert. Dabei wurde PABPN1-Strep aus der löslichen Fraktion vollständig gebunden. Das Material wurde anschließend gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine und im RIPA-Puffer enthaltene Detergenzien zu entfernen. Das gebundene PABPN1-Strep wurde durch D-Desthiobiotin nahezu komplett eluiert, wie durch anschließende Inkubation des Strep-Tactin® Materials mit 5x SDS-Probenpuffer belegt wurde (Abbildung 13 A).

#### Isolierung im präparativen Maßstab

Das oben beschriebene etablierte Verfahren wurde angewendet, um aus stabil transfizierten Zellen +7Ala-PABPN1-Strep in ausreichenden Mengen für eine biochemische Charakterisierung zu gewinnen (Kapitel 2.2.8.1). Bei dieser Proteinvariante war entsprechend der OPMD-Pathologie und publizierter Zellkultur- und Tiermodelle die höchste Chance zur Detektion fibrillärer Strukturen zu erwarten. Aus 0,8 g Zellfeuchtmasse wurden 1,6 µg PABPN1-Strep gewonnen. In den Elutionsfraktionen waren durch Analyse mit SDS-PAGE außer PABPN1-Strep keine weiteren Proteine zu detektieren. Zusätzliche Reinigungsschritte waren daher nicht erforderlich (Abbildung 13 B).



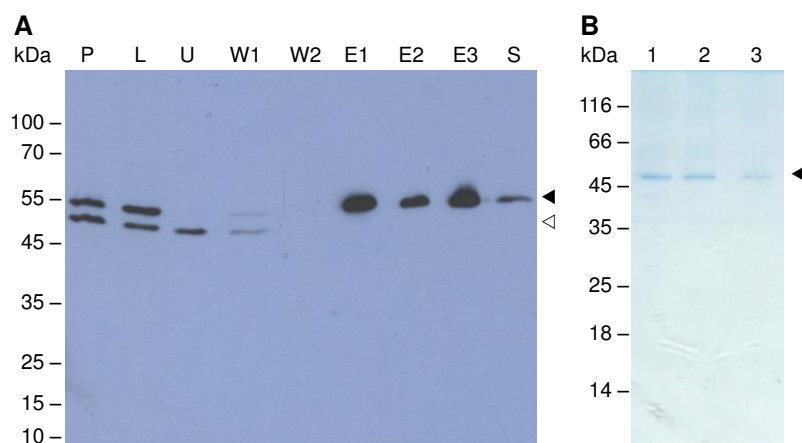


Abbildung 13: Isolierung von +7Ala-PABPN1-Strep aus stabil transfizierten HEK293-Zellen. (A) Western-Blot des analytischen Zellaufschlusses und der Isolierung. Die Detektion erfolgte mittels Anti-PABPN1-Antikörper. PABPN1 ist als Doppelbande sichtbar. Die untere Bande entspricht endogenem PABPN1 der HEK293-Zellen ( $\blacktriangleleft$ ). Die obere Bande entspricht PABPN1-Strep ( $\blacktriangleleft$ ). Aufgetragen sind die unlösliche (P) und die lösliche (L) Fraktion nach dem Zellaufschluss, die ungebundene, lösliche Fraktion nach Inkubation mit dem Strep-Tactin<sup>®</sup>-Material (U), die Waschfraktionen (W1, W2), die Elutionsfraktionen (E1-E3) und nach der Elution in 5x SDS-Probenpuffer aufgenommenes Strep-Tactin<sup>®</sup> Material (S). Vergleichbare Ergebnisse wurden mit  $\Delta$ Ala- und WT-PABPN1-Strep erhalten. (B) SDS-Polyacrylamid-Gel der präparativen Isolierung von +7Ala-PABPN1-Strep ( $\blacktriangleleft$ ). Die drei Elutionsfraktionen (1-3) sind gezeigt.

### 3.1.5 Charakterisierung des isolierten +7Ala-PABPN1-Strep

#### Test der limitierten Proteolyse mit *in vitro* hergestellten Fibrillen

Ziel des experimentellen Vorgehens war zu testen, ob das isolierte +7Ala-PABPN1-Strep Fibrillen enthält. Eine geeignete Methode zur Unterscheidung zwischen löslichem und fibrillärem PABPN1 stellt die limitierte Proteolyse dar [141]. Zunächst mussten mit *in vitro* hergestellten Fibrillen experimentelle Bedingungen gefunden werden, um lösliches von fibrillärem Protein zu unterscheiden. Entscheidend bei diesem Experiment ist, dass proteolytische Fragmente auftreten, welche spezifisch für fibrilläres Protein sind. Unter verschiedenen getesteten Proteasen konnten die besten Ergebnisse mit Chymotrypsin erzielt werden. Die Proteolysefragmente wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Für die Detektion mittels Anti-PABPN1-Antikörper wurde ein Western-Blot durchgeführt. Zwei spezifische Banden waren nur bei proteolytischer Spaltung der Fibrillen zu beobachten (Abbildung 14 A, Pfeilspitzen). Außerdem trat bei der Auftrennung der Fibrillen ein Schmier bei höheren Molekulargewichten auf, welcher bis zum Sammelgel reichte.

### Analyse des aus Zellkultur isolierten +7Ala-PABPN1-Strep

Es wurden vergleichend aus Zellkultur isoliertes +7Ala-PABPN1-Strep und in *E. coli* hergestelltes, lösliches +7Ala-PABPN1-Strep der limitierten Proteolyse unterzogen. Beide Proben zeigten ein nahezu identisches Muster an detektierten Proteolysefragmenten (Abbildung 14 B). Dies deutet darauf hin, dass es sich bei dem aus Zellkultur isolierten +7Ala-PABPN1-Strep überwiegend um lösliches Protein handelte. Zur Überprüfung dieses Ergebnisses wurden weitere Methoden getestet, welche Hinweise auf Aggregate oder Fibrillen in der vorliegenden +7Ala-PABPN1-Strep-Präparation geben könnten. Weder durch Ultrazentrifugation, elektronenmikroskopische Aufnahmen oder Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff ANS konnten eindeutige Hinweise auf aggregiertes oder fibrilläres Protein gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Folglich liegt PABPN1-Strep überwiegend in löslicher Form in den stabil transfizierten HEK293-Zellen vor, oder die Fibrillen konnten beim Zellaufschluss nicht freigesetzt werden und befinden sich zusammen mit den Zelltrümmern in der unlöslichen Fraktion (siehe Kapitel 3.1.4).

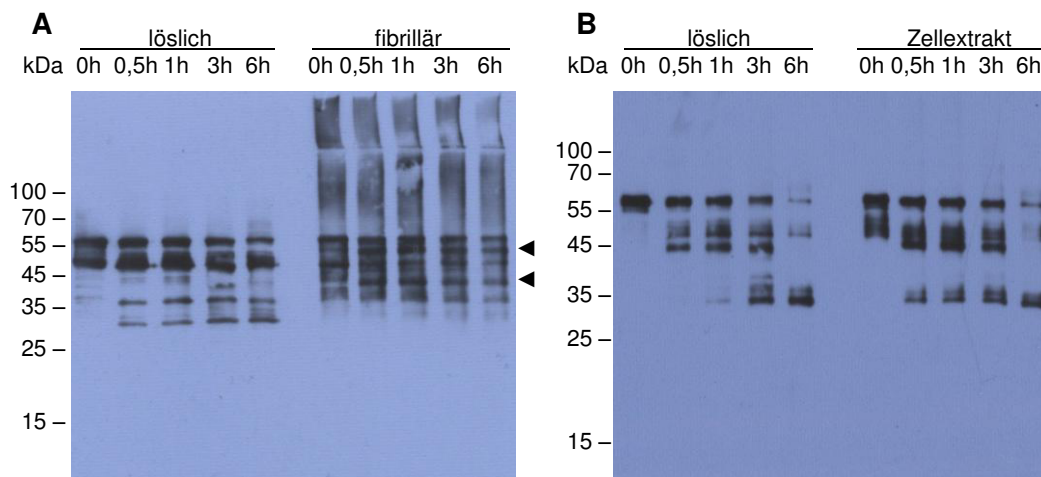


Abbildung 14: Western-Blot der limitierten Proteolyse von PABPN1-Strep mit Chymotrypsin. (A) Test der Bedingungen mit löslichem und *in vitro* produziertem, fibrillärem  $\Delta$ Ala-PABPN1-Strep. Schwarze Pfeilspitzen markieren für PABPN1-Fibrillen spezifische Banden. (B) Vergleich von löslichem, rekombinant in *E. coli* produziertem +7Ala-PABPN1-Strep und aus stabil transfizierten HEK293-Zellen isoliertem +7Ala-PABPN1-Strep. Die Reaktionen wurden nach verschiedenen Zeitpunkten abgestoppt (oberhalb der Western-Blots angegeben). Die Detektion erfolgte durch einen Anti-PABPN1-Antikörper.

### 3.1.6 Löslichkeitstest

Um auszuschließen, dass fibrilläres PABPN1-Strep in den Zelltrümmern zurückblieb und damit für weitere Analysen verloren ging, erfolgte die Analyse der stabil transfizierten Zelllinien mit einem *filter trap tssay* genannten Löslichkeitstest. Mit dieser Methode konnte die Bildung unlöslicher Aggregate von Glutamin-expandiertem Huntingtin, Alanin-expandierten GFP-PABPN1-Fusionsproteinen und dem Protein Tau nachgewiesen werden [114, 174-176].

#### Test der experimentellen Bedingungen mit *in vitro* hergestellten Fibrillen

Als Erstes wurde mit *in vitro* hergestellten Fibrillen getestet, ob der *filter trap assay* geeignet sein würde, um zwischen löslichem und fibrillärem PABPN1-Strep zu differenzieren. Durch Anwendung eines Dot-Blots (Kapitel 2.2.4.3) war festzustellen, dass der verwendete Anti-PABPN1-Antikörper nicht zwischen löslichem und fibrillärem PABPN1-Strep unterschied. Verschiedene Mengen beider Proben resultierten stets in einer vergleichbaren Signalstärke (Abbildung 15 A). Als Nächstes wurde lösliches und fibrilläres PABPN1-Strep dem *filter trap assay* unterzogen. Bei dieser Methode wurden die Proben vor dem Auftragen auf eine Nitrozellulose-Membran in einem Puffer verdünnt, welcher 0,1 % SDS enthielt. Anschließend wurde die Membran mit diesem Puffer gewaschen (Kapitel 2.2.4.4). Es waren fünf- bis zehnfach höhere Mengen des löslichen Proteins erforderlich, um ein mit dem fibrillären Protein vergleichbares Signal zu erzielen (Abbildung 15 B). Da der Anti-PABPN1-Antikörper nicht zwischen löslichem und fibrillärem PABPN1 unterschied, konnten die Signalunterschiede auf eine unterschiedlich effiziente Bindung von löslichem und fibrillärem Protein an die Nitrozellulose-Membran zurückgeführt werden. Folglich sollte mit dieser Methode eine Unterscheidung zwischen löslichem und fibrillärem PABPN1-Strep aus Zellkulturen möglich sein.

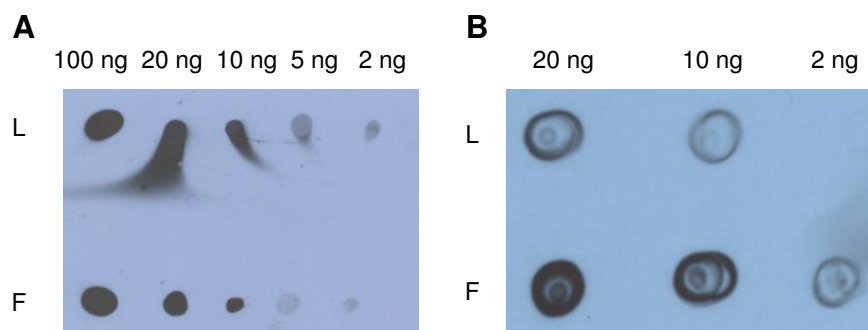


Abbildung 15: Löslichkeitstest zur Unterscheidung zwischen löslichem und fibrillärem  $\Delta$ Ala-PABPN1-Strep. (A) Dot-Blot und (B) *Filter trap assay*. Die aufgetragene Proteinmenge ist oberhalb der Blots gezeigt. Lösliches Protein ist seitlich mit L, fibrilläres mit F markiert. Zur Detektion diente ein Anti-PABPN1-Antikörper.

### Analyse stabil transfizierter Zelllinien

Zur Analyse einer möglichen Fibrillenbildung in stabil mit +7Ala-,  $\Delta$ Ala- und WT-PABPN1-Strep transfizierten Zellen wurde ein Zellaufschluss in Gegenwart von 2,0 % SDS durchgeführt. Durch Zentrifugation wurde die lösliche von der unlöslichen Fraktion separiert und die Proben dem *filter trap assay* unterzogen (Kapitel 2.2.4.4). Als Kontrolle dienten untransfizierte Zellen. Als Ladekontrolle erfolgte eine Detektion des endogenen Aktins, um nachzuweisen, dass gleiche Mengen der Proben aufgetragen waren (Abbildung 16 A). Das Alanin-expandierte +7Ala-PABPN1-Strep verursachte keinen erhöhten Anteil unlöslicher Aggregate oder Fibrillen im Vergleich zu  $\Delta$ Ala- und WT-PABPN1-Strep. Auch im Vergleich mit dem endogenen PABPN1 untransfizierter Zellen ließ sich keine geänderte Verteilung zwischen löslicher und unlöslicher Fraktion beobachten. Vermutlich entstehen in den stabil mit PABPN1-Strep transfizierten Zellen keine nachweisbaren Mengen an Fibrillen.

### Analyse transient transfizierter Zelllinien

Die Menge an rekombinantem Protein ging in den stabil mit +7Ala-PABPN1-Strep transfizierten Zellen über die Zeit zurück (Abbildung 11). Es ist möglich, dass während längerer Kultivierung nur Zellen überlebten, welche eine verringerte PABPN1-Strep-Expression aufwiesen oder durch Überexpression anderer Proteine die Ausbildung von Ablagerungen reduzierten (Kapitel 4.2.4 und Kapitel 4.2.6). Deshalb wurde der *filter trap assay* mit transient transfizierten Zellen wiederholt. Im Vergleich zu stabil transfizierten Zellen war nach transienter Transfektion mit Hilfe des *filter trap assay* ein höherer Anteil an rekombinantem PABPN1-Strep sichtbar (Abbildung 16 B). Trotzdem ließ sich auch hier kein Unterschied in der Verteilung der löslichen oder unlöslichen Fraktion zwischen +7Ala-,  $\Delta$ Ala- und WT-PABPN1-Strep oder untransfizierten Zellen feststellen.

Zur Quantifizierung des *filter trap assay* wurden die Blots stabil und transient transfizierter Zellen mit dem Programm „*ImageQuant*“ densitometrisch ausgewertet und der Anteil an unlöslichem PABPN1 an der Gesamtmenge PABPN1 berechnet (Tabelle 16). Es sind nur geringe Unterschiede zwischen den drei PABPN1-Strep-Varianten mit verschiedenen Alaninexpansionen festzustellen. Jedoch trat auch zwischen dem Anteil an unlöslichem, endogenem PABPN1 in den untransfizierten Zellen beider Experimente ein Unterschied von 9 % auf. Die unterschiedlichen Anteile an unlöslichem PABPN1-Strep liegen folglich in der Größenordnung dieser experimentellen Abweichung. Dies erlaubt die Schlussfolgerung, dass weder vergleichend zwischen den PABPN1-Strep-Varianten, noch in Bezug auf das endogene PABPN1 der untransfizierten Zellen ein erhöhter Anteil unlösliches Protein vorlag. Die Auswertung des *filter trap assay* bestätigte die vorherigen Ergebnisse, dass vermutlich kein fibrilläres PABPN1 in den Zellen vorhanden war (siehe Kapitel 3.1.5).

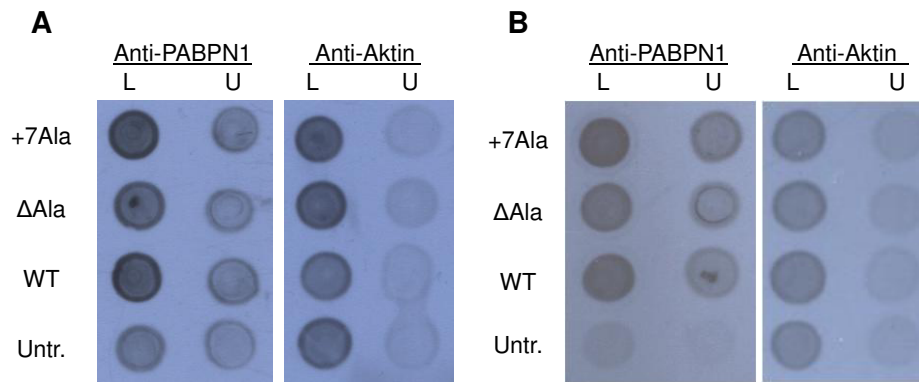


Abbildung 16: *Filter trap assay* zur Untersuchung der Löslichkeit von PABPN1 aus Zellkulturen. (A) Stabil transfizierte HEK293-Zellen. (B) Transient transfizierte HEK293-Zellen. Die lösliche Fraktion ist mit L, die unlösliche mit U gekennzeichnet. Seitlich ist die PABPN1-Strep-Variante angegeben. Als Kontrolle dienten untransfizierte Zellen (Untr.). Die Detektion erfolgte mittels eines Anti-PABPN1-Antikörpers und als Ladekontrolle diente ein Anti-Aktin-Antikörper.

Transfiziertes Konstrukt	Stabile Transfektion	Transiente Transfektion
<b>+7Ala-PABPN1</b>	29 %	41 %
<b>ΔAla-PABPN1</b>	30 %	36 %
<b>WT-PABPN1</b>	33 %	38 %
<b>Untransfiziert</b>	40 %	31 %

Tabelle 16: Anteil unlösliches PABPN1 bezogen auf die Gesamtmenge an PABPN1.

### 3.1.7 Fibrillierung von PABPN1-Strep in Zellkernextrakt

Da im Zellkulturmodell keine Hinweise auf die Bildung von fibrillärem PABPN1-Strep gefunden wurden, sollte abschließend geklärt werden, ob die bisher *in vitro* beobachtete Oligoalanin-unabhängige Fibrillierung in Gegenwart von Zellkernextrakt stattfinden kann. Dazu wurde ein Zellkernextrakt von HEK293-Zellen präpariert (Kapitel 2.2.4.9). Die Fibrillierungsansätze enthielten 60  $\mu$ M PABPN1-Strep (2,2 mg/ml). Aus technischen Gründen konnte maximal eine Endkonzentration von 0,5 mg/ml des Zellkernextrakts zugegeben werden. Die Inkubationstemperatur betrug 20 °C. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, um die Fibrillenbildung anhand einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität des Fluoreszenzfarbstoffs Thioflavin T (ThT) zu verfolgen (Kapitel 2.2.6.2). Unter Anregung bei 450 nm kommt es in Gegenwart von Fibrillen zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität von ThT bei 482 nm [18, 28, 141]. Die Anwesenheit des Kernextrakts hatte keinen sichtbaren Einfluss auf die Fibrillenbildung der PABPN1-Strep-Varianten. Als Vergleich diente eine Probe  $\Delta$ Ala-PABPN1-Strep, die ohne den Extrakt fibrilliert wurde. Zellkernextrakt allein hingegen führte nicht zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität von

ThT (Abbildung 17 A). Durch Transmissionselektronenmikroskopie (Kapitel 2.2.5.10) wurde in den Proben aller PABPN1-Strep-Varianten Fibrillen gefunden. Die Probe des Kernextraktes ohne PABPN1-Strep enthielt nur kompakte, amorphe Aggregate (Abbildung 17 B).

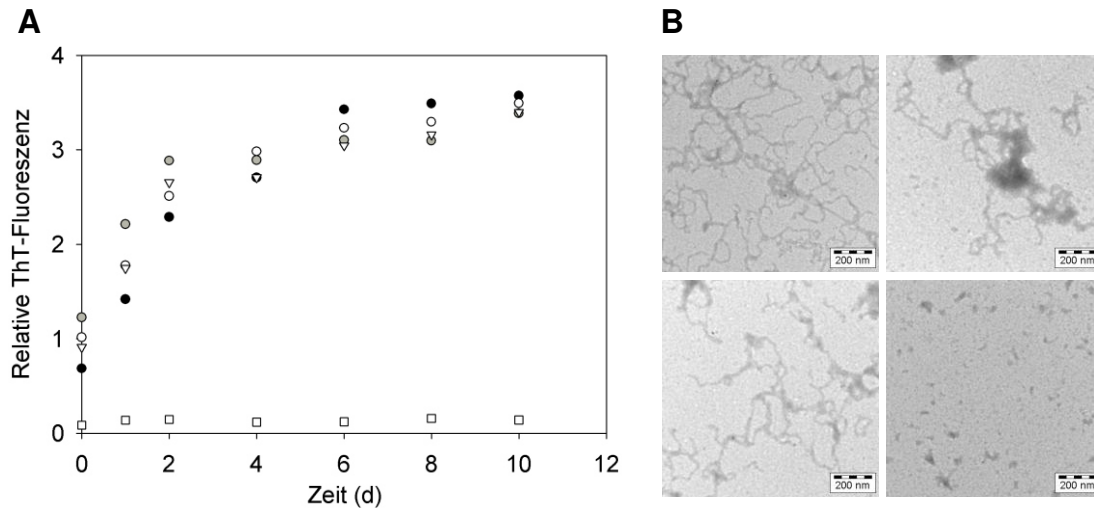


Abbildung 17: Kinetik der Fibrillenbildung von PABPN1-Strep in Gegenwart von Zellkernextrakt. (A) Fibrillierungskinetik bei 20 °C und einer PABPN1-Strep Konzentration von 2,2 mg/ml. Der Kernextrakt wurde zu einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml zugegeben. +7Ala- (●), ΔAla- (○), WT-PABPN1-Strep (●), ΔAla-PABPN1-Strep ohne Kernextrakt (▽) und Kernextrakt ohne PABPN1-Strep (□). (B) Elektronenmikroskopische Aufnahmen. +7Ala- (oben links), ΔAla-, (oben rechts), WT-PABPN1-Strep (unten links) und Kernextrakt ohne PABPN1-Strep (unten rechts).

Weder hinsichtlich der Fibrillierungskinetik, noch der Morphologie der Fibrillen konnte ein Einfluss durch die Anwesenheit des Zellkernextrakts detektiert werden. Die bisher *in vitro* beobachtete Oligoalanin-unabhängige Fibrillenbildung von PABPN1 [141, 169] ist auch in einem Zellkernextrakt möglich. Jedoch erlaubt dieses Experiment keine endgültigen Aussagen bezüglich der Fibrillierung *in vivo*, weil keine physiologischen Bedingungen vorlagen (Kapitel 4.2.4).

### 3.2. Die Rolle der RNP-Domäne bei der Fibrillenbildung von PABPN1

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten weiterführende Untersuchungen zur *in vitro*-Fibrillenbildung von Vollängen-PABPN1 durchgeführt werden. In vorausgegangenen Arbeiten war eine Fibrillierung der N-terminalen Domäne des Proteins in Abhängigkeit der Oligoalaninsequenz nachgewiesen worden [34, 35]. Im Gegensatz dazu konnte in späteren Versuchen eine Alanin-unabhängige Fibrillenbildung von Vollängen-PABPN1 festgestellt werden, bei welcher der C-terminalen Domäne eine entscheidende Bedeutung zukam [141]. Bisher weitgehend ungeklärt ist die Rolle der RNP-Domäne bei der Umwandlung zu Fibrillen. Die Aufklärung der Struktur der RNP-Domäne von humanem PABPN1 und eines homologen Proteins des Krallenfrosches *Xenopus laevis* lieferte Hinweise auf eine Dimerisierung dieser Domäne [144, 145]. Dies resultierte in der Fragestellung, ob bei der Fibrillierung von PABPN1 ein *domain swapping*-Prozess auftreten könnte. Eine Dimerbildung durch *domain swapping* als Vorstufe der Fibrillenbildung wurde für einige Proteine nachgewiesen [65, 67, 69]. Die kovalente Verbindung von Sekundärstrukturelementen mit Disulfidbrücken verhinderte die Umwandlung von Cystatin C und dem Prion-Protein zu Fibrillen [146, 147]. Nach der Reduktion der Disulfidbrücken war eine Fibrillierung des Prion-Proteins wieder möglich [147].

Um einen eventuellen *domain swapping*-Mechanismus bei der Fibrillierung von PABPN1 zu unterbinden, sollte eine PABPN1-Variante untersucht werden, bei welcher Helix- $\alpha$ 1 und Strang- $\beta$ 2 der RNP-Domäne durch eine eingeführte Disulfidbrücke kovalent verbunden sind. Vorbereitende Experimente dafür sind vor Beginn dieser Arbeit ausgeführt worden. Wildtyp-PABPN1 enthält zwei freie, in der RNP-Domäne lokalisierte Cystein-Reste an den Positionen 195 und 205. Um eine falsche Disulfidverbrückung auszuschließen, wurde eine PABPN1-Variante hergestellt, bei welcher die zwei natürlichen Cystein-Reste durch Serin-Reste ersetzt waren ( $\Delta$ Cys-PABPN1, [177]). Basierend auf der Röntgenkristallstruktur der RNP-Domäne [145] wurden mit Hilfe des Programms MODIP passende Aminosäurereste selektiert, welche unter minimalen Auswirkungen auf die strukturelle Integrität der RNP-Domäne durch Cystein-Reste ersetzt werden konnten (Dr. Christoph Parthier, Kapitel 2.2.7). Die besten Ergebnisse wurden für einen Austausch der Reste Alanin 185 und Valin 201 erwartet. Folglich wurden die Reste 185 und 201 von  $\Delta$ Cys-PABPN1 durch Cystein ersetzt (A185C/V201C-PABPN1), sodass ausschließlich diese Reste eine Disulfidbrücke bilden können (Abbildung 18). In vorbereitenden Experimenten wurden weitere PABPN1-Varianten untersucht, bei denen andere Sekundärstrukturelemente mit Disulfidbrücken verbunden waren. Außer A185C/V201C-PABPN1 zeigte keine dieser Varianten eine redox-abhängige Fibrillierung [178]. Anknüpfend an diese vorläufigen Ergebnisse wurden die beschriebenen PABPN1-Varianten in dieser Arbeit genauer untersucht. Weil eine thermodynamische

Charakterisierung von Vollängen-PABPN1 aufgrund amorpher Aggregation während der Entfaltung bislang nicht möglich ist, erfolgte die biophysikalische Charakterisierung der entsprechenden Varianten in der isolierten RNP-Domäne (WT-RNP,  $\Delta$ Cys-RNP und A185C/V201C-RNP) (Abbildung 18).

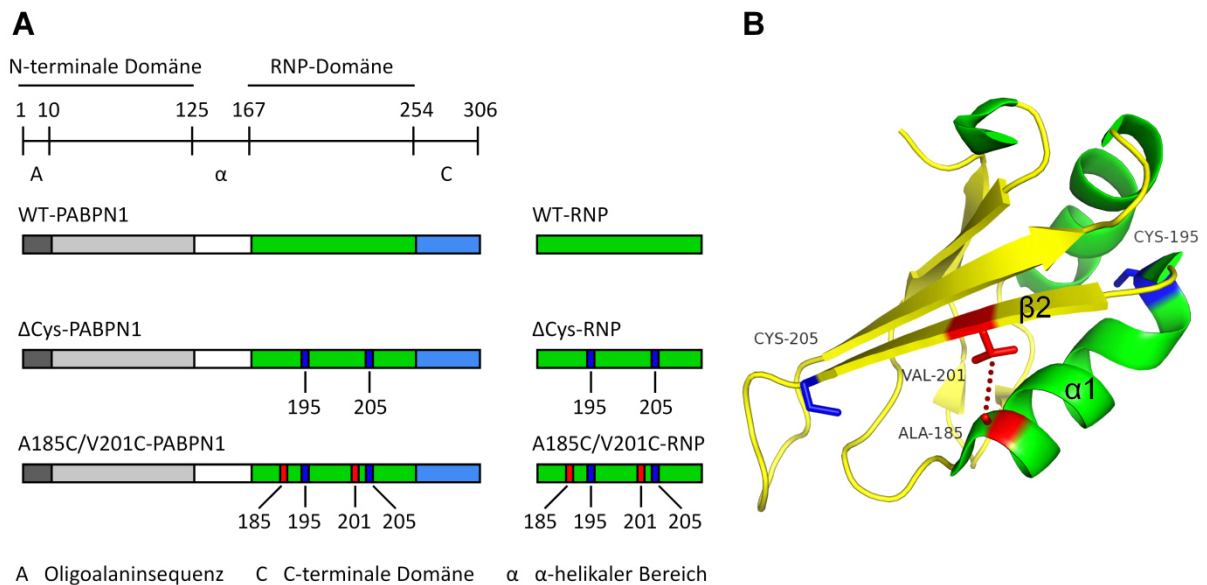


Abbildung 18: Schema der untersuchten PABPN1- und RNP-Domäne-Varianten. Die Cystein-Reste an Positionen 195 und 205 des Wildtyp-Proteins, welche zur Erstellung von  $\Delta$ Cys-PABPN1 und  $\Delta$ Cys-RNP durch Serin-Reste ersetzt wurden, sind blau markiert. Die Reste Alanin 185 und Valin 201, welche bei A185C/V201C-PABPN1 und A185C/V201C-RNP durch Cysteine ausgetauscht wurden, sind rot hervorgehoben. (A) Schematische Darstellung der untersuchten PABPN1- und RNP-Domäne-Varianten. Der obere Balken gibt die Anfangs- und Endaminosäuren der Domänen von PABPN1 an. Dargestellt sind die Oligoalaninsequenz (dunkelgrau), die N-terminale Domäne (hellgrau), der  $\alpha$ -helikale Bereich (weiß), die RNP-Domäne (grün) und die C-terminale Domäne (hellblau). (B) Strukturmodell der RNP-Domäne von PABPN1. Helices sind grün,  $\beta$ -Stränge und *loop*-Bereiche sind gelb dargestellt. Helix- $\alpha$ 1 und Strang- $\beta$ 2 sind markiert. Modifiziert nach [145]; PDB: 3B4D.

### 3.2.1 Untersuchung der Auswirkung einer Disulfidbrücke auf die RNP-Domäne

#### 3.2.1.1 Rekombinante Herstellung und Reinigung der RNP-Domäne-Varianten

Erste biochemische Untersuchungen konnten die isolierte RNP-Domäne als eigenständig faltenden und funktionellen Bereich von PABPN1 identifizieren [125, 179]. Die cDNA, welche für die RNP-Domäne-Varianten kodiert, wurde aus den Expressionsvektoren der entsprechenden PABPN1-Varianten amplifiziert und in den pET11a-Expressionsvektor kloniert (Kapitel 2.2.3.6 bis 2.2.3.8; Daten nicht gezeigt). Die RNP-Domäne-Varianten wurden in *E. coli Rosetta 2*<sup>TM</sup> pLysS rekombinant hergestellt (Kapitel 2.2.1.3). WT-RNP wurde als lösliches Protein vorgefunden.  $\Delta$ Cys-RNP lag zu etwa 50 % löslich vor. A185C/V201C-RNP war



nach dem Zellaufschluss ausschließlich in der unlöslichen Fraktion detektierbar (Daten nicht gezeigt).

Unlösliches A185C/V201C-RNP wurde mittels 6 M Guanidiniumchlorid solubilisiert und mittels 100 mM DTT vollständig reduziert. Danach erfolgte die Renaturierung des Proteins (Kapitel 2.2.8.2). Durch Zusatz eines Redoxsystems aus 5 mM oxidiertem Glutathion und 2 mM reduziertem Glutathion zum Renaturierungspuffer, wurde die oxidierte, disulfidverbrückte Form des Proteins hergestellt (dS-RNP). Um eine vollständig reduzierte Form des Proteins (SH-RNP) zu erhalten, wurde dem Renaturierungspuffer 10 mM DTT zugesetzt (Kapitel 2.2.8.2). Durch chromatographische Reinigungsschritte wurden die RNP-Domäne-Varianten isoliert (Daten nicht gezeigt). Nach dem Zellaufschluss waren vier Chromatographie-Schritte zur Reinigung von WT- und  $\Delta$ Cys-RNP notwendig. Für dS- und SH-RNP waren nur die letzten beiden Reinigungsschritte erforderlich (Abbildung 19).

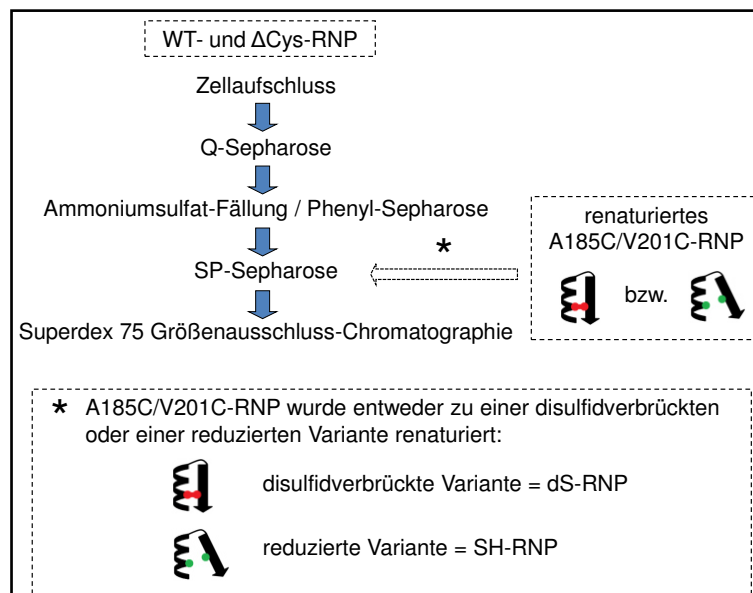


Abbildung 19: Schema zur Reinigung der RNP-Domäne-Varianten. WT- und  $\Delta$ Cys-RNP wurden über vier Reinigungsschritte als lösliches Protein gewonnen: Q-Sepharose; Ammoniumsulfat-Fällung / Phenyl-Sepharose; SP-Sepharose; Superdex 75 Größenausschluss-Chromatographie. A185C/V201C-RNP lag nach dem Zellaufschluss unlöslich vor. Die Renaturierung erfolgte entweder als disulfidverbrückte Variante (dS-RNP) oder als reduzierte Variante (SH-RNP). Diese Varianten wurden in zwei Schritten gereinigt: SP-Sepharose; Größenausschluss-Chromatographie.

Bei der Größenausschluss-Chromatographie wurden für alle RNP-Domäne-Varianten symmetrische Peaks detektiert (Abbildung 20 A). In den Proteinpräparationen konnten mittels SDS-PAGE keine Kontaminationen durch endogene Proteine von *E. coli* festgestellt werden (Abbildung 20 B). Die Ausbildung der Disulfidbrücke von dS-RNP ist anhand des Laufverhaltens bei scheinbar geringerem Molekulargewicht im Vergleich zu SH-RNP ersichtlich. Wie ein Ellman's Test belegte, enthält die Präparation von dS-RNP keine freien

SH-Gruppen ([180]; Daten nicht gezeigt). Die Identität der Proteine wurde durch Massenspektrometrie bestätigt (Anhang 8.2). Durch UV/VIS-Spektroskopie wurde nachgewiesen, dass die Proben frei von Nukleinsäuren waren. Ausgenommen von SH-RNP, waren anhand der Extinktion bei 320 nm keine Lichtstreuungseffekte erkennbar, welche auf Proteinaggregate hindeuteten (Abbildung 20 C). Die Extinktion bei 320 nm blieb für SH-RNP auch nach Ultrazentrifugation (Kapitel 2.2.5.3; Daten nicht gezeigt) unverändert. Vermutlich enthält die Präparation von SH-RNP Proteinaggregate.

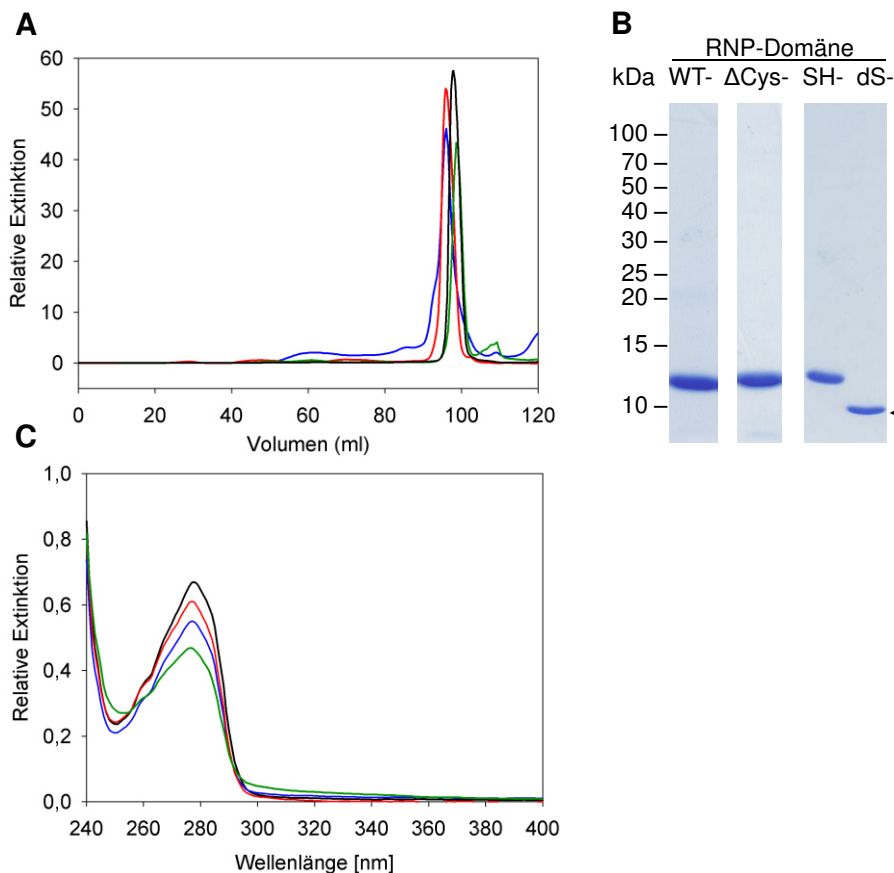


Abbildung 20: Reinigung der RNP-Domäne-Varianten. (A) Chromatogramm der Superdex 75 Größenausschluss-Chromatographie. Die Extinktion wurde bei 280 nm detektiert. WT-RNP (schwarz),  $\Delta$ Cys-RNP (blau), dS-RNP (rot) und SH-RNP (grün). (B) SDS-Polyacrylamid-Gel zur Analyse der gereinigten Proteine. WT-RNP,  $\Delta$ Cys-RNP und dS-RNP wurden in nicht-reduzierendem Probenpuffer aufgetragen. Der Probenpuffer von SH-RNP enthielt 5 mM TCEP. Die intakte Disulfidbrücke von dS-RNP resultierte in einem Laufverhalten bei scheinbar geringerem Molekulargewicht (◄). Ein Proteingrößenstandard ist auf der linken Seite des Gels gezeigt. (C) UV/VIS-Spektrum der gereinigten Proteine. Die farbliche Zuordnung entspricht (A).

### 3.2.1.2 Biophysikalische Charakterisierung der RNP-Domäne-Varianten

Die gereinigten RNP-Domäne-Varianten wurden bei einer Proteinkonzentration von 0,3 mg/ml der analytischen Ultrazentrifugation unterzogen um festzustellen, ob es sich um monomere Proteine handelte (Kapitel 2.2.5.4; Abbildung 21). Die anhand der

Gleichgewichtsläufe ermittelten apparenten Molekulargewichte stimmten gut mit den berechneten Molekulargewichten für die monomeren Proteine überein (Tabelle 17). Folglich liegen die RNP-Domäne-Varianten als Monomere vor. Die Experimente zur Messung der Sedimentationsgeschwindigkeit lieferten apparente Sedimentationskoeffizienten von 1,4 S für WT-RNP,  $\Delta$ Cys-RNP und dS-RNP. Für SH-RNP war keine eindeutige Auswertung möglich. In Zusammenhang mit den Ergebnissen der Größenausschluss-Chromatographie lassen die gemessenen Signale trotz minimaler Schultern auf das Vorliegen homogener Proteinpräparationen der RNP-Domäne-Varianten als Monomere schließen. Die Ausbildung von dimeren Spezies bei höheren Proteinkonzentrationen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

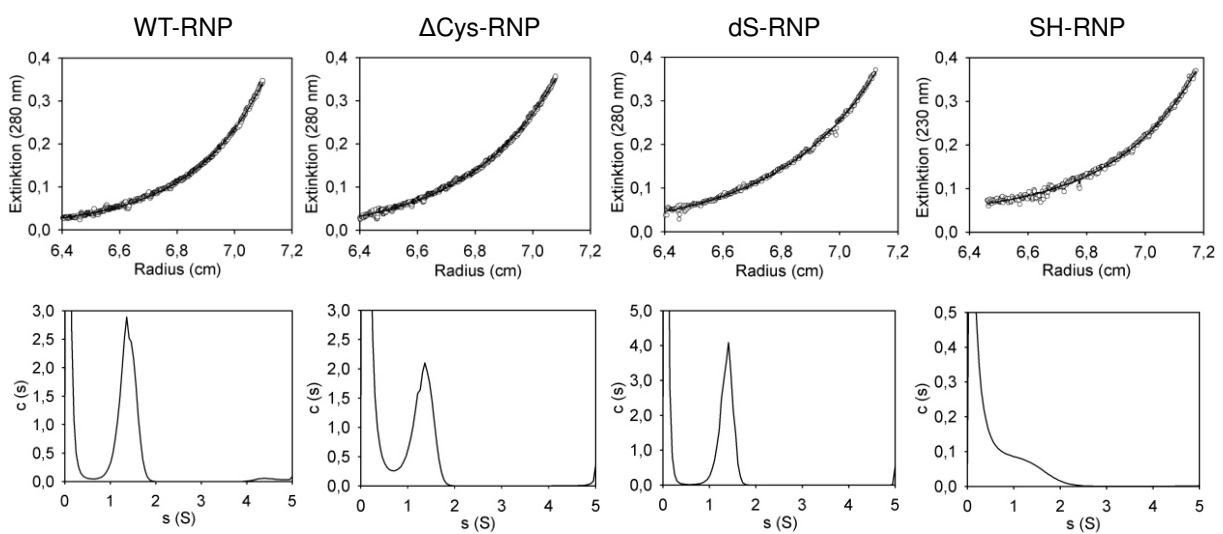


Abbildung 21: Analytische Ultrazentrifugation der RNP-Domäne-Varianten. Die obere Reihe zeigt das Sedimentationsgleichgewicht bei 20000 rpm. In der unteren Reihe ist die Verteilung der Sedimentationskoeffizienten der Experimente zur Messung der Sedimentationsgeschwindigkeit gezeigt. Gemessen wurde bei 40000 rpm für 5 h. Detektiert wurde die Extinktion bei 280 nm für WT-RNP,  $\Delta$ Cys-RNP und dS-RNP sowie bei 230 nm für SH-RNP. Die Messungen wurden von PD Dr. Hauke Lilie durchgeführt.

Protein	Berechnetes Molekulargewicht (kDa)	Apparentes Molekulargewicht (Da)	Apparenter Sedimentationskoeffizient (S)
WT-RNP	9775,0	11200	1,4
$\Delta$ Cys-RNP	9742,9	8400	1,4
dS-RNP	9776,9	9300	1,4
SH-RNP	9778,9	8700	< 1

Tabelle 17: Auswertung der analytischen Ultrazentrifugation. Das berechnete Molekulargewicht wurde mit Hilfe des „ProtParam tool“ (<http://web.expasy.org/protparam/>) ermittelt.

Informationen zum Faltungszustand der RNP-Domäne-Varianten wurden durch spektroskopische Methoden gewonnen. Fern-UV CD-Spektroskopie diente zur Untersuchung des Sekundärstrukturgehalts (Kapitel 2.2.5.5). Die Spektren von WT-RNP und dS-RNP in RNP-Puffer mit Minima bei etwa 217 nm und 208 nm sowie einem globalen Maximum bei 195 nm deuten auf  $\alpha$ -helikale Sekundärstrukturen hin. In den Spektren von  $\Delta$ Cys-RNP und SH-RNP ist das Minimum bei 217 nm kaum ausgeprägt. Hier liegt ein globales Minimum bei etwa 205 nm und ein globales Maximum bei etwa 195 nm vor. Diese Verschiebung impliziert einen erhöhten unstrukturierten Anteil beider Proteine (Abbildung 22 A). Spektren unter denaturierenden Bedingungen wurden in Gegenwart von 6 M Guanidiniumchlorid aufgezeichnet. Hierbei ergab sich für alle Varianten ein Spektrum, welches typisch für unstrukturiertes Protein ist. Dieser deutliche Unterschied zeigte, dass die RNP-Domäne in RNP-Puffer gefaltet vorlag.

Die Untersuchung der Tertiärstruktur der RNP-Domäne-Varianten erfolgte durch Nah-UV CD-Spektroskopie. Mit dieser Methode können Veränderungen der chemischen Umgebung der aromatischen Aminosäuren detektiert werden. Der Verlauf der Spektren ist jedoch schwer prognostizierbar und entspricht eher einem charakteristischen Fingerabdruck der Proteinstruktur [181]. Die Spektren von WT-RNP,  $\Delta$ Cys-RNP und SH-RNP zeigten einen vergleichbaren Verlauf. Dies lässt auf eine ähnliche strukturelle Umgebung der aromatischen Aminosäuren und damit auf eine ähnliche Tertiärstruktur der RNP-Domäne-Varianten schließen (Abbildung 22 B). Auch das Spektrum von dS-RNP hatte einen ähnlichen Verlauf, jedoch war die Signalintensität deutlich erhöht. Dies ist vermutlich auf die Disulfidbrücke dieser Variante zurückzuführen [181, 182]. Weitere Informationen zur Tertiärstruktur wurden durch Fluoreszenzspektroskopie erhalten (Kapitel 2.2.5.6). Die Untersuchung der Fluoreszenz erlaubt Rückschlüsse auf Veränderungen der chemischen Umgebung der aromatischen Aminosäuren und damit auch hinsichtlich ihrer Abschirmung vom Lösungsmittel. Die RNP-Domäne enthält keine Tryptophan-Reste, aber drei Tyrosin- und fünf Phenylalanin-Reste. Durch Anregung bei 274 nm konnte ein Emissionsmaximum bei etwa 307 nm beobachtet werden. Für WT-RNP,  $\Delta$ Cys-RNP und dS-RNP konnte ein deutlicher Unterschied der Fluoreszenzintensität zwischen nativen Bedingungen in RNP-Puffer und denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von 6 M Guanidiniumchlorid detektiert werden. Folglich lag die RNP-Domäne in RNP-Puffer gefaltet vor. Gegenüber den anderen Varianten war für SH-RNP unter nativen Bedingungen eine deutlich geringere Fluoreszenzintensität festzustellen. Der geringere Unterschied zwischen nativen und denaturierenden Bedingungen lässt auf eine stärkere Lösungsmittlexposition der aromatischen Aminosäuren und damit vermutlich auf einen geringen Anteil strukturierter Bereiche schließen (Abbildung 22 C). Dieses Ergebnis stimmt mit dem, anhand der Fern-UV CD-Spektren erwarteten, geringeren strukturierten Anteil überein.

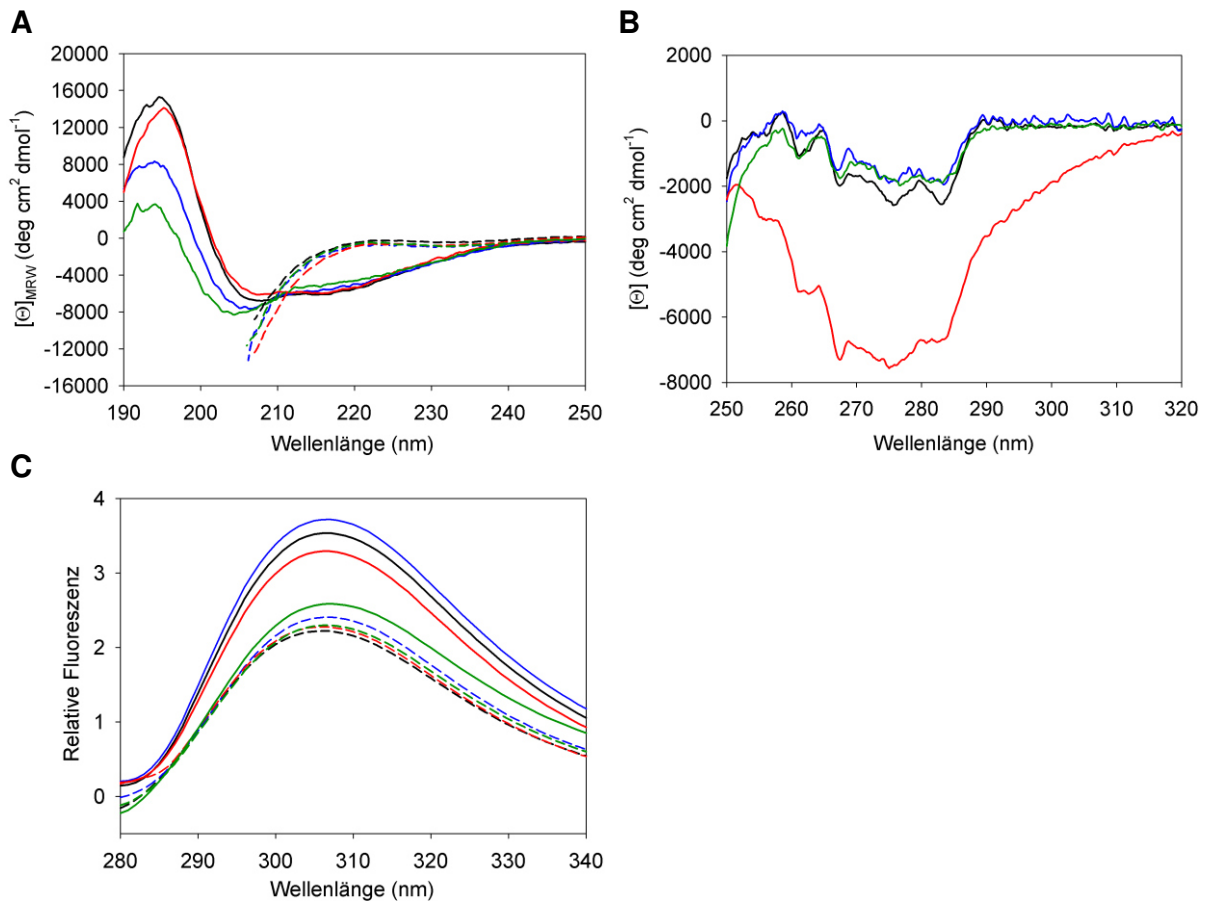


Abbildung 22: Spektroskopische Untersuchung der RNP-Domäne-Varianten. (A) Fern-UV CD-Spektren. (B) Nah-UV CD-Spektren. (C) Fluoreszenzemissionsspektren unter Anregung bei 274 nm. WT-RNP (schwarz),  $\Delta\text{Cys}$ -RNP (blau), dS-RNP (rot) und SH-RNP (grün). Messungen unter nativen Bedingungen erfolgten in RNP-Puffer (durchgezogene Linien) und unter denaturierenden Bedingungen in RNP-Puffer mit 6 M Guanidiniumchlorid (gestrichelte Linien). Der Puffer der Variante SH-RNP enthielt 5 mM TCEP.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass alle Varianten der RNP-Domäne unter nativen Bedingungen in RNP-Puffer als unabhängig gefaltete Proteindomänen mit definierter Sekundär- und Tertiärstruktur vorlagen. Dies bestätigt frühere Untersuchungen zu zwei anderen Wildtyp RNP-Domäne-Konstrukten (RNP, Reste 161-263;  $\alpha$ -RNP, Reste 126-263 [179]).

### 3.2.1.3 Vergleich der thermodynamischen Stabilität der RNP-Domäne-Varianten

Die thermodynamische Stabilität der RNP-Domäne-Varianten wurde mit Hilfe Harnstoff-induzierten Entfaltungsübergänge bestimmt (Kapitel 2.2.5.7). Zur Detektion der Entfaltung wurde die Fluoreszenzemission der aromatischen Aminosäuren bei 307 nm gemessen (Abbildung 23). Aus den Daten wurden unter Annahme eines Zweizustandsmodells die Gibbs'sche freie Enthalpie der Entfaltung  $\Delta G_D$  als Maß für die thermodynamische Stabilität, der  $m$ -Wert als Maß für die Kooperativität der Entfaltung und der Übergangsmittelpunkt  $D_{1/2}$

bestimmt (Tabelle 18). Für WT-RNP und dS-RNP konnten vollständige Übergänge aufgezeichnet werden. Bei der Variante  $\Delta$ Cys-RNP war kein Plateau messbar, welches nativem Protein entsprach. Für SH-RNP wurde eine Basislinie gemessen, welche denaturiertem Protein zuzuordnen war (Daten nicht gezeigt).

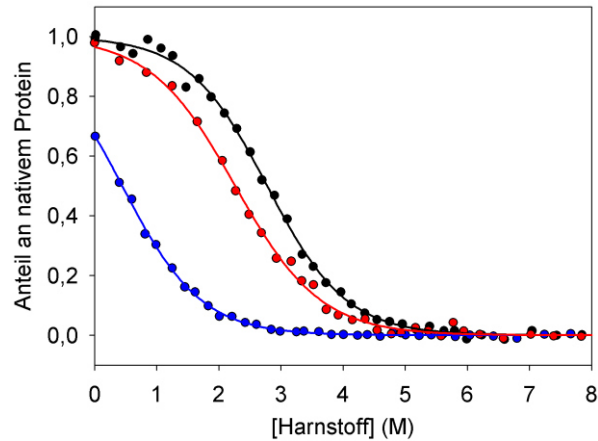


Abbildung 23: Harnstoff-induzierte Denaturierung der RNP-Domäne-Varianten. Die Messung erfolgte in RNP-Puffer unter Zusatz verschiedener Harnstoffkonzentrationen bei 20 °C und einer Proteinkonzentration von 2,5  $\mu$ M. Die Anregungswellenlänge lag bei 274 nm. Die Fluoreszenzemission wurde bei 307 nm aufgezeichnet. WT- (schwarz),  $\Delta$ Cys- (blau) und dS-RNP (rot).

Die thermodynamische Stabilität von  $\Delta$ Cys- und SH-RNP war bei 20 °C vermutlich zu gering, um vollständige Übergänge zu detektieren. Daher wurden für diese Varianten Entfaltungsübergänge in Gegenwart verschiedener Konzentrationen des stabilisierenden Salzes Ammoniumsulfat gemessen [183-185]. Entsprechend einer linearen freien Enthalpiebeziehung wurden aus den  $\Delta G_{D^-}$  und  $D_{1/2^-}$ -Werten bei verschiedenen Ammoniumsulfatkonzentrationen die Werte in Abwesenheit von Ammoniumsulfat extrapoliert (Abbildung 24, Tabelle 18). Mit Ausnahme von SH-RNP waren die Entfaltungsübergänge aller Varianten vollständig reversibel. Für SH-RNP wurde bei der Renaturierung ca. 70 % des ursprünglichen Signals wieder erreicht (Rohdaten siehe Anhang 8.3), sodass lediglich apparente  $\Delta G_{D^-}$  und  $D_{1/2^-}$ -Werte bestimmt werden konnten.

Die thermodynamische Stabilität von  $\Delta$ Cys-RNP war gegenüber dem Wildtyp deutlich vermindert. Der Austausch der freien Cystein-Reste gegen Serin-Reste destabilisierte die RNP-Domäne. Die künstlich eingefügte Disulfidbrücke der Variante dS-RNP kompensierte diesen Effekt teilweise und bewirkte eine Stabilisierung gegenüber  $\Delta$ Cys-RNP. Dennoch war die Stabilität dieser Variante geringer als die von WT-RNP. Am deutlichsten wurde der stabilisierende Einfluss der Disulfidbrücke im Vergleich zwischen dS-RNP und der reduzierten Variante SH-RNP, deren freie Entfaltungsenthalpie ein negatives Vorzeichen aufwies. Der entfaltete Zustand dieses Proteins war gegenüber dem gefalteten Zustand thermodynamisch begünstigt. Entsprechend Gleichung 7 und 8 (Kapitel 2.2.5.7) wurde berechnet, dass von

$\Delta$ Cys-RNP 72,8 % und von SH-RNP 26,4 % der Moleküle im Gleichgewicht bei 20 °C gefaltet vorlagen (Tabelle 18). Dieses Ergebnis erklärt die geringeren Anteile strukturierter Spezies der Varianten  $\Delta$ Cys-RNP und SH-RNP gegenüber WT-RNP und dS-RNP, welche anhand der Fern-UV CD- und Fluoreszenz-Spektren vermutet wurden.

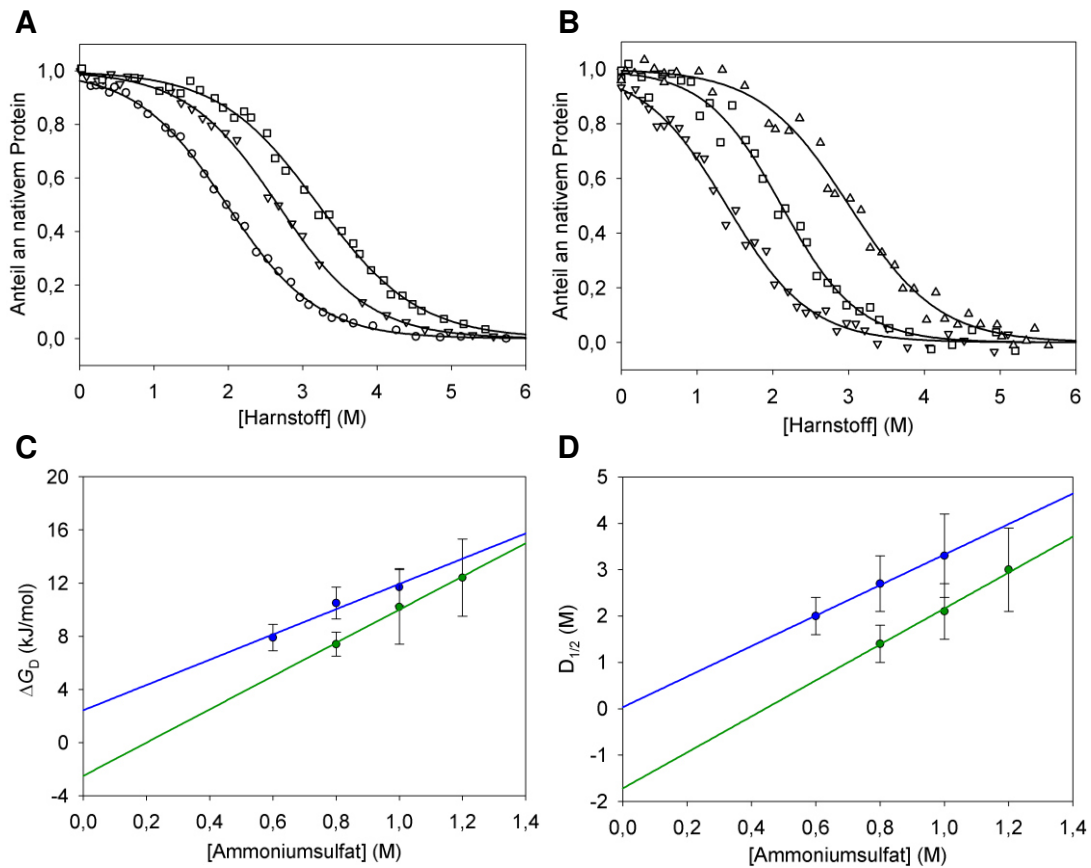


Abbildung 24: Harnstoff-induzierte Denaturierung unter stabilisierenden Bedingungen. Entfaltungsübergänge von (A)  $\Delta$ Cys-RNP und (B) SH-RNP in Gegenwart von 0,6 M (○); 0,8 M (▽); 1,0 M (□); 1,2 M (△) Ammoniumsulfat. Experimentelle Bedingungen siehe Abbildung 23. Der Puffer von SH-RNP enthielt 5 mM TCEP. (C) Extrapolation der freien Enthalpie der Entfaltung  $\Delta G_D$  und (D) Extrapolation des Übergangsmittelpunktes  $D_{1/2}$  auf 0 M Ammoniumsulfat.  $\Delta$ Cys-RNP (blau) und SH-RNP (grün).

Protein	$\Delta G_D$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$m$ (kJ mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	$D_{1/2}$ (M)	Anteil nativ (%)
WT-RNP	10,7 ± 0,9	3,8 ± 0,3	2,8 ± 0,5	98,8
$\Delta$ Cys-RNP*	2,4 ± 1,6	n.d.	0,0 ± 0,8	72,8
dS-RNP	8,1 ± 1,5	3,6 ± 0,4	2,3 ± 0,7	96,5
SH-RNP**†	-2,5 ± 0,9	n.d.	-1,7 ± 0,9	26,4

Tabelle 18: Thermodynamische Parameter der RNP-Domäne-Varianten aus Harnstoff-induzierten Entfaltungsübergängen. Die Messung erfolgte mittels Fluoreszenzspektroskopie (Anregungswellenlänge 274 nm, Emissionswellenlänge 307 nm). Die Werte für  $\Delta$ Cys-RNP und SH-RNP wurden bei verschiedenen Ammoniumsulfat Konzentrationen gemessen und auf 0 M Ammoniumsulfat extrapoliert (\*). Für SH-RNP wurden apparente Werte bestimmt, weil die Reversibilität der Entfaltung bei ca. 70 % lag (†).

Für alle RNP-Domäne-Varianten wurden Entfaltungsübergänge ohne die Populierung stabiler Faltungsintermediate detektiert. Zur Verifizierung der Faltung bzw. Entfaltung nach einem Zweizustandsmodell wurden für WT- und dS-RNP zusätzlich Übergänge unter Messung des CD-Signals bei 220 nm aufgenommen. Bei Vorliegen einer Zweizustandsfaltung wären übereinander liegende Daten der Fluoreszenz- und CD-Signale zu erwarten [4, 161]. Die mittels CD-Spektroskopie aufgenommenen Übergänge waren jedoch durch eine geringere Kooperativität  $m$  und Übergangsmittelpunkte  $D_{1/2}$  bei höheren Harnstoff-Konzentrationen gekennzeichnet (Abbildung 25). Diese Beobachtung deutet auf die Existenz von Faltungsintermediaten hin. Zur Überprüfung, ob die Fluoreszenzintensität bei 307 nm sensitiv genug sein würde, um die Entfaltung des Proteins zu detektieren, wurde das Fluoreszenzsignal in Gegenwart von 0,1 M des Fluoreszenz-Quenchers Acrylamid gemessen. Kommt es bei der Entfaltung der RNP-Domäne zur einer erhöhten Lösungsmittlexposition der aromatischen Aminosäuren, würde deren Fluoreszenzintensität durch das Acrylamid gequencht werden. In Gegenwart von Acrylamid waren zu niedrigeren Harnstoff-Konzentrationen verschobene Übergangsmittelpunkte  $D_{1/2}$  und eine höhere Kooperativität  $m$  zu verzeichnen (Abbildung 25). Vermutlich kam es bei geringen Harnstoff-Konzentrationen bereits zur Änderung der Lösungsmittlexposition der aromatischen Aminosäuren, sodass diese für das Acrylamid leichter zugänglich waren und eine Fluoreszenzlöschung auftrat. Die  $\Delta G_D$ -Werte, welche unter Auswertung der Fluoreszenzintensität, der Fluoreszenzintensität in Gegenwart von 0,1 M Acrylamid und des CD-Signals bei 220 nm erhalten wurden, stimmten jedoch im Rahmen der experimentellen Abweichungen überein (Tabelle 18, Tabelle 19).

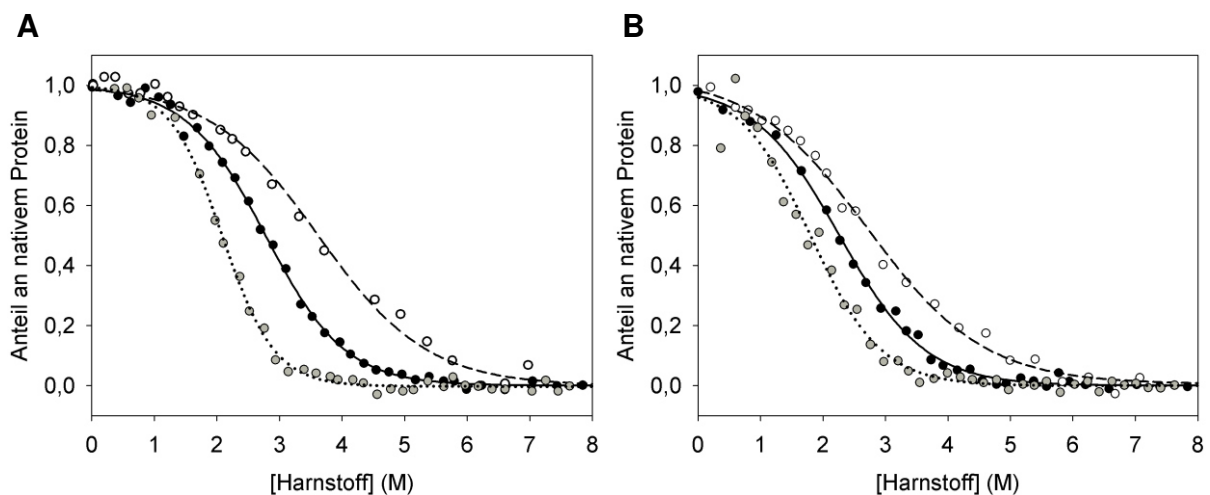


Abbildung 25: Harnstoff-induzierte Denaturierung zur Überprüfung eines Zweizustandsmodells. (A) WT-RNP und (B) dS-RNP. Die Signale wurden anhand der Fluoreszenzintensität (entspricht Abbildung 23; ●; —), der Fluoreszenzintensität in Gegenwart von 0,1 M Acrylamid (●; ····) und mittels CD-Spektroskopie (○; ---) ermittelt. Die Fluoreszenzintensität wurde bei 307 nm gemessen. Die Anregung erfolgte bei 274 nm. Das CD-Signal wurde bei 220 nm aufgezeichnet. Die Protein-konzentration betrug 2,5  $\mu$ M und die Temperatur 20 °C.



Protein	$\Delta G_D$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$m$ (kJ mol <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> )	$D_{1/2}$ (M)
<b>Messung mittels CD-Spektroskopie bei 220 nm</b>			
WT-RNP	10,2 ± 0,5	2,8 ± 0,1	3,6 ± 0,3
dS-RNP	7,9 ± 0,3	2,8 ± 0,1	2,8 ± 0,2
<b>Messung der Fluoreszenzintensität bei 307 nm in Gegenwart von 0,1 M Arcylamid</b>			
WT-RNP	12,2 ± 1,6	5,9 ± 0,6	2,1 ± 0,5
dS-RNP	7,8 ± 3,2	4,3 ± 0,9	1,8 ± 1,1

Tabelle 19: Thermodynamische Parameter von WT-RNP und dS-RNP aus Harnstoff-induzierten Entfaltungsübergängen zur Überprüfung einer Zweizustandsfaltung. Die experimentellen Details sind in Abbildung 25 vermerkt.

Um zu klären, ob Faltungsintermediate vorliegen, wurden die Faltungs- und Entfaltungskinetiken von WT-RNP und dS-RNP mittels *stopped-flow*-Fluoreszenz- und -CD-Messungen untersucht (Kapitel 2.2.5.7). Die detektierten „monophasischen Verläufe“ der Entfaltung und Rückfaltung lassen ebenfalls auf ein Zweizustandsmodell schließen (Anhang 8.4) [161]. Die Faltungsgeschwindigkeit  $k_f$  von WT-RNP und dS-RNP verringerte sich exponentiell mit der Harnstoffkonzentration. Die Entfaltungsgeschwindigkeit  $k_u$  stieg exponentiell mit steigenden Harnstoffkonzentrationen an. Der natürliche Logarithmus der apparanten Geschwindigkeitskonstanten wurde in einem Chevron-Plot gegen die Harnstoffkonzentration aufgetragen (Abbildung 26). Der lineare Verlauf der Faltungs- und Rückfaltungsäste der Chevron-Plots von WT-RNP und dS-RNP deutet auf eine Zweizustandsfaltung hin [161].

Die Auswertung der anhand von Fluoreszenz- bzw. CD-Spektroskopie ermittelten Daten lieferte vergleichbare kinetische Parameter (Tabelle 20). Unter Berücksichtigung experimenteller Fehler stimmten die kinetisch ermittelten Werte für  $\Delta G_D$  und  $m$  mit denen der Gleichgewichtsübergänge überein. Dies deutet ebenfalls auf eine vorliegende Zweizustandsfaltung von WT- und dS-RNP hin [4]. Die zehnfach erhöhte Faltungsgeschwindigkeit gegenüber WT-RNP, könnte durch die Disulfidbrücke von dS-RNP verursacht werden. Eine Disulfidbrücke erhöht die Faltungsgeschwindigkeit, wenn Wechselwirkungen begünstigt werden, welche im Übergangszustand der Faltung ausgebildet werden [186]. Die Entfaltungsgeschwindigkeit von dS-RNP war gegenüber WT-RNP zweifach erhöht. Die Aminosäureaustausche von dS-RNP könnten Wechselwirkungen stören, welche in der nativen Konformation vorhanden sind.

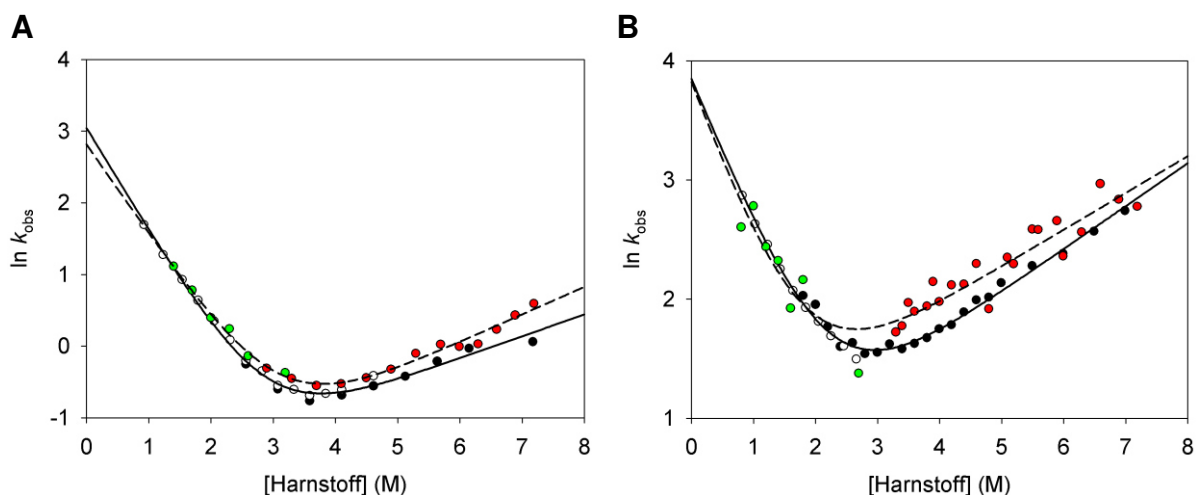


Abbildung 26: Chevron-Plots zur Auswertung der *stopped-flow*-Faltungskinetiken. (A) WT-RNP und (B) dS-RNP. Die Messungen erfolgten in RNP-Puffer mit verschiedenen Endkonzentrationen an Harnstoff. Fluoreszenz-Spektroskopie: Rückfaltungsexperimente (○), Entfaltungsexperimente (●). Die Proteinkonzentration betrug 5  $\mu\text{M}$ . Die Anregung erfolgte bei 280 nm, die Detektion bei Wellenlängen größer als 305 nm. CD-Spektroskopie: Rückfaltungsexperimente (●), Entfaltungsexperimente (●). Die Proteinkonzentration betrug 25  $\mu\text{M}$ . Das Signal wurde bei 235 nm detektiert. Die mathematische Anpassung der Fluoreszenzwerte ist als durchgezogene Linie und die der CD-Daten als gestrichelte Linie gezeigt.

Parameter	Fluoreszenz Spektroskopie		CD-Spektroskopie	
	WT-RNP	dS-RNP	WT-RNP	dS-RNP
$k_f^0$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$20,91 \pm 2,00$	$45,66 \pm 3,14$	$16,62 \pm 2,48$	$43,65 \pm 16,42$
$k_u^0$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$0,13 \pm 0,02$	$1,29 \pm 0,09$	$0,10 \pm 0,02$	$2,07 \pm 0,40$
$m_f$ ( $\text{M}^{-1}$ )	$1,44 \pm 0,06$	$1,27 \pm 0,05$	$1,26 \pm 0,08$	$1,41 \pm 0,34$
$m_u$ ( $\text{M}^{-1}$ )	$0,31 \pm 0,03$	$0,36 \pm 0,01$	$0,39 \pm 0,03$	$0,31 \pm 0,04$
$\Delta G_D$ ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )	$12,3 \pm 2,8$	$8,7 \pm 1,2$	$12,4 \pm 3,9$	$7,4 \pm 4,2$
$m$ ( $\text{kJ mol}^{-1} \text{M}^{-1}$ )	$4,3 \pm 0,5$	$4,0 \pm 0,3$	$4,0 \pm 0,5$	$4,2 \pm 1,5$
$D_{1/2}$ (M)	$2,9 \pm 1,0$	$2,2 \pm 0,5$	$3,1 \pm 1,4$	$1,8 \pm 1,7$

Tabelle 20: Kinetische Parameter der *stopped-flow*-Experimente von WT- und dS-RNP. Experimentelle Details siehe Abbildung 26.

### 3.2.1.4 Untersuchung der Temperatur-induzierten Denaturierung der RNP-Domäne

Vergleichende Untersuchungen der Stabilität der RNP-Domäne-Varianten sind auch durch Temperatur-induzierte Entfaltung möglich (Kapitel 2.2.5.7; Abbildung 27). Die Auswertung der Übergangskurven erlaubt die Bestimmung der Van't Hoff'schen Entfaltungsenthalpie  $\Delta H_m(vH)$ , des Übergangsmittelpunktes  $T_m$  und der Entfaltungsentropie  $\Delta S_m$  (Tabelle 21). Die Voraussetzung dafür ist eine vollständig reversible Entfaltung. Die RNP-Domäne-Varianten erreichten nur eine Reversibilität von 80 % (Rohdaten Anhang 8.5). Um die Ergebnisse der Temperatur-induzierten Entfaltung trotzdem quantifizieren zu können, wurden apparente Werte für  $\Delta H_m(vH)$ ,  $T_m$  und  $\Delta S_m$  bestimmt. Weil SH-RNP zum überwiegenden Anteil ungefaltet vorlag (Abschnitt 3.2.1.3), wurde diese Variante nicht untersucht. Die Ergebnisse der Temperatur-induzierten Entfaltung von WT-RNP,  $\Delta Cys$ -RNP und dS-RNP korrelierten mit den ermittelten thermodynamischen Stabilitäten. Der Austausch der Cystein-Reste gegen Serin-Reste führte zu einer Destabilisierung von  $\Delta Cys$ -RNP im Vergleich zu WT-RNP. Die künstliche Disulfidbrücke resultierte in einer deutlichen Stabilisierung von dS-RNP gegenüber  $\Delta Cys$ -RNP. Jedoch wurde die thermische Stabilität von WT-RNP nicht übertroffen.

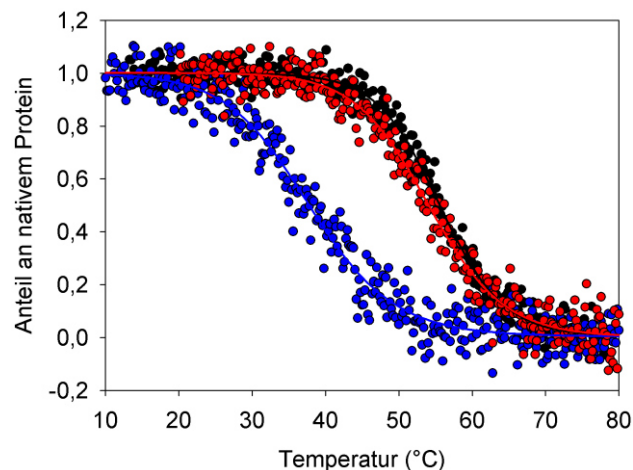


Abbildung 27: Temperatur-induzierte Denaturierung von RNP-Domäne-Varianten. WT-RNP (schwarz),  $\Delta Cys$ -RNP (blau) und dS-RNP (rot). Die Daten wurden anhand des CD-Signals bei 208 nm in RNP<sup>K</sup>-Puffer ermittelt. Die Proteinkonzentration betrug 0,24 mg/ml.

Protein	$\Delta H_m(vH)$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$T_m$ (°C)	$\Delta S_m$ (kJ mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
WT-RNP	208,8 ± 11,3	55,6 ± 0,4	0,64 ± 0,05
$\Delta Cys$ -RNP	139,9 ± 13,7	37,8 ± 0,8	0,45 ± 0,10
dS-RNP	175,2 ± 13,8	54,1 ± 0,5	0,54 ± 0,08

Tabelle 21: Apparente Parameter der Temperatur-induzierten Entfaltung von RNP-Domäne-Varianten. Experimentelle Details siehe Abbildung 27.

Um die enthalpischen und entropischen Beiträge, welche zur Stabilisierung der RNP-Domäne-Varianten beitragen, besser vergleichen zu können, wurden die Werte aus Tabelle 21 mit Hilfe von Gleichung 23 und Gleichung 24 (Kapitel 2.2.5.7) auf 20 °C umgerechnet ( $\Delta H_D^{20^\circ\text{C}}$ ,  $\Delta S_D^{20^\circ\text{C}}$ ). Die zur Berechnung notwendige spezifische Wärmekapazität  $\Delta C_p$  wurde, basierend auf einer Abschätzung von  $\Delta C_p = 12 \text{ cal deg}^{-1} \text{ mol}^{-1}$  pro Aminosäurerest, für die RNP-Domäne-Varianten berechnet ( $\Delta C_p = 4,421 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) [159]. Eine direkte Bestimmung von  $\Delta C_p$  aus kalorimetrischen Messung war nicht möglich (siehe unten). Ebenso wurde eine Methode zur Bestimmung von  $\Delta C_p$  aus Temperatur-induzierten Entfaltungsübergängen nicht angewendet, weil die Übergänge nicht vollständig reversibel waren [187, 188]. Durch Gleichung 21 (Kapitel 2.2.5.7) wurde aus den apparenten Parametern der Temperatur-induzierten Entfaltung die Gibbs'sche freie Enthalpie der Entfaltung bei 20 °C berechnet (Tabelle 22).

Protein	$\Delta H_D^{20^\circ\text{C}} \text{ (kJ mol}^{-1}\text{)}$	$\Delta S_D^{20^\circ\text{C}} \text{ (kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}\text{)}$	$\Delta G_D \text{ (kJ mol}^{-1}\text{)}$
WT-RNP	51,2	0,133	12,2
$\Delta\text{Cys-RNP}$	61,0	0,189	5,6
dS-RNP	24,2	0,053	8,7

Tabelle 22: Apparente Parameter der Temperatur-induzierten Denaturierung der RNP-Domäne-Varianten bei 20 °C. Die Berechnung erfolgte auf Basis der Daten aus Abbildung 27 und Tabelle 21.

Die Variante dS-RNP war gegenüber  $\Delta\text{Cys-RNP}$  und WT-RNP deutlich enthalpisch destabilisiert. Der Austausch von Alanin 185 und Valin 201 gegen die voluminöseren Cystein-Reste könnte zu konformationellen Spannungen (*conformational strain*) führen. Im Gegenzug war dS-RNP gegenüber  $\Delta\text{Cys-RNP}$  und WT-RNP entropisch stabilisiert. Eine Disulfidbrücke senkt die Entropie des entfalteten Zustands und damit die Entropiedifferenz zwischen entfaltetem und nativem Protein. In Folge dessen erhöht sich nach Gleichung 21 (Kapitel 2.2.5.7) die thermodynamische Stabilität des gefalteten Proteins [189]. Die anhand der Temperatur-induzierten Entfaltung der RNP-Domäne-Varianten berechneten  $\Delta G_D$ -Werte stimmen mit den  $\Delta G_D$ -Werten der chemisch-induzierten Entfaltung überein (Tabelle 18 und Tabelle 22). Dieser Vergleich untermauert die Aussagekraft der apparenten Parameter hinsichtlich der Beschreibung der Faltung der RNP-Domäne-Varianten. Die geringen Abweichungen könnten zustande kommen, weil nicht die tatsächliche spezifische Wärmekapazität  $\Delta C_p$  der drei Varianten bestimmt werden konnte, sondern ein abgeschätzter Wert zur Berechnung herangezogen wurde.

Eine weitere Methode zur Untersuchung der Temperatur-induzierten Entfaltung von Proteinen stellt die Kalorimetrie dar. Die thermische Entfaltung mittels *differential scanning calorimetry* (DSC) erlaubte die Bestimmung der kalorimetrischen Entfaltungsenthalpie

$\Delta H_m(\text{cal})$  und der Übergangstemperatur  $T_m$  (Kapitel 2.2.5.9). Aufgrund des Verlaufs der Basislinien vor und nach dem Peak war eine Ermittlung der spezifischen Wärmekapazität  $\Delta C_p$  aus den Messwerten nicht möglich. Zur Auswertung wurde ein Wert von  $\Delta C_p = 4,421 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  für WT-RNP angenommen [159]. Weil die Entfaltung nur zu 50 % reversibel war und nur eine Bestimmung apparenter Werte zuließ, wurde auf eine Untersuchung der anderen RNP-Domäne-Varianten verzichtet. Für WT-RNP wurden apparente Werte von  $\Delta H_m(\text{cal}) = 193,1 \pm 0,8 \text{ kJ mol}^{-1}$  und von  $T_m = 52,9 \pm 0,1 \text{ °C}$  erhalten (Abbildung 28). Die kalorimetrisch ermittelten  $\Delta H_m(\text{cal})$ - und  $T_m$ -Werte waren in Übereinstimmung mit den  $\Delta H_m(\text{vH})$ - und  $T_m$ -Werten der Temperatur-induzierten Entfaltungsübergänge von WT-RNP (Tabelle 21). Aus den kalorimetrisch bestimmten Parametern  $\Delta H_m(\text{cal})$  und  $T_m$  wurde nach Gleichung 26 (Kapitel 2.2.5.9) eine Gibbs'sche freie Entfaltungsenthalpie von  $\Delta G_D = 11,9 \text{ kJ mol}^{-1}$  berechnet [159]. Dieser Wert stimmte mit den  $\Delta G_D$ -Werten der Harnstoff-induzierten Entfaltungsübergänge und den kinetisch bestimmten  $\Delta G_D$ -Werten überein. Diese Daten bestätigen das bereits vermutete Zweizustandsmodell für WT-RNP [161, 190].

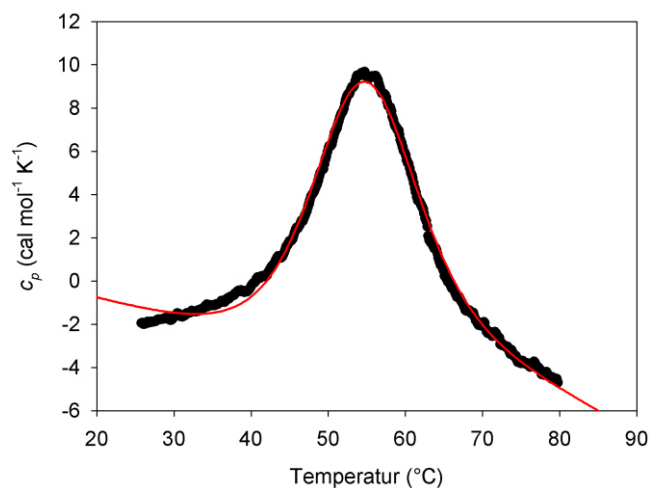


Abbildung 28: Thermogramm der DSC-Messung von WT-RNP. Die Messung erfolgte in RNP<sup>K</sup>-Puffer bei einer Proteinkonzentration von 0,24 mg/ml. Die mathematische Auswertung erfolgte unter Annahme einer berechneten spezifischen Wärmekapazität  $\Delta C_p$  von  $4,421 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  (rote Linie).

### 3.2.2 Untersuchung der Auswirkung einer Disulfidbrücke auf PABPN1

Wie gezeigt wurde, resultierte der Austausch der Cystein-Reste 195 und 205 gegen Serin-Reste in einer geringeren thermodynamischen Stabilität von  $\Delta\text{Cys-RNP}$  im Vergleich mit WT-RNP. Die künstliche Disulfidbrücke führte, wie erwartet, zur Stabilisierung von dS-RNP gegenüber der Cystein-freien Variante  $\Delta\text{Cys-RNP}$  oder der reduzierten Variante SH-RNP. Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, welche Auswirkung die Aminosäureaustausche im Kontext der Entfaltung und Fibrillierung von Vollängen-PABPN1 haben.

### 3.2.2.1 Biophysikalische Charakterisierung der PABPN1-Varianten

Die Varianten WT-PABPN1,  $\Delta$ Cys-PABPN1 und A185C/V201C-PABPN1 wurden rekombinant in *E. coli Rosetta 2*<sup>TM</sup> pLysS hergestellt (Kapitel 2.2.1.3). Die Reinigung erfolgte nach einem publizierten Protokoll (Kapitel 2.2.8.3; [141]). Mittels SDS-PAGE konnten bandenreine Proteinpräparationen nachgewiesen werden (Abbildung 29). Um disulfidverbrücktes dS-PABPN1 zu erhalten, wurde dem Elutionspuffer des ersten Reinigungsschritts 5 mM oxidiertes Glutathion zugesetzt. Aufgrund der hohen Aggregationsneigung während der Reinigung konnte reduziertes SH-PABPN1 nur durch nachträgliche Reduktion von dS-PABPN1 hergestellt werden. Die intakte Disulfidbrücke von dS-PABPN1 resultierte im SDS-Polyacrylamid-Gel in einem Laufverhalten bei scheinbar geringerem Molekulargewicht im Vergleich zur reduzierten Form SH-PABPN1. Eine Reduktion der Disulfidbrücke konnte daher leicht im Gel nachgewiesen werden. Eine Inkubation mit 10 mM DTT über Nacht auf Eis führte bei etwa 50 % der Proteinmoleküle zu einer Reduktion der Disulfidbrücke. Bei einer Erhöhung der DTT-Konzentration auf 100 mM lag der Anteil der reduzierten Form SH-PABPN1 bei ca. 90 % (abgeschätzt aus Abbildung 29).

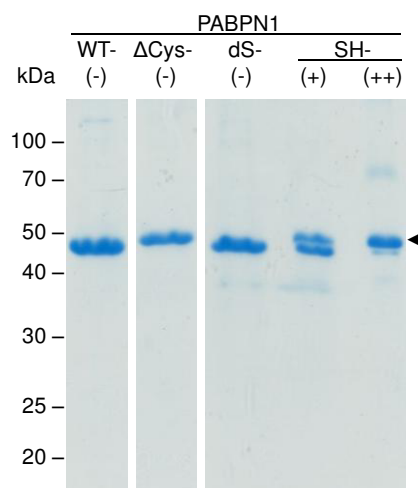


Abbildung 29: SDS-Polyacrylamid-Gel der gereinigten PABPN1-Varianten. Nicht-reduzierender Probenpuffer ist durch (-) gekennzeichnet. SH-PABPN1 (◀) wurde durch Inkubation unter reduzierenden Bedingungen über Nacht in Gegenwart von 10 mM (+) oder 100 mM DTT (++) hergestellt. Angaben zu den Molekulargewichten sind auf der linken Seite des Gels gezeigt.

Der Faltungszustand von WT-PABPN1,  $\Delta$ Cys-PABPN1, und dS-PABPN1 wurde durch spektroskopische Methoden untersucht. Da von SH-PABPN1 keine homogene, reduzierte Präparation erhalten werden konnte, erfolgte für diese Variante keine spektroskopische Charakterisierung. Die Analyse des Sekundärstrukturgehalts in PABPN1-Puffer mittels Fern-UV CD-Spektroskopie ließ auf identische Sekundärstrukturanteile von WT- und dS-PABPN1 schließen. Für  $\Delta$ Cys-PABPN1 war eine geringfügig verringerte Signalintensität bei ähnlichem Verlauf des Spektrums ersichtlich. Dies könnte auf einen geringeren Anteil strukturierter

Bereiche hindeuten. Spektren in Gegenwart von 6 M Guanidiniumchlorid zeigten einen Verlauf, welcher für unstrukturiertes Protein typisch ist (Abbildung 30 A).

Die Tertiärstruktur der PABPN1-Varianten wurden mittels Nah-UV CD-Spektroskopie analysiert. Der Verlauf der Spektren war ähnlich (Abbildung 30 B). Folglich wurde auf eine ähnliche Umgebung der aromatischen Aminosäuren und damit auf eine vergleichbare Tertiärstruktur geschlossen. Die Intensität des Spektrums von dS-PABPN1 war weniger deutlich erhöht als beim Vergleich der RNP-Domäne-Varianten (Kapitel 3.2.1.2). Der Grund lag vermutlich darin, dass die RNP-Domäne nur acht der 18 aromatischen Aminosäuren von PABPN1 umfasst und somit die Disulfidbrücke mehr zum Spektrum beiträgt.

Die Tertiärkontakte in Vollängen-PABPN1 wurden außerdem mit Fluoreszenzspektroskopie analysiert. Eine Anregung aller aromatischen Aminosäuren erfolgte mit Licht einer Wellenlänge von 280 nm. Unter nativen Bedingungen in PABPN1-Puffer waren ein Emissionsmaximum des einzelnen Tryptophans bei 350 nm und eine Schulter der Tyrosin-Reste bei 307 nm sichtbar. Unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von 6 M Guanidiniumchlorid kam es zu einer deutlichen Intensitätsabnahme und einer bathochromen Verschiebung des Maximums von 350 zu 360 nm. Dies deutete auf eine erhöhte Lösungsmittelexposition der aromatischen Reste hin. Die Emission der Tyrosin-Reste bei 307 nm unterlag einer geringeren Intensitätsabnahme und war deutlich als lokales Maximum erkennbar (Abbildung 30 C). Vermutlich lagen im gefalteten Zustand die Tyrosin-Reste in räumlicher Nähe des Tryptophans, wodurch es zu einem Energietransfer zu dem Tryptophan kam. Im denaturierten Zustand könnte eine veränderte räumliche Anordnung für einen verringerten Energietransfer verantwortlich sein, womit die Emission der Tyrosin-Reste deutlicher hervortrat [191]. Unter spezifischer Anregung des Tryptophans mit Licht einer Wellenlänge von 295 nm trat ein Emissionsmaximum bei 355 nm auf. Unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von 6 M Guanidiniumchlorid war wiederum eine Intensitätsabnahme und eine bathochrome Verschiebung des Maximums zu 360 nm zu beobachten (Abbildung 30 D). Dies ließ auf eine erhöhte Lösungsmittelexposition des Tryptophans und die Entfaltung des Proteins schließen.

Zusammenfassend zeigten die spektroskopischen Daten der PABPN1-Varianten deutliche Unterschiede zwischen nativen und denaturierenden Bedingungen und deuten damit auf einen gefalteten Zustand von WT-PABPN1,  $\Delta$ Cys-PABPN1 und dS-PABPN1 hin. Dies stimmte mit bisherigen Untersuchungen überein [141, 178].

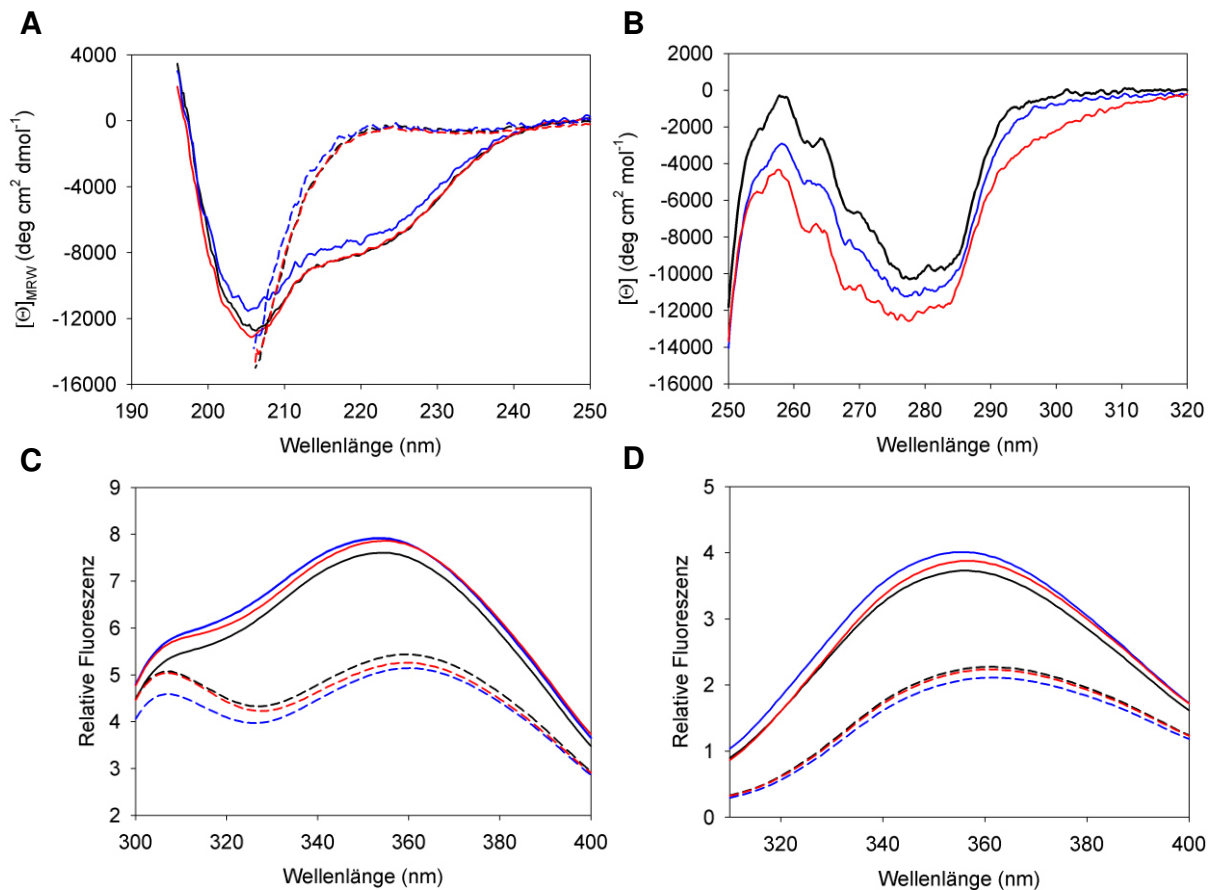


Abbildung 30: Spektroskopische Untersuchung der PABPN1-Varianten. (A) Fern-UV CD-Spektren. (B) Nah-UV CD-Spektren. (C) Fluoreszenzemissionsspektren unter Anregung bei 280 nm. (D) Fluoreszenzemissionsspektren unter spezifischer Anregung des Tryptophans bei 295 nm. WT-PABPN1 (schwarz),  $\Delta$ Cys-PABPN1 (blau) und dS-PABPN1 (rot). Die Messungen wurden unter nativen Bedingungen in PABPN1-Puffer (durchgezogene Linien) und unter denaturierenden Bedingungen in 50 mM Tris/HCl pH 7,9; 6 M Guanidiniumchlorid (gestrichelte Linien) durchgeführt.

Die Aminosäureaustausche der Varianten  $\Delta$ Cys-PABPN1 und A185C/V201C-PABPN1 befinden sich alle im Bereich der RNP-Domäne, welche zusammen mit der C-terminalen Domäne verantwortlich für die Bindungsfähigkeit von PABPN1 an Oligoadenylat-RNA ist [125]. Als weiteren Nachweis, dass diese Varianten strukturell intakt vorliegen, wurden Bindungsstudien mit radioaktiv markierten A14-RNA-Oligonukleotiden durchgeführt (Kapitel 2.2.4.6). Die Filterbindungsexperimente erfolgten unter nicht-reduzierenden und reduzierenden Bedingungen in Gegenwart von 10 mM DTT, um den Einfluss der künstlich eingefügten Disulfidbrücke spezifizieren zu können. Die apparenten Dissoziationskonstanten wurden aus der direkten Auftragung und der doppelt-reziproken Auftragung nach LINEWEAVER-BURK bestimmt [125, 152, 153]. Die ermittelten Werte von WT-PABPN1 und  $\Delta$ Cys-PABPN1 stimmten mit Literaturdaten überein [125, 141, 178].

Wie zu erwarten war, hatte die Gegenwart von DTT keinen signifikanten Einfluss auf die Bindungsaffinitäten von WT-PABPN1 und  $\Delta$ Cys-PABPN1 (Abbildung 31, Tabelle 23).  $\Delta$ Cys-



PABPN1 zeigte im Vergleich zum Wildtyp eine leicht reduzierte Bindungsaffinität. Die Ursache könnte eine geringfügig veränderte Konformation des Proteins sein, welche durch die Substitution der freien Cystein-Reste gegen Serin-Reste hervorgerufen wurde. Die Dissoziationskonstante von disulfidverbrücktem dS-PABPN1 war gegenüber reduziertem SH-PABPN1 deutlich herabgesetzt. Da zuvor ein definierter Faltungszustand nachgewiesen worden war, könnte der Grund hierfür eine Einschränkung der Flexibilität der Proteinstruktur sein. Vermutlich verursacht die künstliche Disulfidbrücke konformationelle Spannungen (*conformational strain*), welche die Bindungsaffinität zur RNA vermindern [192].

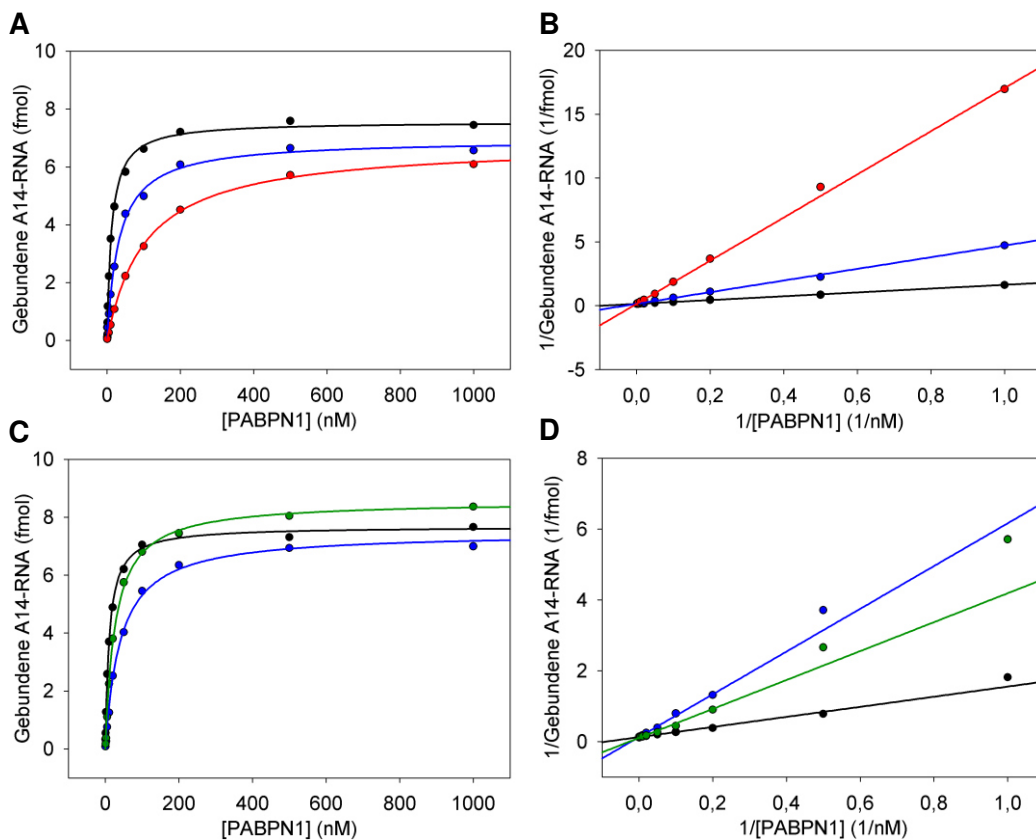


Abbildung 31: Filterbindungsexperimente der PABPN1-Varianten. Es wurde radioaktiv markierte A14-Oligoadenylat-RNA verwendet. Direkte Auftragung unter nicht-reduzierenden Bedingungen (A) und reduzierenden Bedingungen (C). Doppelt-reziproke Auftragung der Daten nach LINEWEAVER-BURK unter nicht-reduzierenden Bedingungen (B) und reduzierenden Bedingungen (D). WT-PABPN1 (●),  $\Delta$ Cys-PABPN1 (●), dS-PABPN1 (●) und SH-PABPN1 (●). Die Bestimmung der apparenten Dissoziationskonstanten  $K_D$  wurde sowohl anhand einer hyperbolen Auswertung der direkten Auftragung als auch einer linearen Regression der doppelt-reziproken Auftragung vorgenommen. WT-PABPN1 (—),  $\Delta$ Cys-PABPN1 (—), dS-PABPN1 (—) und SH-PABPN1 (—).

<b>K<sub>D</sub> unter nicht-reduzierenden Bedingungen</b>			
	<b>WT-PABPN1</b>	<b>ΔCys-PABPN1</b>	<b>dS-PABPN1</b>
<b>Direkte Auftragung</b>	12,2 ± 0,6 nM	32,8 ± 1,9 nM	105,4 ± 3,0 nM
<b>Doppelt-reziproke Auftragung</b>	11,1 ± 0,4 nM	31,3 ± 5,3 nM	120,5 ± 3,0 nM
<b>K<sub>D</sub> unter reduzierenden Bedingungen</b>			
	<b>WT-PABPN1</b>	<b>ΔCys-PABPN1</b>	<b>SH-PABPN1</b>
<b>Direkte Auftragung</b>	10,7 ± 0,5 nM	41,0 ± 2,1 nM	26,7 ± 1,5 nM
<b>Doppelt-reziproke Auftragung</b>	11,0 nM ± 0,4 nM	46,5 ± 1,2 nM	38,1 ± 0,8 nM

Tabelle 23: Apparente Dissoziationskonstanten K<sub>D</sub> der PABPN1-Varianten bei der Bindung von A14-Oligoadenylat-RNA. Die Werte wurden entsprechend einer hyperbolen Auswertung der direkten Auftragung (Abbildung 31 A und C) als auch einer linearen Regression der doppelt-reziproken Auftragung nach LINEWEAVER-BURK (Abbildung 31 B und D) bestimmt.

### 3.2.2.2 Entfaltungsstudien der Volllängen-PABPN1-Varianten

Um Aussagen zur Relevanz der RNP-Domäne bei der Entfaltung des Volllängenproteins treffen zu können, sollte festgestellt werden, ob sich durch die Aminosäureaustausche in der RNP-Domäne Stabilitätsunterschiede im Kontext von Volllängen-PABPN1 ergeben würden. Bei der Entfaltung von PABPN1 mittels Harnstoff konnten keine auswertbaren Ergebnisse erhalten werden (Daten nicht gezeigt). Der Grund liegt in der hohen Tendenz von PABPN1 bei der Entfaltung amorphe Aggregate zu bilden [34]. Jedoch kann die Aggregation von PABPN1 bei der Temperatur-induzierten Denaturierung anhand des Streulichtsignals verfolgt werden (Kapitel 2.2.5.8; [179]). Es wurde ein deutlicher Anstieg der Lichtstreuung für WT-PABPN1, ΔCys-PABPN1 und SH-PABPN1 bei steigender Temperatur detektiert (Abbildung 32). Die thermische Denaturierung von WT-PABPN1 und ΔCys-PABPN1 erfolgte in einem Temperaturbereich, welcher jenem der entsprechenden isolierten RNP-Domänen entsprach (Tabelle 21; Kapitel 3.2.1.4). Aus diesen Daten ist zu schließen, dass die Stabilität des Volllängen-Proteins mit der Stabilität der RNP-Domäne korreliert. Weitere Messmethoden untermauern diese Vermutung (Anhang 8.6). Bei dS-PABPN1 stieg das Lichtstreusignal weitaus geringer an als bei den anderen drei Varianten. Die künstliche Disulfidbrücke von dS-PABPN1 verhinderte vermutlich eine Exposition hydrophober Bereiche, welche nach thermischer Denaturierung zur Aggregation des Proteins führte. Für SH-PABPN1 war ein zweiphasiger Übergang ersichtlich. Der Grund hierfür könnte darin liegen, dass dieses Protein nicht als vollständig reduzierte Form erhalten werden konnte und damit die Aggregationsprozesse eines Gemisches von reduziertem und disulfidverbrücktem Protein detektiert wurden.

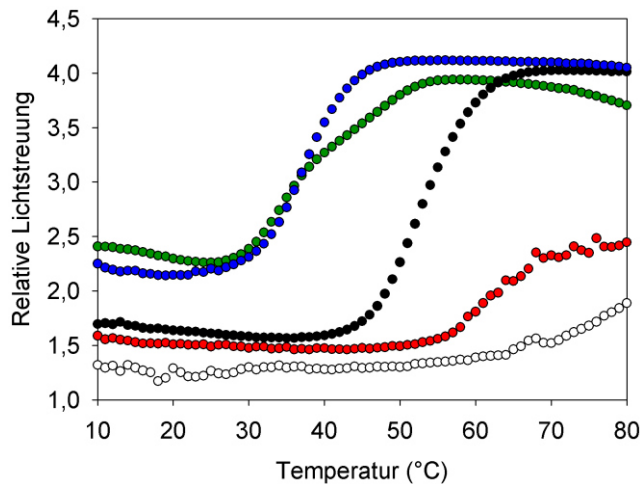


Abbildung 32: Temperatur-induzierte Denaturierung der PABPN1-Varianten. Die Streulichtmessung erfolgte unter Anregung bei 360 nm in PABPN1-Puffer<sup>K</sup>. Das Integral der Messwerte zwischen 353 nm und 367 nm wurde ausgewertet. Die Proteinkonzentration betrug 0,12 mg/ml. WT-PABPN1 (●),  $\Delta$ Cys-PABPN1 (●), dS-PABPN1 (●), SH-PABPN1 (●) und Puffersignal (○).

### 3.2.2.3 Einfluss der intramolekularen Disulfidbrücke auf die Fibrillierung von PABPN1

Im Folgenden sollten Informationen über die Bedeutung der RNP-Domäne bei der Fibrillenbildung von Vollängen-PABPN1 erhalten werden. Zur Fibrillierung wurden die PABPN1-Varianten bei einer Proteinkonzentration von 60  $\mu$ M und 20 °C inkubiert. Um einen möglichen Einfluss der künstlichen Disulfidverbrückung von dS-PABPN1 auf die Fibrillenbildung zu ermitteln, wurden parallel Experimente unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen angesetzt. Die Bildung von Fibrillen wurde anhand des Fluoreszenzfarbstoffs Thioflavin T (ThT) verfolgt (Kapitel 2.2.6.2).

Für alle PABPN1-Varianten wurde ein hyperboler Verlauf der Fibrillierungskinetik festgestellt (Abbildung 33, Anhang 8.7 vollständige Kinetik). Dies stimmte mit bisherigen Literaturangaben für PABPN1 überein [141]. Wie anhand früherer Ergebnisse erwartet, hatte die Gegenwart von 10 mM DTT keinen Einfluss auf die Fibrillenbildung von  $\Delta$ Cys-PABPN1 [178]. Unter reduzierenden Bedingungen erreichte WT-PABPN1 eine etwa 30 % höhere ThT-Fluoreszenzintensität als unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Der Grund hierfür könnte die Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken unter nicht reduzierenden Bedingungen sein, welche die Fibrillierung beeinträchtigen. Eine sehr deutlich redoxabhängige Fibrillierung wurde für A185C/V201C-PABPN1 detektiert. Die ThT-Fluoreszenz von disulfidverbrücktem dS-PABPN1 erreichte nach ca. 150 h ein Plateau. Für reduziertes SH-PABPN1 in Gegenwart von 10 mM DTT wurde bereits nach ca. 25 h ein Plateau der ThT-Fluoreszenzintensität beobachtet. Damit wurde ein vorläufiges Ergebnis bestätigt [178]. Eine weitere Beschleunigung der Fibrillierung konnte durch Erhöhung der DTT-Konzentration auf 100 mM erzielt werden (Abbildung 33). In Gegenwart von 100 mM DTT wurde bereits nach vier

Stunden ein Plateau der ThT-Fluoreszenzintensität detektiert. Dies könnte darin begründet sein, dass höhere DTT-Konzentrationen zu einer effizienteren Reduktion der Disulfidbrücke von dS-PABNP1 führen (siehe Abbildung 29). Vermutlich lagert sich die, unter reduzierenden Bedingungen entstehende, Variante SH-PABNP1 anschließend schneller zu Fibrillen um.

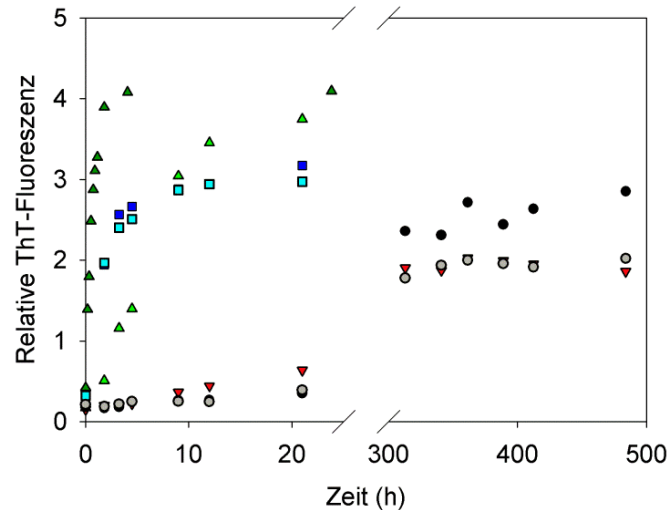


Abbildung 33: Fibrillenbildung von PABNP1-Varianten. Die Fibrillierungsansätze in PABNP1-Puffer wurden bei 20 °C und einer Proteinkonzentration von 60  $\mu$ M inkubiert. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurden Proben entnommen und die Fibrillenbildung anhand der Fluoreszenzintensität des Farbstoffs ThT bei 482 nm verfolgt. WT-PABNP1 (Punkte; grau, 0 mM DTT; schwarz, 10 mM DTT),  $\Delta$ Cys-PABNP1 (Quadrate; hellblau, 0 mM DTT; dunkelblau, 10 mM DTT), dS-PABNP1 (nach unten zeigende Dreiecke; rot, 0 mM DTT) und SH-PABNP1 (nach oben zeigende Dreiecke; hellgrün, 10 mM DTT; dunkelgrün, 100 mM DTT).

Das Vorliegen fibrillärer Strukturen wurde durch elektronenmikroskopische Aufnahmen überprüft (Kapitel 2.2.5.10). In allen Proben wurden Fibrillen nachgewiesen (Abbildung 34). Damit war auszuschließen, dass die Aminosäureaustausche zu amorpher Aggregation anstatt einer Fibrillenbildung führten. Die kovalente Verbindung von Helix- $\alpha$ 1 und Faltblatt- $\beta$ 2 der RNP-Domäne durch die Disulfidbrücke in dS-PABNP1 verzögerte deutlich die Fibrillierung dieser Variante gegenüber reduziertem SH-PABNP1. Die Stabilität der Disulfidbrücke während der Fibrillierung wurde durch die Zugabe von Iodacetamid gezeigt (Anhang 8.8).

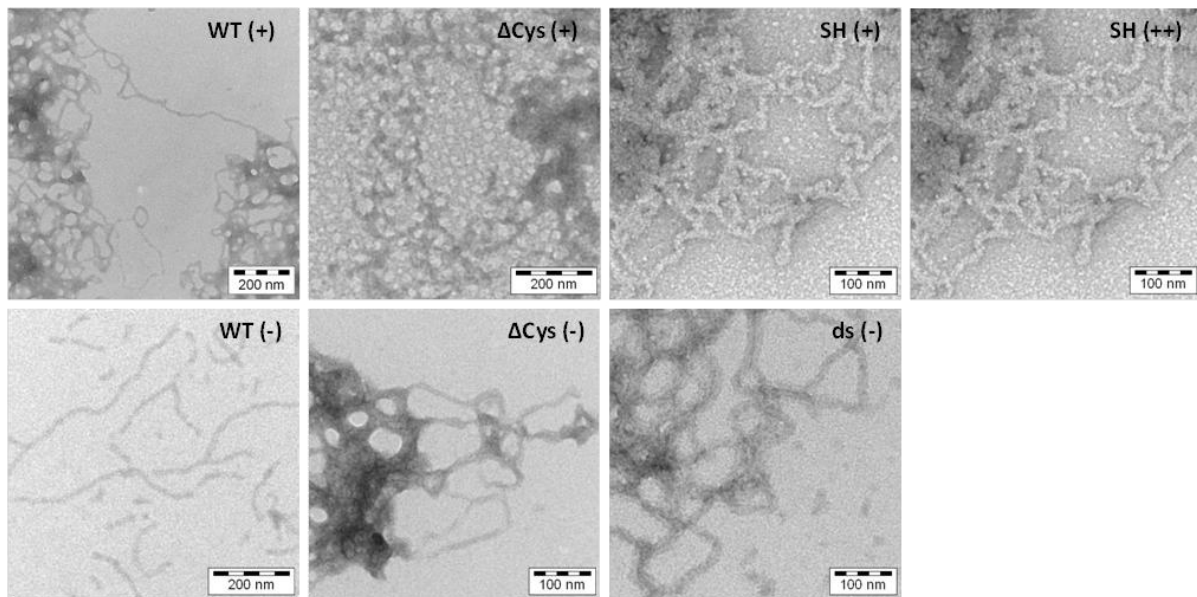


Abbildung 34: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von fibrillären PABPN1-Varianten nach Erreichen eines Plateaus der ThT-Fluoreszenz. Die Fibrillierungsansätze wurden bei einer Proteinkonzentration von 60  $\mu$ M bei 20 °C inkubiert. Die Fibrillierung fand entweder unter nicht-reduzierenden Bedingungen (-) oder in Anwesenheit von 10 mM DTT (+) oder 100 mM DTT (++) statt. Die Negativkontrastierung wurde mit Uranylacetat vorgenommen.

Um zu überprüfen, ob die Fibrillen der PABPN1-Varianten die gleichen biophysikalischen Eigenschaften wie jene des Wildtyp-Proteins aufwiesen, wurde deren Sensitivität gegenüber der Solubilisierung mit Guanidiniumchlorid untersucht. Dazu wurden die Fibrillen durch Ultrazentrifugation sedimentiert und mit verschiedenen Konzentrationen Guanidiniumchlorid versetzt. Nach einstündiger Inkubation erfolgte eine erneute Trennung der löslichen von der unlöslichen Fraktion mittels Ultrazentrifugation. Der Proteingehalt der Überstände wurde quantifiziert, nachdem auch die verbleibende unlösliche Fraktion mit 6 M Guanidiniumchlorid vollständig solubilisiert war (Kapitel 2.2.6.3). Aus dem Verhältnis der Werte wurde der Anteil der unlöslichen Fraktion berechnet, welcher fibrillärem Protein entsprach (Abbildung 35).

Die Quantifizierung der Ergebnisse erfolgte anhand der Bestimmung des Solubilisierungsmittelpunktes. Dieser entspricht der Guanidiniumchloridkonzentration, bei welcher 50 % des fibrillären Materials solubilisiert war. Bei allen Proben war eine vergleichbare Resistenz gegenüber Guanidiniumchlorid mit Solubilisierungsmittelpunkten zwischen 1,7 M und 2,0 M festzustellen (Tabelle 24). Die Ergebnisse stimmten mit bisherigen Daten zu Fibrillen von PABPN1 überein [141]. Aus der Auswertung der Solubilisierung waren keine Unterschiede hinsichtlich der DTT-Konzentration oder der untersuchten Variante ersichtlich. Dies deutet darauf hin, dass sich die verschiedenen PABPN1-Varianten zu Fibrillen mit vergleichbaren biochemischen Eigenschaften umlagerten.

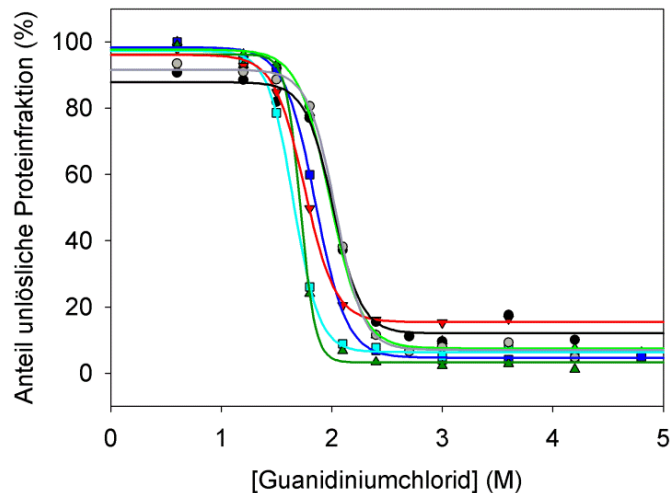


Abbildung 35: Solubilisierung von PABPN1-Fibrillen. Der relative Anteil der unlöslichen, fibrillären Proteinfraction ist nach einstündiger Inkubation bei verschiedenen Guanidiniumchloridkonzentrationen dargestellt. WT-PABPN1 (Punkte; grau, 0 mM DTT; schwarz, 10 mM DTT),  $\Delta$ Cys-PABPN1 (Quadrate; hellblau, 0 mM DTT; dunkelblau, 10 mM DTT), dS-PABPN1 (nach unten zeigende Dreiecke; rot, 0 mM DTT) und SH-PABPN1 (nach oben zeigende Dreiecke; hellgrün, 10 mM DTT; dunkelgrün, 100 mM DTT). Die mathematische Auswertung ist als durchgezogene Linie dargestellt.

PABPN1-Variante	DTT-Konzentration (mM)	Solubilisierungsmittelpunkt (M Guanidiniumchlorid)
WT	0	$2,0 \pm 0,01$
	10	$2,0 \pm 0,03$
$\Delta$ Cys	0	$1,7 \pm 0,01$
	10	$1,9 \pm 0,01$
dS	0	$1,8 \pm 0,01$
SH	10	$2,0 \pm 0,02$
	100	$1,7 \pm 0,02$

Tabelle 24: Mittelpunkt der Solubilisierung von PABPN1-Fibrillen.

### 3.2.2.4 Auswertung der Fibrillierung von Vollängen-PABPN1

Im Kontext von Vollängen-PABPN1 konnten die unterschiedlichen, mutationsbedingten Stabilitäten der RNP-Domäne rekapituliert werden. Die entsprechenden PABPN1-Varianten bildeten Fibrillen mit vergleichbaren biochemischen Eigenschaften. Jedoch waren deutliche Unterschiede hinsichtlich der Fibrillierungskinetik nachweisbar. Um diese Beobachtung zu quantifizieren, wurden die Fibrillierungskinetiken mathematisch ausgewertet. Die Anpassung erfolgte entsprechend zwei verschiedener Methoden. Einerseits wurde ein hyperbolischer *fit* nach Gleichung 30 angewendet. Der Faktor  $k$  im Exponenten stellt die Geschwindigkeitskonstante der Fibrillierung dar (Abbildung 36 A). Weiterhin wurden die frühen Zeitpunkte

der Fibrillierung mit einer linearen Regression entsprechend Gleichung 31 ausgewertet. Der lineare Anfangsbereich wurde am Kurvenverlauf abgeschätzt. Der lineare Anstieg  $m$  beschreibt die Geschwindigkeit am Anfang des Fibrillierungsprozesses (Abbildung 36 B).

Gleichung 30:  $y = y_0 + a \cdot e^{-k \cdot t}$

Gleichung 31:  $y = y_0 + m \cdot t$

$y, y_0, a$  Gleichungsvariablen

$m$  linearer Anstieg am Anfang der Fibrillierung

$k$  Geschwindigkeitskonstante der Fibrillierung

$t$  Zeit

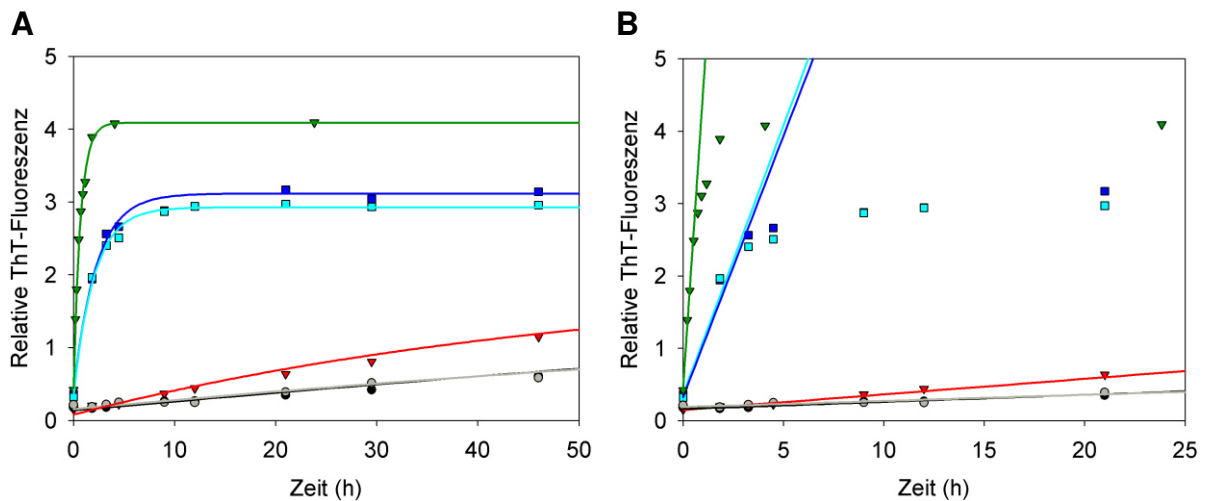


Abbildung 36: Auswertung der Fibrillierungskinetik der PABPN1-Varianten. (A) Auswertung mit einem hyperbolischen *fit* entsprechend Gleichung 30. (B) Auswertung der initialen Fibrillierungsgeschwindigkeit mit einer linearen Regression nach Gleichung 31. Die Auswertungen sind als durchgezogene Linien dargestellt. WT-PABPN1 (Punkte; grau, 0 mM DTT; schwarz, 10 mM DTT),  $\Delta$ Cys-PABPN1 (Quadrate; hellblau, 0 mM DTT; dunkelblau, 10 mM DTT), dS-PABPN1 (nach unten zeigende Dreiecke; rot, 0 mM DTT) und SH-PABPN1 (nach oben zeigende Dreiecke; grün, 100 mM DTT).

Weil die bisherigen Ergebnisse auf einen Zusammenhang zwischen der thermodynamischen Stabilität und der Fibrillierungskinetik deuten, wurden diese Parameter in Relation gesetzt. Die Gibbs'sche freie Entfaltungsenthalpie  $\Delta G_D$  als Maß der thermodynamischen Stabilität steht in einem logarithmischen Zusammenhang mit der Gleichgewichtskonstante, welche die Anteile von entfaltetem und gefaltetem Protein widerspiegelt. Folglich wurden die logarithmischen Parameter der Fibrillierungskinetik von Vollängen-PABPN1 gegen den  $\Delta G_D$ -Wert der entsprechenden RNP-Domäne aufgetragen (Abbildung 37). Dabei konnte ein linearer Zusammenhang sowohl der Fibrillierungsgeschwindigkeitskonstante  $k$  als auch der initialen Fibrillierungsgeschwindigkeit  $m$  festgestellt werden. Eine geringere

thermodynamische Stabilität der RNP-Domäne führte zu einer beschleunigten Fibrillierung von Vollängen-PABPN1. Eine geringe Gibbs'sche freie Entfaltungsenthalpie  $\Delta G_D$  entspricht einem höheren Anteil an ungefaltetem Protein im Gleichgewicht. Dieser Zusammenhang deutet darauf hin, dass die Entfaltung der RNP-Domäne bzw. eine einhergehende Entfaltung von Vollängen-PABPN1 einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Umlagerung zu Fibrillen darstellt. Wie erwartet, hatte die Gegenwart des Reduktionsmittels DTT nur einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Fibrillierung von WT- und  $\Delta$ Cys-PABPN1. Für die reduzierte Form SH-PABPN1 war die Umlagerung zu Fibrillen deutlich beschleunigt im Vergleich mit dS-PABPN1. Dies korrelierte mit der geringeren thermodynamischen Stabilität von reduziertem SH-RNP verglichen mit disulfidverbrücktem dS-RNP.

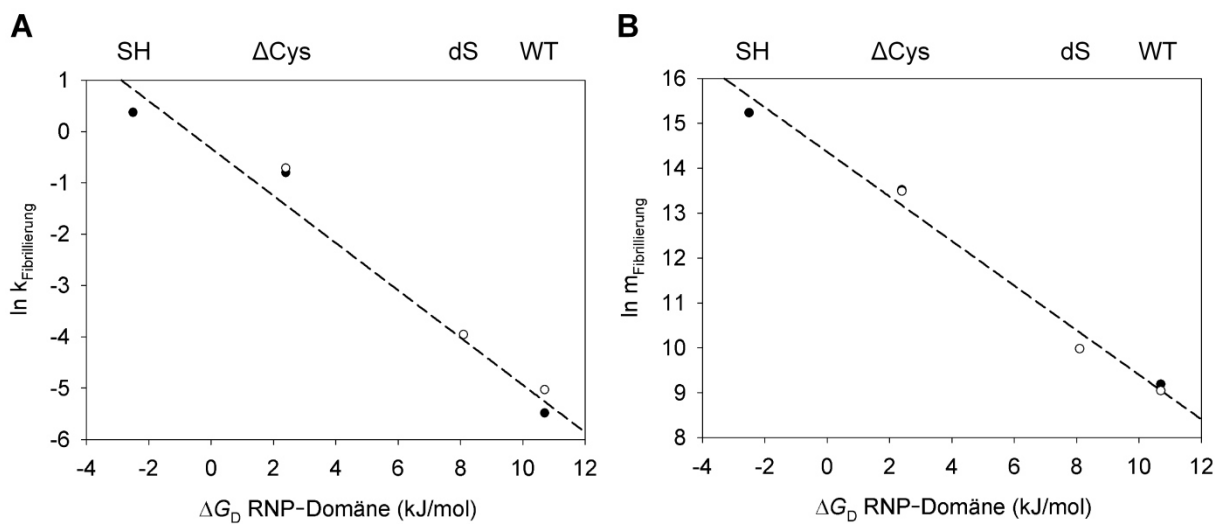


Abbildung 37: Analyse der Fibrillierungsgeschwindigkeit von Vollängen-PABPN1 in Abhängigkeit von der thermodynamischen Stabilität der RNP-Domäne. Die Geschwindigkeitskonstante der Fibrillierung (A) oder die initiale Fibrillierungsgeschwindigkeit (B) wurden gegen die Gibbs'sche freie Entfaltungsenthalpie  $\Delta G_D$  aufgetragen. Die Proteinvariante ist oberhalb der Diagramme angegeben. Eine gestrichelte Linie verdeutlicht den linearen Zusammenhang der dargestellten Werte.



## 4. Diskussion

### 4.1 Rückblick auf die Erforschung von OPMD

Eine große Anzahl an Studien zielte bereits darauf ab, einen Zusammenhang zwischen den pathologischen Symptomen der Okulopharyngealen Muskeldystrophie (OPMD) und der zu Grunde liegenden Expansion der N-terminalen Oligoalaninsequenz von PABPN1 herzustellen. Besonderes Interesse fiel dabei auf spezifische, intranukleäre, PABPN1 enthaltende Einschlüsse, welche in Muskelbiopsien von OPMD-Patienten nachgewiesen wurden [112]. Bei elektronenmikroskopischen Analysen wurde eine filamentartige Feinstruktur dieser Einschlüsse festgestellt [109, 110, 112]. Dies resultierte in der Fragestellung, ob die Einschlüsse fibrilläres PABPN1 enthalten würden. Die Ausbildung amyloider Fibrillen ist eng verbunden mit einer Vielzahl von Krankheiten, wie der Alzheimerschen und der Parkinsonschen Krankheit, Chorea Huntington oder Krankheiten der Gruppe *transmissible spongiform encephalopathies* [18, 19, 58, 193].

Anhand von *in vitro*-Studien konnte tatsächlich eine Fibrillenbildung von PABPN1 nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit der Symptomatik von OPMD, tritt eine Alanin-abhängige Fibrillierung der N-terminalen Domäne von PABPN1 auf [34, 35]. Die Fibrillen hatten ähnliche biochemische Eigenschaften wie sie bereits für amyloide Fibrillen beschrieben wurden: Eine hohe Resistenz gegenüber Proteolyse oder der Solubilisierung mit denaturierenden Chemikalien und ein erhöhter Anteil  $\beta$ -Faltblattstruktur im Vergleich zum löslichen Protein. Überraschend wurde in späteren Arbeiten ausschließlich eine Alanin-unabhängige Fibrillenbildung von Vollängen-PABPN1 beobachtet. Für diesen Prozess ist jedoch der C-terminale Bereich des Proteins erforderlich [141]. Die Fibrillen des Gesamtlängenproteins hatten völlig andere biochemischen Eigenschaften als jene der N-terminalen Domäne. Eine weitaus geringere Resistenz gegenüber chemischer Solubilisierung oder proteolytischem Abbau deutete auf eine andere molekulare Struktur hin [87, 141].

Um das Verständnis der Fibrillenbildung von PABPN1 zu erweitern, wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene experimentelle Ansätze verfolgt. Einerseits sollte mittels eines Zellkulturmodells eine *in vivo*-Fibrillierung von PABPN1 überprüft werden. Außerdem sollte anhand von gezielten Aminosäureaustauschen der Beitrag der RNP-Domäne an der Umlagerung des Gesamtlängenproteins zu Fibrillen näher untersucht werden.

## 4.2 Untersuchung von OPMD in Zellkultur- und Tiermodellen

### 4.2.1 Hinweise auf PABPN1-Ablagerungen in OPMD-Zellkulturmodellen

Um die Fibrillenbildung von PABPN1 unter physiologischen Bedingungen besser zu verstehen, sollte im ersten Teil dieser Arbeit ein Zellkulturmodell eingesetzt werden. Eine biophysikalische Charakterisierung *in vivo* gebildeter Fibrillen könnte zum Verständnis der Einschlüsse beitragen, welche in OPMD-Patienten detektiert wurden. In stabil transfizierten HEK293-Zellen wurden drei PABPN1-Varianten produziert, welche sich hinsichtlich der N-terminalen Oligoalaninsequenz unterschieden. An die Proteine war ein C-terminaler Twin-Strep-Tag<sup>®</sup> fusioniert, um eine Isolierung der Fibrillen zu ermöglichen (+7Ala-,  $\Delta$ Ala- und WT-PABPN1-Strep). Dieser *tag* war bereits erfolgreich bei der Isolierung anderer hochmolekularer Proteinkomplexe zum Einsatz gekommen [194]. In Zellkulturmodellen anderer Forschungsgruppen wurden Strukturen identifiziert, von denen vermutet wurde, sie könnten PABPN1-Ablagerungen darstellen [113, 114, 130]. Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen konnten in einem A549tTA-Lungenkarzinom-Zellkulturmodell bei der Expression von Alanin-expandiertem PABPN1 Einschlüsse aus filamentartigen und partikelförmigen Strukturen entdeckt werden [136]. Ähnliche Einschlüsse wurden in transgenen Mäusen beobachtet, welche Alanin-expandiertes PABPN1 exprimierten [131, 132]. Anhand dieser Ergebnisse wurde geschlossen, dass sich in Zellkulturmodellen vergleichbare PABPN1-Ablagerungen bilden können, wie sie in OPMD-Patienten beobachtet wurden.

### 4.2.2 Zusammenhang der Alaninexpansion und PABPN1-Ablagerungen

Im Gegensatz zu den mit +7Ala-PABPN1 stabil transfizierten HEK293-Zellen, waren bei den mit  $\Delta$ Ala- und WT-PABPN1-Strep transfizierten Zellen keine Strukturen zu beobachten, welche auf PABPN1-Ablagerungen schließen ließen. Die in der Literatur beschriebenen Zellkulturmodelle erzielten kontroverse Ergebnisse hinsichtlich der Abhängigkeit der Bildung von PABPN1-Ablagerungen von der Oligoalaninsequenz. Ein Teil der Studien stellte eine Alanin-abhängige Bildung von Einschlüssen im Zellkern fest [130, 134, 138]. Andere Ergebnisse wiederum sprechen für ein Alanin-unabhängiges Auftreten von Einschlüssen im Zellkern [122, 135-137]. Auch bei Maus-Modellen für OPMD konnten muskuläre Defizite und Ablagerungen durch die Expression von Alanin-expandiertem PABPN1 gefunden werden [131, 132, 195]. In einer weiteren Studie wurden jedoch Einschlüsse in neuronalem Gewebe transgener Mäuse gefunden, welche das Wildtyp-Protein oder Alanin-expandiertes PABPN1 exprimierten [196]. Dies stimmt mit dem überraschenden Fund intranukleärer Ablagerungen von PABPN1 in gesunden, nicht transgenen *Sprague-Dawley*-Mäusen überein [197]. Für die Muskeldegeneration in einem *Drosophila melanogaster*-OPMD-Modell war die Alanin-

expansion nicht absolut erforderlich. Die Defekte nahmen jedoch mit gesteigerter Länge der Alaninsequenz zu [142].

Die Bildung von PABPN1-Einschlüssen wird durch ein hohes Expressionsniveau verstärkt, wie andere Arbeitsgruppen gezeigt haben. Bei transienter Transfektion mit niedrigen DNA-Konzentrationen waren signifikant mehr intranukleärer Einschlüsse des Alanin-expandierten PABPN1 im Vergleich zum Wildtyp nachweisbar. Erhöhte DNA-Konzentrationen bewirkten eine vergleichbare Bildung von Einschlüssen durch Wildtyp- und Alanin-expandiertes PABPN1 [113]. Eine weitere Studie deutete darauf hin, dass eine Überexpression allein genügt, um eine Bildung von Ablagerung in Zellkulturmodellen auch ohne Expansion der Oligoalaninsequenz von PABPN1 herbeizuführen [136]. Im vorliegenden HEK293-Zellkulturmodell wurden bei der Selektion stabil transfizierter Zellen Klone gewählt, welche trotz einer möglichst hohen Anzahl PABPN1-Strep positiver Einzelzellen, im Western-Blot vergleichbare Expressionsbanden von PABPN1-Strep und endogenem PABPN1 aufwiesen. Jedoch könnte ein zu geringes Expressionsniveau im HEK293-Zellkulturmodell dazu führen, dass sich keine nachweisbaren Mengen an PABPN1-Ablagerungen bildeten.

#### **4.2.3 PABPN1-Ablagerungen in Zellkultur- und Tiermodellen**

Die Bereiche erhöhter PABPN1-Konzentration, welche im HEK293-Zellenkulturmodell bei stabiler Transfektion mit +7Ala-PABPN1-Strep gefunden wurden, ähnelten in der Literatur beschriebenen PABPN1-Ablagerungen. Darum sollte geklärt werden, ob PABPN1-Strep in den Zellen als Fibrillen vorliegt. Dazu wurde das Protein nach einem Aufschluss stabil transfizierter HEK293-Zellen durch Bindung an Strep-Tactin<sup>®</sup> Material isoliert. In den PABPN1-Strep-Präparationen wurden jedoch keine Hinweise auf Fibrillen gefunden (Kapitel 3.1.5). Für einen Vergleich der löslichen oder unlöslichen Anteile von PABPN1-Strep wurden die Zellen einem Löslichkeitstest unterzogen. In der Literatur war krankheitsassoziiertes PABPN1 mit 17 Alaninen im Vergleich zum Wildtyp-Protein mit 10 Alaninen zu deutlich höheren Anteilen in der unlöslichen Fraktion zu finden [114, 175]. Im HEK293-Zellkulturmodell waren die PABPN1-Strep-Varianten überwiegend in der löslichen Fraktion zu finden. Weder hinsichtlich der Varianten mit unterschiedlich langen N-terminalen Alaninsequenzen, noch im Vergleich mit dem endogenen PABPN1 untransfizierter HEK293-Zellen waren deutliche Unterschiede in der Verteilung zwischen löslicher und unlöslicher Fraktion ersichtlich. Eine mögliche Erklärung wäre, dass es sich bei den beobachteten Bereichen höherer +7Ala-PABPN1-Strep-Konzentration im Zellkern nicht um Ablagerungen handelte, wie sie in der Literatur beschrieben wurden.

Bisher ist wenig über die biochemischen Eigenschaften der PABPN1-Einschlüsse in Zellkultur bekannt. Einige Publikationen beschreiben eine hohe Resistenz der in Muskelbiopsien von OPMD-Patienten oder in OPMD-Zellkulturmodellen gefundenen Einschlüsse von Alanin-expandiertem PABPN1 gegenüber der Extraktion mit 0,5 M bis 1,5 M KCl. Demgegenüber wurden Anreicherungen von Wildtyp-PABPN1 durch diese Methode beseitigt [112, 133, 138-140]. Bei der Auftrennung durch SDS-PAGE wurden hochmolekulare Aggregate von Alanin-expandiertem PABPN1 im Sammelgel beobachtet [133, 140]. Dies spricht für deren hohe Stabilität gegenüber Denaturierung durch Detergenzien. In dieser Arbeit war bei der Analyse der *in vitro* produzierten Fibrillen durch limitierte Proteolyse und anschließendem Western-Blot ebenso ein Schmier im Sammelgel zu erkennen. Jedoch war dies nicht bei der Analyse von PABPN1-Strep aus stabil transfizierten HEK293-Zellen der Fall.

Trotz der erhöhten Stabilität beschrieben einige Arbeiten eine hohe Dynamik der PABPN1-Ablagerungen. Während der Mitose in Zellkulturmodellen wurde ein fast vollständiges Auflösen der Einschlüsse beobachtet. In den Tochterzellen bildeten sich zunächst wieder *nuclear speckles*. Diese Strukturen enthalten neben Poly(A)-RNA, *splicing* snRNPs (*small nuclear ribonucleoprotein particles*) und anderen Faktoren, die an der Prozessierung von pre-mRNA beteiligt sind, leicht erhöhte Konzentrationen an PABPN1 [171, 172, 198, 199]. In der Peripherie der *nuclear speckles* entstanden anschließend PABPN1-Ablagerungen [137, 172]. Auch die PABPN1-Ablagerungen in den Neuronen nicht transgener *Sprague-Dawley*-Mäuse waren dynamisch und traten verstärkt auf, wenn die Biosynthese von Oxytocin herunterreguliert war [197]. Experimente mittels *Photobleaching* kamen zu dem Ergebnis, dass die Akkumulation von PABPN1 in Ablagerungen nicht irreversibel ist, sondern einem dynamischen Austausch mit Molekülen im umgebenden Kernplasma unterliegt [135]. Diese dynamischen Eigenschaften könnten der Grund sein, weshalb keine Isolierung von fibrillärem PABPN1 möglich war.

Aus diesem Grund wurde die Stabilität von PABPN1-Strep-Fibrillen unter den Bedingungen des Zellaufschlusses überprüft. Die *in vitro* erzeugten PABPN1-Strep-Fibrillen blieben auch nach zweistündiger Inkubation in RIPA-Puffer stabil. Auch ist aus Vorarbeiten bekannt, dass PABPN1-Strep-Fibrillen erst durch etwa 2 M Guanidiniumchlorid solubilisiert werden [169]. Ob diese Ergebnisse auch auf *in vivo* gebildete Ablagerungen anwendbar sind, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen. Unter Berücksichtigung der oben beschriebenen Dynamik der in Zellkulturen analysierten Ablagerungen wäre es möglich, dass *in vivo* gebildete Einschlüsse in RIPA-Puffer nicht ausreichend stabil sind oder ein Gleichgewicht zwischen monomerem und fibrillärem Protein zugunsten des Monomers verschoben wird. Dies würde die Isolierung von fibrillärem PABPN1-Strep deutlich erschweren.

#### 4.2.4 Einfluss anderer Proteine auf die Fibrillierung von PABPN1

Weder bei der limitierten Proteolyse des isolierten PABPN1-Strep noch bei der Untersuchung des löslichen und unlöslichen Anteils von PABPN1-Strep in stabil transfizierten HEK293-Zellen wurden Hinweise auf die Bildung fibrillärer Strukturen oder gesteigerter unlöslicher Anteile an PABPN1-Strep gefunden. Um die Frage zu klären, ob andere im Zellkern vorhandene Proteine die *in vitro* beobachtete Fibrillierung von PABPN1-Strep stören könnten, wurde ein Fibrillierungsexperiment in Gegenwart von Zellkernextrakt durchgeführt. Dabei war kein Einfluss des Zellkernextrakts auf die Fibrillierung von PABPN1-Strep festzustellen. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass bei diesem Versuch keine physiologischen Bedingungen vorliegen. Die eingesetzte Proteinkonzentration von 2,2 mg/ml PABPN1-Strep und 0,5 mg/ml Zellkernextrakt ist nicht mit den physiologischen Bedingungen im Zellkern vergleichbar. Die Proteinkonzentration in der Zelle liegt mit ca. 200 mg/ml wesentlich höher [3]. Höhere Konzentrationen an Zellkernextrakt könnten einen Einfluss auf die Fibrillenbildung *in vitro* ausüben. Außerdem enthält der PABPN1-Fibrillierungspuffer 1,5 M KCl und 10 % Glycerol, um ionische und hydrophobe Wechselwirkungen zu vermindern [191]. Diese Bedingungen sind notwendig, um eine amorphe Aggregation von PABPN1 zu unterdrücken. Die Substanzen stören jedoch vermutlich auch eine Interaktion mit Proteinen des Zellkernextrakts, welche Einfluss auf die Fibrillierung haben könnten. Unter den physiologischen Bedingungen im Zellkern könnten auch lokale Konzentrations-effekte eine Rolle spielen.

Verschiedene, in der Literatur beschriebene Zellkulturmodelle untersuchten *in vivo* den Einfluss anderer Proteine auf die Bildung von PABPN1-Ablagerungen. Bestandteile des Ubiquitin-Proteasom-Systems und Hitzeschockproteine wurden in den Einschlüssen von PABPN1 nachgewiesen [112-114]. Dies könnte darauf hindeuten, dass PABPN1 von den Zellen als fehlgefaltet erkannt wird [113]. Einige Studien untermauern diese Hypothese. Die Koexpression von Hitzeschockproteinen wie humanem HDJ-1 und Hsp70 sowie Hsp104 aus Hefe und dem künstlichen Minichaperon MC7 reduzierte die Aggregatbildung und das Absterben von Zellen in einem OPMD-Zellkulturmodell [113, 200]. In einem HeLa-Zellkulturmodell bewirkte die Zugabe von 8-Hydroxyquinolin, Zinksulfat, Ibuprofen, und Indomethacin eine verstärkte Produktion der Hitzeschockproteine Hsp27, Hsp40, Hsp70 und Hsp105 sowie deren Translokation in den Zellkern. Dadurch verringerte sich die Bildung von Aggregaten und das Absterben von Zellen, welche mit Alanin-expandiertem PABPN1 transfiziert waren [173, 201]. Diese Studien belegen einen Einfluss zellulärer Protein auf die Bildung von PABPN1-Ablagerungen.

#### 4.2.5 Einfluss der Zelllinie und Fusionspartner auf die PABPN1-Fibrillierung

Da im HEK293-Zellkulturmodell keine PABPN1-Strep-Fibrillen detektiert wurden, stellt sich die Frage, ob die verwendete Zelllinie für die Untersuchungen ungeeignet war. Die typischen Ablagerungen von PABPN1 sind überwiegend in Muskelgewebe von OPMD-Patienten zu finden. In der Literatur ist jedoch eine große Bandbreite verschiedener Zellkulturlinien bekannt, welche als OPMD-Modellsysteme eingesetzt wurden und PABPN1-Ablagerungen aufwiesen (siehe Tabelle 25). Ein Vergleich zur Ausbildung von Ablagerungen zeigte zwischen C2C12-Mäusemuskelzellen und HeLa-Zellen keine signifikanten Unterschiede [175]. Einschlüsse wurden in einer vergleichenden Studie sowohl in HeLa- als auch COS-7-Zellen gefunden [114]. Außerdem wurden auch im Hirngewebe nicht transgener Mäuse und von OPMD-Patienten Einschlüsse gefunden [196, 197]. Diese Literaturdaten deuten darauf hin, dass ein Auftreten von PABPN1-Einschlüssen nicht nur in Muskelzellen erfolgen kann. Folglich spricht nichts gegen einen Einsatz von HEK293-Zellen zur Untersuchung einer *in vivo*-Fibrillenbildung von PABPN1.

Zelllinie	Herkunft	Konstrukt	Referenz
COS-7	Fibroblasten (Nierengewebe Affe)	PABPN1-EGFP	[130]
COS-7	s.o.	GFP-PABPN1	[133] [114]
COS-7	s.o.	EGFP-PABPN1	[113]
HeLa	Zervixkarzinom (Mensch)	GFP-PABPN1	[134] [139] [199]
HeLa	s.o.	PABPN1-GFP	[173]
A549tTA	Lungenkarzinom (Mensch)	GFP-PABPN1	[136]
C2C12	Myoblasten (Maus)	YFP-PABPN1	[202]
IM2	Myoblasten (Maus)	PABPN1-FLAG	[140]
U2OS	Osteosarkom (Mensch)	YFP-PABPN1	[172]
7304	Myoblasten (Mensch)	CFP-PABPN1	[203]

Tabelle 25: Übersicht ausgewählter OPMD-Zellkulturmodelle.

Neben der verwendeten Zelllinie könnte auch die Fusion mit *tags* oder anderen Proteinen Einfluss auf die Fibrillierung von PABPN1 haben. In den meisten bisherigen Studien anderer Arbeitsgruppen wurden PABPN1-Fusionen mit GFP oder dessen Derivaten verwendet (Tabelle 25). Die typischen Fluoreszenzeigenschaften von GFP sind nur bei gefaltetem, löslichem Protein detektierbar, während falschgefaltetes, in *inclusion bodies* abgelagertes Protein kaum Fluoreszenz zeigt [204, 205]. Somit muss zumindest der GFP-Anteil der PABPN1-GFP-Fusionen nativ vorliegen. Daher bleibt fraglich, ob es sich bei den Ablagerungen, welche in den OPMD-Zellkulturmodellen anderer Arbeitsgruppen beobachtet wurden, tatsächlich um stabile Strukturen handelte, welche isoliert werden könnten. Außerdem neigt GFP bei höheren Konzentrationen zur Dimerisierung [206]. Dies könnte zu einer verstärkten Bildung von Ablagerungen der Fusionsproteine führen. Die vergleichenden *in vitro*-Studien zwischen authentischem PABPN1 und PABPN1-Strep belegen hingegen, dass der C-terminale Twin-Strep-Tag® außer einer leicht beschleunigten Fibrillenbildung keinen Einfluss auf die Struktur oder biologische Funktion von PABPN1 hat (Kapitel 3.1.1). Der Twin-Strep-Tag® sollte folglich für eine Untersuchung der PABPN1-Fibrillenbildung *in vivo* geeignet sein.

#### **4.2.6 Theorien zu den Ursachen von OPMD**

Im verwendeten HEK293-Zellkulturmodell wurden nur bei Aufnahmen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie Hinweise auf mögliche PABPN1-Strep-Ablagerungen erhalten. Isoliertes +7Ala-PABPN1-Strep zeigte keine fibrillären Eigenschaften. Letztlich ist jedoch nicht geklärt, ob die gebildeten Proteinablagerungen tatsächlich verantwortlich für die Symptome von OPMD sind. Bei verschiedenen Proteinfibrillierungskrankheiten gibt es Hinweise auf einen toxischen Effekt der monomeren Proteine oder oligomerer Vorstufen von Fibrillen [20, 21]. Die Lokalisation von Glutamin-expandiertem Huntingtin in Ablagerungen scheint eine protektive Funktion zu haben. Neurone, welche Einschlüsse aufwiesen, zeigten eine erhöhte Überlebensdauer. Demgegenüber wirkten monomeres Protein oder lösliche Oligomere cytotoxisch [207, 208]. Auch der Ablagerung von Alanin-expandiertem PABPN1 in nukleären Einschlüssen könnte eine protektive Funktion zukommen. Ein erhöhter Anteil an löslichem Protein korrelierte mit dem Absterben von Zellen [139]. Auch das Auftreten von dynamischen PABPN1-Filamenten in gesunden, nicht transgenen Mäusen wirft die Frage auf, ob diese Einschlüsse tatsächlich verantwortlich für die OPMD-Pathogenese sind [197].

Dennoch gibt es auch zahlreiche Hinweise, welche einen schädlichen Einfluss der Ablagerungen von PABPN1 im Zellkern andeuten. Das Auftreten von nukleären Einschlüssen sowie das Absterben von Zellen wurde in Zellkulturmodellen auf die Überexpression von

Alanin-expandiertem PABPN1 zurückgeführt [113, 114, 133]. Das Auslösen eines Zelltodes könnte auch für die zurückgehende Expression von +7Ala-PABPN1-Strep in stabil transfizierten HEK293-Zellen nach einer Kultivierungszeit von 34 Tagen verantwortlich sein. Nach einer gewissen Zeit könnten in der Zellpopulation nur Zellen überleben, welche PABPN1 in geringerem Ausmaß exprimieren. Transkriptom-Analysen in OPMD-Maus- und Zellkulturmodellsystemen belegen eine Herunterregulierung der PABPN1-Expression sowie die Deregulation weiterer Genen, welche hauptsächlich in der mRNA-Prozessierung, der Zellzyklus-Regulation, dem Nukleinsäure-Metabolismus sowie der Funktion des Ubiquitin-Proteasom-Systems und der Mitochondrien eine Rolle spielen [136, 195, 203]. Ähnliche Veränderungen des Transkriptoms treten während des normalen muskulären Alterungsprozesses auf. Die verfrühte Alterung der Muskulatur könnte die OPMD-typischen Muskelschwäche-Symptome auslösen [203].

In den OPMD-typischen Ablagerungen wurden neben PABPN1 zahlreiche weitere zelluläre Komponenten gefunden wie mRNA, proteasomale Untereinheiten, Ubiquitin, molekulare Chaperone sowie *splicing*- und Transkriptions-Faktoren [112, 113, 136, 138, 209]. Die Kolokalisation und Bindung dieser Komponenten in Ablagerungen könnte dazu führen, dass sie zur Erfüllung ihrer physiologischen Funktionen fehlen, wodurch es zur Störung zellulärer Prozesse kommen könnte [112, 136, 138]. Beispielsweise wurde gezeigt, dass eine Deregulation des Systems molekularer Chaperone muskuläre Defekte auslösen kann [210, 211].

Zusammenfassend konnte trotz zahlreicher Studien noch nicht endgültig belegt werden, welche Rolle die PABPN1-Ablagerungen bei der OPMD-Pathogenese spielen und welcher Zusammenhang mit der Expansion des N-terminalen Alaninsegments besteht. Obwohl nach Transfektion mit +7Ala-PABPN1-Strep im Vergleich zu  $\Delta$ Ala- PABPN1-Strep und WT-PABPN1-Strep Bereiche deutlich erhöhter PABPN1-Konzentration im Zellkern zu beobachten waren, konnte kein fibrilläres Material isoliert werden. Entweder haben diese Ablagerungen keine mit *in vitro* erzeugten Fibrillen vergleichbaren Eigenschaften oder die Menge an vorhandenen Fibrillen war für einen biochemischen Nachweis zu gering.



## 4.3 Die Rolle der RNP-Domäne bei der Fibrillenbildung von PABPN1

### 4.3.1 Hinweise zur Bedeutung der RNP-Domäne bei der PABPN1-Fibrillierung

Bisher war nur sehr wenig über die Rolle der RNP-Domäne bei der Fibrillenbildung von PABPN1 bekannt. Einige Studien deuten jedoch auf einen Einfluss der RNP-Domäne bei der Fibrillierung hin. Bei *in vivo*-Interaktionsstudien wurden Abschnitte identifiziert, welche für die Selbstassoziation von PABPN1 essentiell sind. Einer davon umfasst die Aminosäuren 155-294 und damit die gesamte RNP-Domäne [133]. Ein zweifacher Aminosäureaustausch (Y175A/F215A) in der RNP-Domäne senkte die Bindungsaffinität von PABPN1 zu Polyadenylat-RNA und verhinderte *in vivo* eine Bildung von PABPN1-Ablagerungen [125, 135, 142]. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Rolle der RNP-Domäne bei der Fibrillierung genauer untersucht werden. Durch kovalentes Verbinden der Sekundärstrukturelemente Helix- $\alpha$ 1 und Strang- $\beta$ 2 mit einer Disulfidbrücke wurde die Hypothese getestet, ob ein *domain swapping*-Prozess in der RNP-Domäne während der Fibrillierung von PABPN1 stattfindet. In vergleichenden Experimenten wurde die Fibrillierung des Wildtyp-Proteins (WT-PABPN1), der Cystein-freien Variante  $\Delta$ Cys-PABPN1, der disulfidverbrückten Variante dS-PABPN1 und der entsprechenden reduzierte Variante SH-PABPN1 untersucht. Volllängen-PABPN1 ist aufgrund amorpher Aggregation während der Entfaltung für eine thermodynamische Charakterisierung ungeeignet [34]. Darum wurden die Varianten zunächst durch biophysikalische Charakterisierung der entsprechenden isolierten RNP-Domänen (Aminosäuren 167-254) WT-RNP,  $\Delta$ Cys-RNP, dS-RNP und SH-RNP analysiert.

### 4.3.2 Stabilisierung der RNP-Domäne durch eine künstliche Disulfidbrücke

Bei den vier untersuchten RNP-Domäne-Varianten handelte es sich um monomere, gefaltete Proteine. Dies stimmt mit früheren Untersuchungen eines anderen RNP-Domäne-Konstrukts überein (Aminosäuren 161-263; [34]). Hinsichtlich der thermodynamischen Stabilität wurden deutliche Unterschiede zwischen den vier Varianten festgestellt. Die Cystein-freie Variante  $\Delta$ Cys-RNP ( $\Delta G_D = 2,4 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) war gegenüber WT-RNP ( $\Delta G_D = 10,7 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) deutlich destabilisiert. Die Disulfidbrücke von dS-RNP ( $\Delta G_D = 8,1 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) kompensierte offensichtlich den Stabilitätsverlust, welcher durch den Austausch der Cystein-Reste gegen Serin-Reste auftrat. Noch deutlicher ersichtlich war der Stabilitätsunterschied im Vergleich zur reduzierten Variante SH-RNP. Die vollständige Reduktion der Disulfidbrücke bewirkte eine thermodynamische Begünstigung des entfalteten Zustands von SH-RNP, wie anhand der negativen Gibbs'schen freien Entfaltungsenthalpie ( $\Delta G_D = -2,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) zu erkennen war. Durch Temperatur-induzierte Entfaltungsübergänge wurden die unterschiedlichen Stabilitäten der RNP-Domäne-Varianten bestätigt.

Die Einführung künstlicher Disulfidbrücken ist eine geeignete Methode, die konformationelle Stabilität von Proteinen zu erhöhen [212]. Zahlreiche Proteine konnten durch diese Methode bereits stabilisiert werden, beispielsweise T4-Lysozym, RNase 1 oder RNase A [192, 213-215]. Die Auswirkung einer kovalenten Verbindung auf die konformationelle Stabilität eines Proteins kann mit Gleichung 32 vorhergesagt werden [189]. Grundlage ist die Destabilisierung des entfalteten Zustands des Proteins, da Disulfidbrücken oder chemisches *cross linking* von Aminosäure-Resten die konformationelle Entropie des entfalteten Zustands verringern [189, 216]. Durch die Einschränkung der Flexibilität des entfalteten Zustands, erhöht sich dessen freie Enthalpie. Die Folge ist eine größere Differenz der freien Enthalpien von entfaltetem und nativem Zustand. Dies resultiert in einer erhöhten thermodynamischen Stabilität in Form der Gibbs'schen freien Entfaltungsenthalpie  $\Delta G_D$  [217]. Der stabilisierende Beitrag einer Disulfidbrücke ist umso höher, je mehr Aminosäure-Reste zwischen den kovalent verbundenen Cystein-Resten liegen [189, 217].

Gleichung 32:  $\Delta S = -2.1 - (3/2) \cdot R \cdot \ln n$

R universelle Gaskonstante n Anzahl der Aminosäuren zwischen zwei kovalent verbundenen Cystein-Resten

Für die 16 Aminosäuren umschließende Disulfidbrücke von dS-RNP wurde bei einer Temperatur von 20 °C ein zusätzlicher, stabilisierender Beitrag von 12,7 kJ mol<sup>-1</sup> zur freien Entfaltungsenthalpie berechnet. Um dies mit den experimentellen Werten zu vergleichen, wurde die Differenz der freien Entfaltungsenthalpien ( $\Delta\Delta G$ ) von dS-RNP und der entsprechenden reduzierten Variante SH-RNP nach Gleichung 33 berechnet [192].

Gleichung 33:  $\Delta\Delta G = \Delta G_D(\text{dS-RNP}) - \Delta G_D(\text{SH-RNP})$

Die berechnete Differenz ist mit 10,6 kJ mol<sup>-1</sup> geringfügig kleiner als der theoretisch erwartete Wert. Jedoch belegt dies trotzdem die stabilisierende Wirkung der Disulfidbrücke in der RNP-Domäne. Der Grund für die Abweichung vom theoretischen Wert könnten konformationelle Spannungen (*conformational strain*) sein, welche die künstliche Disulfidbrücke in der Proteinstruktur auslöst [192].

### 4.3.3 Faltung der RNP-Domäne nach einem Zweizustandsmodell

$\Delta\text{Cys-RNP}$  und SH-RNP wiesen eine sehr geringe thermodynamische Stabilität auf. Zur vollständigen Charakterisierung des Faltungsweges dieser Varianten mussten hohe Konzentrationen Ammoniumsulfat zugesetzt werden, wie bei Hofmeister-Effekten zu erwarten war [183, 184, 218]. Dies kann jedoch zu einer unterschiedlichen Stabilisierung von nativen Spezies und möglichen Intermediaten führen [219, 220]. Daher wurde nur für WT-

RNP und dS-RNP untersucht, ob die Faltung und Entfaltung einem Zweizustandsmodell unterliegen. Dies würde bedeuten, dass nur der native und der denaturierte Zustand signifikant populiert sind und keine stabilen Intermediate vorliegen (Gleichung 34).

Gleichung 34:  $N \rightleftharpoons D$

N natives Protein

D denaturiertes Protein

Für das Postulat eines Zweizustandsmodells müssen folgende Voraussetzungen erfüllt sein [4, 161, 190]:

1. Die Daten der Gleichgewichtsentfaltung müssen einer „monophasischen“ Übergangskurve entsprechen. Außerdem muss ein simultanes Entfalten und Falten von Sekundär- und Tertiärstruktur stattfinden. Dies kann anhand übereinstimmender Werte der Übergangsmittelpunkte  $D_{1/2}$  und der Kooperativität  $m$  belegt werden, wenn mittels verschiedener spektroskopischer Methoden die Entfaltung und Faltung der Sekundär- und Tertiärstruktur untersucht wird.
2. Die aus Temperatur-induzierten Entfaltungsübergängen ermittelte Van't Hoff'sche Entfaltungsenthalpie  $\Delta H_m(\text{vH})$  muss mit der kalorimetrisch ermittelten Entfaltungsenthalpie  $\Delta H_m(\text{cal})$  übereinstimmen.
3. Die Auswertung von Experimenten unter Gleichgewichtsbedingungen und von kinetischen Experimenten muss identische Werte für die freie Entfaltungsenthalpie  $\Delta G_D$  und die Kooperativität  $m$  liefern.

#### Zu 1.:

Die RNP-Domäne enthält keine Tryptophan-Reste, sodass die Tyrosin-Reste das Fluoreszenzsignal bestimmen. Die anhand der Fluoreszenzintensität gemessenen Harnstoff-induzierten Entfaltungsübergänge deuten auf eine einphasige, kooperative Entfaltung der Tertiärstruktur ohne erkennbare Gleichgewichtsintermediate hin. Die Entfaltung der Sekundärstrukturen von WT-RNP und dS-RNP wurde mittels Harnstoff-induzierter Entfaltungsübergänge durch CD-Spektroskopie verfolgt. Hierbei wurden im Vergleich zur Fluoreszenzmessung  $D_{1/2}$ -Werte bei höheren Harnstoffkonzentrationen gemessen. Weiterhin wurde eine geringere Kooperativität  $m$  ermittelt. Dies deutete zunächst auf Faltungsintermediate hin. Ob die Tyrosin-Fluoreszenzintensität ein geeigneter Indikator für die Entfaltung der Tertiärstruktur der RNP-Domäne ist, wurde durch Harnstoff-induzierte Entfaltungsübergänge in Gegenwart von 0,1 M des Fluoreszenzquencher Acrylamid untersucht. Mit dieser Methode wurden zu niedrigeren Harnstoffkonzentrationen verschobene Übergangsmittelpunkte  $D_{1/2}$  und eine erhöhte Kooperativität  $m$  im Vergleich zu

den Fluoreszenzdaten in Abwesenheit von Acrylamid festgestellt. Die Gibbs'sche freie Entfaltungsenthalpie stimmte bei allen angewendeten Methoden überein. Die Verschiebung der Übergangsmittelpunkte und die Änderung der Kooperativität zwischen den drei Messmethoden könnte mit der Lage der Tyrosin-Reste an der Proteinoberfläche begründet werden (Abbildung 38). Aufgrund dieser Position kommt es vermutlich bereits bei geringen Harnstoffkonzentrationen zu einer geänderten Lösungsmittlexposition der Tyrosin-Reste, sodass deren Fluoreszenzintensität abnimmt. Dieser Effekt tritt in Gegenwart des Fluoreszenzquenchers Acrylamid nochmals deutlicher hervor.

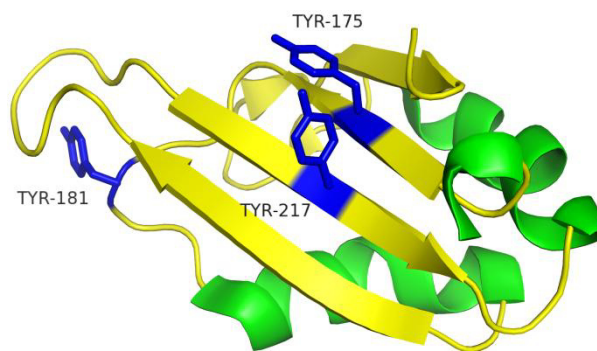


Abbildung 38: Schematische Darstellung der RNP-Domäne von PABPN1 basierend auf der Kristallstruktur.  $\alpha$ -Helices sind in Grün,  $\beta$ -Faltblätter und *loop*-Regionen in Gelb dargestellt. Tyrosin-Reste sind in Blau hervorgehoben und mit ihrer Positionsnummer versehen. Modifiziert nach [145]; PDB: 3B4D.

## Zu 2.:

Die Temperatur-induzierte Entfaltung der RNP-Domäne-Varianten wurde anhand der Sekundärstrukturänderung mittels des CD-Signals bei 208 nm untersucht. Aus den Entfaltungsübergängen wurden die Temperatur am Übergangsmittelpunkt  $T_m$  und die Van't Hoff'sche Entfaltungsenthalpie  $\Delta H_m(\text{vH})$  ermittelt. Die daraus berechneten Gibbs'schen freien Entfaltungsenthalpien  $\Delta G_D$  von WT-RNP,  $\Delta\text{Cys-RNP}$ , und dS-RNP stimmten mit den, anhand der Tyrosin-Fluoreszenz bestimmten  $\Delta G_D$ -Werten der Harnstoff-induzierten Entfaltungsübergänge überein. Dies gibt einen ersten Hinweis auf eine Überstimmung der mittels Fluoreszenz- und CD-Signale untersuchten Entfaltungsprozesse und deutet auf eine Zweizustandsfaltung hin.

Die Temperatur-induzierte Entfaltung von WT-RNP wurde auch mittels *differential scanning calorimetry* (DSC) untersucht. Die erhaltenen apparenten Parameter für  $T_m$  und  $\Delta H_m(\text{cal})$  stimmten gut mit den Werten der Temperatur-induzierten Entfaltungsübergänge überein. Dies spricht für eine Faltung von WT-RNP nach einem Zweizustandsmodell. Das Verhältnis von  $\Delta H_m(\text{vH})/\Delta H(\text{cal})$  betrug 1,08. Ein Wert größer 1 deutet auf einen Aggregationsprozess hin [4, 221]. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass die Temperatur-induzierte

Entfaltung der RNP-Domäne nicht vollständig reversibel war. Die, aus den kalorimetrisch bestimmten Parametern  $\Delta H_m(\text{cal})$  und  $T_m$  ermittelte, Gibbs'sche freie Entfaltungsenthalpie  $\Delta G_D$  entsprach auch dem  $\Delta G_D$ -Wert der Harnstoff-induzierten Entfaltungsübergänge.

### Zu 3.:

Durch Fluoreszenz- und CD-*stopped-flow*-Messungen wurden „monophasische“ Verläufe der Entfaltungs- und Rückfaltungskinetiken von WT-RNP und dS-RNP detektiert. Der linearen Verlauf der Faltungs- und Rückfaltungsäste der Chevron-Plots von WT-RNP und dS-RNP ließ auf eine Zweizustandsfaltung schließen [161]. Eine Krümmung oder „*rollover*“ der Faltungs- bzw. Entfaltungsäste würde hingegen auf das Vorliegen von Faltungsintermediaten hindeuten [4, 9, 222]. Die anhand von Fluoreszenz- oder CD-*stopped-flow*-Messungen ermittelten  $\Delta G_D$ - und  $m$ -Werte stimmten zwischen beiden Messmethoden überein. Dies spricht für eine simultane Entfaltung der Tertiär- und Sekundärstruktur. Weiterhin stimmen die kinetisch ermittelten  $\Delta G_D$ - und  $m$ -Werten mit jenen überein, welche bei Gleichgewichtsexperimenten ermittelt wurden. Die Übereinstimmung kinetischer Daten mit Gleichgewichtsdaten gilt als stärkster Beweis für eine vorliegende Zweizustandsfaltung von Proteinen [9, 161, 223].

#### **4.3.4 Fibrillierung in Abhängigkeit der thermodynamischen Stabilität**

Durch Temperatur-induzierte Denaturierung wurden die Stabilitätsunterschiede der RNP-Domäne-Varianten auch im Kontext der Vollängen-PABPN1-Varianten nachgewiesen. Die Fibrillierungskinetiken aller PABPN1-Varianten zeigten übereinstimmend mit früheren Studien einen hyperbolen Verlauf [141]. Dies deutet darauf hin, dass die Bildung eines Nukleationskeims nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Fibrillierung ist, wie es typisch für amyloide Fibrillen wäre [55, 57, 224]. Alle PABPN1-Varianten bildeten Fibrillen, welche morphologisch im Elektronenmikroskop und hinsichtlich ihrer Stabilität gegenüber der Solubilisierung mit Guanidiniumchlorid vergleichbar waren. Diese Daten ließen vermuten, dass sich unabhängig von der Disulfidbrücke Fibrillen mit ähnlicher Struktur bildeten. Die kovalente Verbindung von Helix- $\alpha 1$  und Strang- $\beta 2$  verzögerte jedoch die Fibrillierung von dS-PABPN1 deutlich gegenüber der reduzierten Variante SH-PABPN1. Wenn die künstliche Disulfidbrücke ein *domain swapping* verhindern würde, wäre vermutlich eine noch deutlichere Beeinträchtigung der Fibrillierung zu erwarten. Das *domain swapping* von zwei Prion-Protein-Monomeren und die damit verbundene Fibrillierung wurden durch die kovalente Verbindung von Sekundärstrukturelementen verhindert [147]. Zwei durch Disulfidbrücken stabilisierte Varianten des Proteins Cystatin C zeigten im Vergleich mit

Wildtyp-Cystatin C eine um 80 % verminderte Fibrillenbildung. Ein *domain swapping*-Prozess von PABPN1 kann anhand der vorliegenden Daten nicht jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Eine Beteiligung von Helix- $\alpha$ 1 und Strang- $\beta$ 2 an einem *domain swapping* bzw. deren Dissoziation währenddessen scheint aber eher unwahrscheinlich.

Durch Korrelation der Fibrillierungsgeschwindigkeit der Vollängen-PABPN1-Varianten mit der thermodynamischen Stabilität der entsprechenden RNP-Domäne-Variante wurde ein linearer Zusammenhang festgestellt. Eine geringere thermodynamische Stabilität der RNP-Domäne führte zu einer beschleunigten Fibrillierung von Vollängen-PABPN1. Da die thermodynamische Stabilität das Verhältnis von gefalteten und entfaltenen Proteinspezies im Gleichgewicht widerspiegelt (Kapitel 2.2.5.7, Gleichung 7 und 8), lässt dies vermuten, dass der Fibrillierung von PABPN1 eine (partielle) Entfaltung des Proteins als geschwindigkeitsbestimmender Schritt vorausgeht (Gleichung 35).

Gleichung 35:  $N \rightleftharpoons D \rightarrow F$

N	natives PABPN1	F	fibrilläres PABPN1
D	(partiell) entfaltetes PABPN1		

Zahlreiche Studien belegen, dass eine Fibrillierung von Proteinen sowohl von nativ-ähnlichen Konformationen, Faltungsintermediaten, als auch von hauptsächlich unstrukturierten Zuständen ausgehen kann [63, 77, 193, 225-229]. Proteine, deren konformationelle Stabilität durch chemische Substanzen oder destabilisierende Aminosäureaustausche gesenkt ist, zeigen eine hohe Neigung zur Fibrillierung [37, 230]. Der für PABPN1 nachgewiesene Einfluss der thermodynamischen Stabilität auf die Fibrillierung wurde auch bei Untersuchungen des Prion-Proteins deutlich. Beispielsweise resultierte die Reduktion der Disulfidbrücke des humanen Prion-Proteins oder der Austausch der Cystein-Reste gegen Alanin-Reste in zwei destabilisierten Varianten des Proteins, welche eine hohe Tendenz zur Oligomerisierung aufwiesen [231]. Der Austausch einer einzelnen Aminosäure führte zu einer deutlichen Stabilisierung des humanen Prion-Proteins und verzögerte dessen Fibrillierung. Transgene Mäuse, welche das mutierte Protein exprimierten, waren im Vergleich zu Mäusen, welche das Wildtyp-Protein exprimierten, weniger anfällig gegenüber einer Infektion durch den Kontakt mit krankheitsassoziiertem Prion-Protein [232]. Bei der Krankheit Leichtketten-Amyloidose begünstigen destabilisierende Aminosäuresubstitutionen in der variablen Region der leichten Kette ( $V_L$ ) die Aggregation entsprechender Immunglobuline [233]. *In vivo*- und *in vitro*-Studien zeigten, dass neben der Primärsequenz, die konformationelle Stabilität die Aggregation der SH3-Domäne von  $\alpha$ -Spektrin kontrolliert [234]. Eine Destabilisierung der B1-Domäne des IgG-Bindeproteins G durch Aminosäureaustausche oder bestimmte Pufferbedingungen führte zur Akkumulation von Faltungsintermediaten und begünstigte die

Fibrillierung des Proteins [220]. Zwei stabilisierende Mutationen verhinderten die Fibrillenbildung des Kälteschockproteins CspB mit einer N-terminal fusionierten Oligoalaninsequenz [235].

Ob eine isolierte Entfaltung der RNP-Domäne im Kontext des Vollängen-PABPN1 stattfinden kann oder ob es zu einer Entfaltung weiterer Segmente von PABPN1 kommt, konnte nicht geklärt werden. Die isolierte RNP-Domäne bildete im Gegensatz zu Vollängen-PABPN1 keine Fibrillen. Unter verschiedenen Inkubationsbedingungen wurde hauptsächlich die Bildung amorpher Aggregate festgestellt (Till Scheuermann, unveröffentlichte Ergebnisse). Dies bestätigt bisherige Ergebnisse, dass weitere Abschnitte von PABPN1 notwendig sind, damit sich das (partiell) entfaltete Protein zu Fibrillen umlagern kann. Beispielsweise belegten zahlreiche Studien eine Beteiligung des C-terminalen Bereichs bei der Selbstassoziation oder Fibrillenbildung von PABPN1 [133, 135, 141, 236]. Die Beteiligung mehrerer Abschnitte eines Proteins bei der Fibrillenbildung konnte bereits für andere krankheitsassoziierte Proteine gezeigt werden. Neben der Polyglutaminsequenz tragen weitere strukturelle Bereiche zur Fibrillierung von Huntingtin und Ataxin-1 bei [237, 238]. Detaillierte Studien zeigten, dass der Fibrillierungsmechanismus von Ataxin-3 nach einem Zweistufen-Mechanismus erfolgt [239, 240]. Der erste Schritt wird durch die thermodynamische Stabilität der sogenannten Josephin-Domäne kontrolliert. Der zweite Schritt setzt eine expandierte Polyglutaminsequenz voraus und führt zur Bildung SDS-unlöslicher Fibrillen [241].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die thermodynamische Stabilität der RNP-Domäne einen entscheidenden Einfluss bei der Fibrillenbildung von PABPN1 hat. Inwiefern die Stabilität bei der Bildung der PABPN1-Ablagerungen *in vivo* eine Rolle spielt und ob ein Zusammenhang mit der Expansion der Alaninsequenz besteht, ist ein Ansatzpunkt für zukünftige Studien. Einen wichtigen Beitrag hierbei könnte die Aufklärung der vollständigen Proteinstruktur liefern.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

### 5.1 Etablierung eines OPMD-Zellkulturmodells in HEK293-Zellen

Die Varianten +7Ala-PABPN1-Strep,  $\Delta$ Ala-PABPN1-Strep und WT-PABPN1-Strep wurden als OPMD-Modellsystem in HEK293-Zellen exprimiert, um eine PABPN1-Fibrillenbildung *in vivo* zu studieren.

- Ein C-terminaler Twin-Strep-Tag<sup>®</sup> hat keinen Einfluss auf die Struktur und biologische Funktion von PABPN1.
- Eine Isolierung *in vitro* erzeugter PABPN1-Strep-Fibrillen aus HEK293-Zelllysat ist möglich.
- 5 % der mit +7Ala-PABPN1-Strep transfizierten HEK293-Zellen zeigen Bereiche mit erhöhter Ansammlungen des rekombinanten Proteins.
- Aus HEK293-Zellen isoliertes +7Ala-PABPN1-Strep enthält keine Fibrillen.
- Zwischen den PABPN1-Strep-Varianten und im Vergleich zu endogenem PABPN1 der HEK293-Zellen lassen sich keine Löslichkeitsunterschiede feststellen.
- Die Gegenwart von Zellkernextrakt hat keinen Einfluss auf die *in vitro*-Fibrillenbildung der PABPN1-Strep-Varianten.

### 5.2 Die Rolle der RNP-Domäne bei der Fibrillenbildung von PABPN1

Die Rolle der RNP-Domäne bei der Fibrillierung von PABPN1 wurde durch das Einfügen einer künstlichen Disulfidbrücke untersucht. Analysiert wurden der Wildtyp (WT-), eine Cystein-freie Variante ( $\Delta$ Cys-); eine disulfidverbrückte Varianten (dS-) und die entsprechende vollständig reduzierte Variante (SH-) als Vollängen-PABPN1 und isolierte RNP-Domäne.

- Die zu untersuchenden RNP-Domäne- und PABPN1-Varianten konnten rekombinant in *E. coli* produziert und bis zur Homogenität gereinigt werden.
- Der Austausch der Serin-Reste 195 und 205 gegen Cystein-Reste hat eine deutliche Destabilisierung der RNP-Domäne zur Folge.
- Eine Disulfidbrücke an Position 185/201 bewirkt eine Stabilisierung der RNP-Domäne.
- Die Stabilität der RNP-Domäne beeinflusst die Stabilität von Vollängen-PABPN1.
- Eine geringere thermodynamische Stabilität der RNP-Domäne führte zu einer beschleunigten Fibrillierung von Vollängen-PABPN1.

Die Erkenntnis, dass eine Stabilisierung der RNP-Domäne die Fibrillenbildung von PABPN1 verzögert, könnte die Grundlagen für einen Therapieansatz liefern. Durch *screening*-Studien könnten Substanzen identifiziert werden, welche PABPN1 stabilisieren und als OPMD-Therapeutika angewendet werden können. Ein Einfügen weiterer Mutationen könnte PABPN1 soweit stabilisieren, sodass keine Alanin-unabhängige Fibrillierung mehr eintritt. Möglicherweise könnte auf diese Weise eine Alanin-abhängige Fibrillenbildung im Kontext des Vollängen-Proteins nachweisbar und somit untersuchbar werden.



## 6. Literaturverzeichnis

- [1] Dobson, C. M. (2004) Experimental investigation of protein folding and misfolding. *Methods*, 34, 4-14.
- [2] Dobson, C. M. (1999) Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem.Sci.*, 24, 329-332.
- [3] Papsdorf, K., and Richter, K. (2014) Protein folding, misfolding and quality control: the role of molecular chaperones. In *Amyloids in Health and Disease* (Perrett, S., Ed.), 53-68.
- [4] Fersht, A. R. (1999) Structure and mechanism in protein science. A guide to enzyme catalysis and protein folding. W.H. Freeman and Company, New York, Houndmills, Basingstroke.
- [5] Anfinsen, C. B. (1973) Principles that govern folding of protein chains. *Science*, 181, 223-230.
- [6] Wetlaufer, D. B. (1973) Nucleation, rapid folding, and globular intrachain regions in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70, 697-701.
- [7] Baker, D., and Agard, D. A. (1994) Kinetics versus thermodynamics in protein folding. *Biochemistry*, 33, 7505-7509.
- [8] Levinthal, C. (1968) Are there pathways for protein folding. *Journal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique*, 65, 44-45.
- [9] Bieri, O., and Kiefhaber, T. (2000) Kinetic models in protein folding. In *Mechanisms of Protein Folding* (Pain, R. H., Ed.), 34-64. Frontiers in Molecular Biology. Oxford University, Oxford.
- [10] Onuchic, J. N., and Wolynes, P. G. (2004) Theory of protein folding. *Current Opinion in Structural Biology*, 14, 70-75.
- [11] Jackson, S. E. (1998) How do small single-domain proteins fold?, *Folding & Design*, 3, R81-R91.
- [12] Dobson, C. M. (2001) The structural basis of protein folding and its links with human disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 356, 133-145.
- [13] Calamai, M., Taddei, N., Stefani, M., Ramponi, G., and Chiti, F. (2003) Relative influence of hydrophobicity and net charge in the aggregation of two homologous proteins. *Biochemistry*, 42, 15078-15083.
- [14] Chiti, F., Stefani, M., Taddei, N., Ramponi, G., and Dobson, C. M. (2003) Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates. *Nature*, 424, 805-808.
- [15] Vabulas, R. M., Raychaudhuri, S., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F. U. (2010) Protein Folding in the Cytoplasm and the Heat Shock Response. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2.
- [16] Herczenik, E., and Gebbink, M. F. B. G. (2008) Molecular and cellular aspects of protein misfolding and disease. *Faseb Journal*, 22, 2115-2133.
- [17] Pepys, M. B. (2006) Amyloidosis. In *Annual Review of Medicine*, 223-241.
- [18] Chiti, F., and Dobson, C. M. (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. In *Annual Review of Biochemistry*, 333-366.
- [19] Blancas-Mejia, L. M., and Ramirez-Alvarado, M. (2013) Systemic Amyloidoses. In *Annual Review of Biochemistry*, Vol 82 (Kornberg, R. D., Ed.), 745-774.

- [20] Caughey, B., and Lansbury, P. T. (2003) Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: Separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annual Review of Neuroscience*, 26, 267-298.
- [21] Uversky, V. N. (2010) Mysterious oligomerization of the amyloidogenic proteins. *Febs Journal*, 277, 2940-2953.
- [22] Westermarck, P., Benson, M. D., Buxbaum, J. N., Cohen, A. S., Frangione, B., Ikeda, S. I., Masters, C. L., Merlini, G., Saraiva, M. J., and Sipe, J. D. (2005) Amyloid: Toward terminology clarification - Report from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid-Journal of Protein Folding Disorders*, 12, 1-4.
- [23] Fändrich, M., and Dobson, C. M. (2002) The behaviour of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation. *Embo Journal*, 21, 5682-5690.
- [24] Sawaya, M. R., Sambashivan, S., Nelson, R., Ivanova, M. I., Sievers, S. A., Apostol, M. I., Thompson, M. J., Balbirnie, M., Wiltzius, J. J. W., McFarlane, H. T., Madsen, A. O., Riekel, C., and Eisenberg, D. (2007) Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers. *Nature*, 447, 453-457.
- [25] Cohen, A. S., and Calkins, E. (1959) Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins. *Nature*, 183, 1202-1203.
- [26] Sunde, M., Serpell, L. C., Bartlam, M., Fraser, P. E., Pepys, M. B., and Blake, C. C. F. (1997) Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *Journal of Molecular Biology*, 273, 729-739.
- [27] Missmahl, H. P., and Hartwig, M. (1953) Polarisationsoptische Untersuchungen an der Amyloidsubstanz. *Virchows Archiv Fur Pathologische Anatomie Und Physiologie Und Fur Klinische Medizin*, 324, 489-508.
- [28] Levine, H. (1993) Thioflavine-T interaction with synthetic alzheimers-disease beta-amyloid peptides - detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Science*, 2, 404-410.
- [29] Nilsson, M. R. (2004) Techniques to study amyloid fibril formation in vitro. *Methods*, 34, 151-160.
- [30] Kaye, R., Bernhagen, J., Greenfield, N., Sweimeh, K., Brunner, H., Voelter, W., and Kapurniotu, A. (1999) Conformational transitions of islet amyloid polypeptide (IAPP) in amyloid formation in vitro. *Journal of Molecular Biology*, 287, 781-796.
- [31] Bocharova, O. V., Breydo, L., Parfenov, A. S., Salnikov, V. V., and Baskakov, I. V. (2005) In vitro conversion of full-length mammalian prion protein produces amyloid form with physical properties of PrP<sup>Sc</sup>. *Journal of Molecular Biology*, 346, 645-659.
- [32] Yagi, H., Sato, A., Yoshida, A., Hattori, Y., Hara, M., Shimamura, J., Sakane, I., Hongo, K., Mizobata, T., and Kawata, Y. (2008) Fibril formation of hsp10 homologue proteins and determination of fibril core regions: Differences in fibril core regions dependent on subtle differences in amino acid sequence. *Journal of Molecular Biology*, 377, 1593-1606.
- [33] Scherzinger, E., Sittler, A., Schweiger, K., Heiser, V., Lurz, R., Hasenbank, R., Bates, G. P., Lehrach, H., and Wanker, E. E. (1999) Self-assembly of polyglutamine-containing huntingtin fragments into amyloid-like fibrils: Implications for Huntington's disease pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 4604-4609.

- [34] Scheuermann, T., Schulz, B., Blume, A., Wahle, E., Rudolph, R., and Schwarz, E. (2003) Trinucleotide expansions leading to an extended poly-L-alanine segment in the poly (A) binding protein PABPN1 cause fibril formation. *Protein Science*, 12, 2685-2692.
- [35] Lodderstedt, G., Hess, S., Hause, G., Scheuermann, T., Scheibel, T., and Schwarz, E. (2007) Effect of oculopharyngeal muscular dystrophy-associated extension of seven alanines on the fibrillation properties of the N-terminal domain of PABPN1. *Febs Journal*, 274, 346-355.
- [36] Daude, N., Ng, V., Watts, J. C., Genovesi, S., Glaves, J. P., Wohlgemuth, S., Schmitt-Ulms, G., Young, H., McLaurin, J., Fraser, P. E., and Westaway, D. (2010) Wild-type Shadoo proteins convert to amyloid-like forms under native conditions. *Journal of Neurochemistry*, 113, 92-104.
- [37] Jahn, T. R., and Radford, S. E. (2005) The Yin and Yang of protein folding. *Febs Journal*, 272, 5962-5970.
- [38] Serpell, L. C., Sunde, M., Benson, M. D., Tennent, G. A., Pepys, M. B., and Fraser, P. E. (2000) The protofilament substructure of amyloid fibrils. *Journal of Molecular Biology*, 300, 1033-1039.
- [39] Pedersen, J. S., Andersen, C. B., and Otzen, D. E. (2010) Amyloid structure - one but not the same: the many levels of fibrillar polymorphism. *Febs Journal*, 277, 4591-4601.
- [40] Eanes, E. D., and Glenner, G. G. (1968) X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 16, 673-677.
- [41] Geddes, A. J., Parker, K. D., Atkins, E. D. T., and Beighton, E. (1968) Cross-beta conformation in proteins. *Journal of Molecular Biology*, 32, 343-358.
- [42] Petkova, A. T., Ishii, Y., Balbach, J. J., Antzutkin, O. N., Leapman, R. D., Delaglio, F., and Tycko, R. (2002) A structural model for Alzheimer's beta-amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 16742-16747.
- [43] Van Melckebeke, H., Wasmer, C., Lange, A., Ab, E., Loquet, A., Bockmann, A., and Meier, B. H. (2010) Atomic-Resolution Three-Dimensional Structure of HET-s(218-289) Amyloid Fibrils by Solid-State NMR Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 132, 13765-13775.
- [44] Damm, S., and Schwarz, E. (2014) Influence of the polypeptide environment next to amyloidogenic peptides on fibril formation. *Biological Chemistry*, 395, 699-709.
- [45] Nelson, R., and Eisenberg, D. (2006) Structural models of amyloid-like fibrils. In *Fibrous Proteins: Amyloids, Prions and Beta Proteins* (Kajava, A., Squire, J. M., and Parry, D. A. D., Eds.), 235-282.
- [46] Jimenez, J. L., Nettleton, E. J., Bouchard, M., Robinson, C. V., Dobson, C. M., and Saibil, H. R. (2002) The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 9196-9201.
- [47] Sziegat, F., Wirmer-Bartoschek, J., and Schwalbe, H. (2011) Characteristics of Human Lysozyme and Its Disease-Related Mutants in their Unfolded States. *Angewandte Chemie-International Edition*, 50, 5514-5518.
- [48] Fraser, P. E., Nguyen, J. T., Surewicz, W. K., and Kirschner, D. A. (1991) pH-dependent structural transitions of alzheimer amyloid peptides. *Biophysical Journal*, 60, 1190-1201.
- [49] Fujiwara, S., Matsumoto, F., and Yonezawa, Y. (2003) Effects of salt concentration on association of the amyloid protofilaments of hen egg white lysozyme studied by time-resolved neutron scattering. *Journal of Molecular Biology*, 331, 21-28.

- [50] Kumar, S., and Udgaonkar, J. B. (2009) Structurally Distinct Amyloid Protofibrils Form on Separate Pathways of Aggregation of a Small Protein. *Biochemistry*, 48, 6441-6449.
- [51] Nielsen, L., Khurana, R., Coats, A., Frokjaer, S., Brange, J., Vyas, S., Uversky, V. N., and Fink, A. L. (2001) Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: Elucidation of the molecular mechanism. *Biochemistry*, 40, 6036-6046.
- [52] Andersen, C. B., Hicks, M. R., Vetri, V., Vandahl, B., Rahbek-Nielsen, H., Thogersen, H., Thogersen, I. B., Enghild, J. J., Serpell, L. C., Rischel, C., and Otzen, D. E. (2010) Glucagon Fibril Polymorphism Reflects Differences in Protofilament Backbone Structure. *Journal of Molecular Biology*, 397, 932-946.
- [53] Macchi, F., Hoffmann, S. V., Carlsen, M., Vad, B., Imparato, A., Rischel, C., and Otzen, D. E. (2011) Mechanical stress affects glucagon fibrillation kinetics and fibril structure. *Langmuir*, 27, 12539-12549.
- [54] Qiang, W., Kelley, K., and Tycko, R. (2013) Polymorph-Specific Kinetics and Thermodynamics of beta-Amyloid Fibril Growth. *Journal of the American Chemical Society*, 135, 6860-6871.
- [55] Jarrett, J. T., and Lansbury, P. T. (1992) Amyloid fibril formation requires a chemically discriminating nucleation event: studies of an amyloidogenic sequence from bacterial protein OsmB. *Biochemistry*, 31, 12345-12352.
- [56] Jarrett, J. T., and Lansbury, P. T. (1993) Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in alzheimers-disease and scrapie?, *Cell*, 73, 1055-1058.
- [57] Wood, S. J., Wypych, J., Steavenson, S., Louis, J. C., Citron, M., and Biere, A. L. (1999) alpha-synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent - Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 19509-19512.
- [58] Rochet, J. C., and Lansbury, P. T. (2000) Amyloid fibrillogenesis: themes and variations. *Current Opinion in Structural Biology*, 10, 60-68.
- [59] Serpell, L. C., Sunde, M., and Blake, C. C. F. (1997) The molecular basis of amyloidosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 53, 871-887.
- [60] Dobson, C. M. (2003) Protein folding and misfolding. *Nature*, 426, 884-890.
- [61] Uversky, V. N., and Fink, A. L. (2004) Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1698, 131-153.
- [62] Uversky, V. N. (2008) Amyloidogenesis of natively unfolded proteins. *Current Alzheimer Research*, 5, 260-287.
- [63] Uversky, V. N., Li, J., and Fink, A. L. (2001) Evidence for a partially folded intermediate in alpha-synuclein fibril formation. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 10737-10744.
- [64] Bennett, M. J., Schlunegger, M. P., and Eisenberg, D. (1995) 3D domain swapping: a mechanism for oligomer assembly. *Protein Science*, 4, 2455-2468.
- [65] Jaskolski, M. (2001) 3D domain swapping, protein oligomerization, and amyloid formation. *Acta Biochimica Polonica*, 48, 807-827.
- [66] Bennett, M. J., Choe, S., and Eisenberg, D. (1994) Domain swapping: Entangling alliances between proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 3127-3131.
- [67] Janowski, R., Kozak, M., Jankowska, E., Grzonka, Z., Grubb, A., Abrahamson, M., and Jaskolski, M. (2001) Human cystatin C, an amyloidogenic protein, dimerizes through three-dimensional domain swapping. *Nature Structural Biology*, 8, 316-320.

- [68] Liu, Y. S., Gotte, G., Libonati, M., and Eisenberg, D. (2001) A domain-swapped RNase A dimer with implications for amyloid formation. *Nature Structural Biology*, 8, 211-214.
- [69] Knaus, K. J., Morillas, M., Swietnicki, W., Malone, M., Surewicz, W. K., and Yee, V. C. (2001) Crystal structure of the human prion protein reveals a mechanism for oligomerization. *Nature Structural Biology*, 8, 770-774.
- [70] Bennett, M. J., Sawaya, M. R., and Eisenberg, D. (2006) Deposition diseases and 3D domain swapping. *Structure*, 14, 811-824.
- [71] Eakin, C. M., Attenello, F. J., Morgan, C. J., and Miranker, A. D. (2004) Oligomeric assembly of native-like precursors precedes amyloid formation by beta-2 microglobulin. *Biochemistry*, 43, 7808-7815.
- [72] Staniforth, R. A., Giannini, S., Higgins, L. D., Conroy, M. J., Hounslow, A. M., Jerala, R., Craven, C. J., and Waltho, J. P. (2001) Three-dimensional domain swapping in the folded and molten-globule states of cystatins, an amyloid-forming structural superfamily. *Embo Journal*, 20, 4774-4781.
- [73] Nelson, R., and Eisenberg, D. (2006) Recent atomic models of amyloid fibril structure. *Current Opinion in Structural Biology*, 16, 260-265.
- [74] Sambashivan, S., Liu, Y. S., Sawaya, M. R., Gingery, M., and Eisenberg, D. (2005) Amyloid-like fibrils of ribonuclease A with three-dimensional domain-swapped and native-like structure. *Nature*, 437, 266-269.
- [75] Prusiner, S. B. (1997) Prion diseases and the BSE crisis. *Science*, 278, 245-251.
- [76] Tanzi, R. E. (1999) A genetic dichotomy model for the inheritance of Alzheimer's disease and common age-related disorders. *Journal of Clinical Investigation*, 104, 1175-1179.
- [77] Booth, D. R., Sunde, M., Bellotti, V., Robinson, C. V., Hutchinson, W. L., Fraser, P. E., Hawkins, P. N., Dobson, C. M., Radford, S. E., Blake, C. C. F., and Pepys, M. B. (1997) Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis. *Nature*, 385, 787-793.
- [78] Hammarström, P., Jiang, X., Hurshman, A. R., Powers, E. T., and Kelly, J. W. (2002) Sequence-dependent denaturation energetics: A major determinant in amyloid disease diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 16427-16432.
- [79] McMurray, C. T. (2010) Mechanisms of trinucleotide repeat instability during human development. *Nature Reviews Genetics*, 11, 786-799.
- [80] Bauer, P. O., and Nukina, N. (2009) The pathogenic mechanisms of polyglutamine diseases and current therapeutic strategies. *Journal of Neurochemistry*, 110, 1737-1765.
- [81] Pearson, C. E., Edamura, K. N., and Cleary, J. D. (2005) Repeat instability: Mechanisms of dynamic mutations. *Nature Reviews Genetics*, 6, 729-742.
- [82] Cummings, C. J., and Zoghbi, H. Y. (2000) Trinucleotide repeats: Mechanisms and pathophysiology. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 1, 281-328.
- [83] Shao, J., and Diamond, M. I. (2007) Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy. *Human Molecular Genetics*, 16, R115-R123.
- [84] Ishikawa, K., Fujigasaki, H., Saegusa, H., Ohwada, K., Fujita, T., Iwamoto, H., Komatsuzaki, Y., Toru, S., Toriyama, H., Watanabe, M., Ohkoshi, N., Shoji, S., Kanazawa, I., Tanabe, T., and Mizusawa, H. (1999) Abundant expression and cytoplasmic aggregations of alpha 1A voltage-dependent calcium channel protein

- associated with neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 6. *Human Molecular Genetics*, 8, 1185-1193.
- [85] Albrecht, A., and Mundlos, S. (2005) The other trinucleotide repeat: polyalanine expansion disorders. *Current Opinion in Genetics & Development*, 15, 285-293.
- [86] Messaed, C., and Rouleau, G. A. (2009) Molecular mechanisms underlying polyalanine diseases. *Neurobiology of Disease*, 34, 397-405.
- [87] Winter, R., Liebold, J., and Schwarz, E. (2013) The unresolved puzzle why alanine extensions cause disease. *Biological Chemistry*, 394, 951-963.
- [88] Matera, I., Bachetti, T., Puppo, F., Di Duca, M., Morandi, F., Casiraghi, G. M., Cilio, M. R., Hennekam, R., Hofstra, R., Schober, J. G., Ravazzolo, R., Ottonello, G., and Ceccherini, I. (2004) PHOX2B mutations and polyalanine expansions correlate with the severity of the respiratory phenotype and associated symptoms in both congenital and late onset Central Hypoventilation syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 41, 373-380.
- [89] Muragaki, Y., Mundlos, S., Upton, J., and Olsen, B. R. (1996) Altered growth and branching patterns in synpolydactyly caused by mutations in HOXD13. *Science*, 272, 548-551.
- [90] Mundlos, S., Otto, F., Mundlos, C., Mulliken, J. B., Aylsworth, A. S., Albright, S., Lindhout, D., Cole, W. G., Henn, W., Knoll, J. H. M., Owen, M. J., Mertelsmann, R., Zabel, B. U., and Olsen, B. R. (1997) Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell*, 89, 773-779.
- [91] Laumonier, F., Ronce, N., Hamel, B. C. J., Thomas, P., Lespinasse, J., Raynaud, M., Paringaux, C., van Bokhoven, H., Kalscheuer, V., Fryns, J. P., Chelly, J., Moraine, C., and Briault, S. (2002) Transcription factor SOX3 is involved in X-linked mental retardation with growth hormone deficiency. *American Journal of Human Genetics*, 71, 1450-1455.
- [92] Caburet, S., Demarez, A., Moumne, L., Fellous, M., De Baere, E., and Veitia, R. A. (2004) A recurrent polyalanine expansion in the transcription factor FOXL2 induces extensive nuclear and cytoplasmic protein aggregation. *Journal of Medical Genetics*, 41, 932-936.
- [93] Nasrallah, I. M., Minarcik, J. C., and Golden, J. A. (2004) A polyalanine tract expansion in Arx forms intranuclear inclusions and results in increased cell death. *Journal of Cell Biology*, 167, 411-416.
- [94] Albrecht, A. N., Kornak, U., Boddlich, A., Suring, K., Robinson, P. N., Stiege, A. C., Lurz, R., Stricker, S., Wanker, E. E., and Mundlos, S. (2004) A molecular pathogenesis for transcription factor associated poly-alanine tract expansions. *Human Molecular Genetics*, 13, 2351-2359.
- [95] Trochet, D., Hong, S. J., Lim, J. K., Brunet, J. F., Munnich, A., Kim, K. S., Lyonnet, S., Goridis, C., and Amiel, J. (2005) Molecular consequences of PHOX2B missense, frameshift and alanine expansion mutations leading to autonomic dysfunction. *Human Molecular Genetics*, 14, 3697-3708.
- [96] Bachetti, T., Matera, I., Borghini, S., Di Duca, M., Ravazzolo, R., and Ceccherini, I. (2005) Distinct pathogenetic mechanisms for PHOX2B associated polyalanine expansions and frameshift mutations in congenital central hypoventilation syndrome. *Human Molecular Genetics*, 14, 1815-1824.
- [97] Marqusee, S., Robbins, V. H., and Baldwin, R. L. (1989) Unusually stable helix formation in short alanine-based peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 5286-5290.

- [98] Miller, J. S., Kennedy, R. J., and Kemp, D. S. (2001) Short, solubilized polyalanines are conformational chameleons: Exceptionally helical if N- and C-capped with helix stabilizers, weakly to moderately helical if capped with rigid spacers. *Biochemistry*, 40, 305-309.
- [99] Blondelle, S. E., Forood, B., Houghten, R. A., and PerezPaya, E. (1997) Polyalanine-based peptides as models for self-associated beta-pleated-sheet complexes. *Biochemistry*, 36, 8393-8400.
- [100] Shinchuk, L. M., Sharma, D., Blondelle, S. E., Reixach, N., Inouye, H., and Kirschner, D. A. (2005) Poly-(L-alanine) expansions form core beta-sheets that nucleate amyloid assembly. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*, 61, 579-589.
- [101] Brais, B., Rouleau, G. A., Bouchard, J. P., Fardeau, M., and Tome, F. M. S. (1999) Oculopharyngeal muscular dystrophy. *Seminars in Neurology*, 19, 59-66.
- [102] Hill, M. E., Creed, G. A., McMullan, T. F. W., Tyers, A. G., Hilton-Jones, D., Robinson, D. O., and Hammans, S. R. (2001) Oculopharyngeal muscular dystrophy - Phenotypic and genotypic studies in a UK population. *Brain*, 124, 522-526.
- [103] Brais, B. (2011) Oculopharyngeal muscular dystrophy. *Handbook of clinical neurology*, 101, 181-192.
- [104] Brais, B., Xie, Y. G., Sanson, M., Morgan, K., Weissenbach, J., Korczyn, A. D., Blumen, S. C., Fardeau, M., Tome, F. M. S., Bouchard, J. P., and Rouleau, G. A. (1995) The oculopharyngeal muscular-dystrophy locus maps to the region of the cardiac alpha-myosin and beta-myosin heavy-chain genes on chromosome 14Q11.2-Q13 *Human Molecular Genetics*, 4, 429-434.
- [105] Brais, B., Bouchard, J. P., Xie, Y. G., Rochefort, D. L., Chretien, N., Tome, F. M. S., Lafreniere, R. G., Rommens, J. M., Uyama, E., Nohira, O., Blumen, S., Korczyn, A. D., Heutink, P., Mathieu, J., Duranceau, A., Codere, F., Fardeau, M., and Rouleau, G. A. (1998) Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nature Genetics*, 18, 164-167.
- [106] Nakamoto, M., Nakano, S., Kawashima, S., Ihara, M., Nishimura, Y., Shinde, A., and Kakizuka, A. (2002) Unequal crossing-over in unique PABP2 mutations in Japanese patients - A possible cause of Oculopharyngeal muscular dystrophy. *Archives of Neurology*, 59, 474-477.
- [107] Robinson, D. O., Hammans, S. R., Read, S. P., and Sillibourne, J. (2005) Oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD): analysis of the PABPN1 gene expansion sequence in 86 patients reveals 13 different expansion types and further evidence for unequal recombination as the mutational mechanism. *Human Genetics*, 116, 267-271.
- [108] Raz, Y., and Raz, V. (2014) Oculopharyngeal muscular dystrophy as a paradigm for muscle aging. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6.
- [109] Tome, F. M. S., and Fardeau, M. (1980) Nuclear inclusions in oculopharyngeal dystrophy. *Acta Neuropathologica*, 49, 85-87.
- [110] Tome, F. M. S., Chateau, D., HelblingLeclerc, A., and Fardeau, M. (1997) Morphological changes in muscle fibers in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders*, 7, S63-S69.
- [111] Uyama, E., Tsukahara, T., Goto, K., Kurano, Y., Ogawa, M., Kim, Y. J., Uchino, M., and Arahata, K. (2000) Nuclear accumulation of expanded PABP2 gene product in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Muscle & Nerve*, 23, 1549-1554.
- [112] Calado, A., Tome, F. M. S., Brais, B., Rouleau, G., Kuhn, U., Wahle, E., and Carmo-Fonseca, M. (2000) Nuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy consist

- of poly(A) binding protein 2 aggregates which sequester poly(A) RNA. *Human Molecular Genetics*, 9, 2321-2328.
- [113] Bao, Y. P., Cook, L. J., O'Donovan, D., Uyama, E., and Rubinsztein, D. C. (2002) Mammalian, yeast, bacterial, and chemical chaperones reduce aggregate formation and death in a cell model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 12263-12269.
- [114] Abu-Baker, A., Messaed, C., Laganieri, J., Gaspar, C., Brais, B., and Rouleau, G. A. (2003) Involvement of the ubiquitin-proteasome pathway and molecular chaperones in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics*, 12, 2609-2623.
- [115] Wahle, E. (1991) A novel poly(A)-binding protein acts as a specificity factor in the second phase of messenger RNA polyadenylation. *Cell*, 66, 759-768.
- [116] Wahle, E., and Rügsegger, U. (1999) 3'-End processing of pre-mRNA in eukaryotes. *Fems Microbiology Reviews*, 23, 277-295.
- [117] Bienroth, S., Keller, W., and Wahle, E. (1993) Assembly of a processive messenger RNA polyadenylation complex. *Embo Journal*, 12, 585-594.
- [118] Wahle, E. (1995) Poly(A) tail length control is caused by termination of processive synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 2800-2808.
- [119] Kühn, U., Guendel, M., Knoth, A., Kerwitz, Y., Ruedel, S., and Wahle, E. (2009) Poly(A) Tail Length Is Controlled by the Nuclear Poly(A)-binding Protein Regulating the Interaction between Poly(A) Polymerase and the Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 22803-22814.
- [120] Calado, A., Kutay, U., Kühn, U., Wahle, E., and Carmo-Fonseca, M. (2000) Deciphering the cellular pathway for transport of poly(A)-binding protein II. *RNA-a Publication of the RNA Society*, 6, 245-256.
- [121] Nemeth, A., Krause, S., Blank, D., Jenny, A., Jenó, P., Lustig, A., and Wahle, E. (1995) Isolation of genomic and cDNA clones encoding bovine poly(A) binding protein II. *Nucleic Acids Research*, 23, 4034-4041.
- [122] Kim, Y. J., Noguchi, S. R., Hayashi, Y. K., Tsukahara, T. F., Shimizu, T., and Arahata, K. (2001) The product of an oculopharyngeal muscular dystrophy gene, poly(A)-binding protein 2, interacts with SKIP and stimulates muscle-specific gene expression. *Human Molecular Genetics*, 10, 1129-1139.
- [123] Kerwitz, Y., Kuhn, U., Lilie, H., Knoth, A., Scheuermann, T., Friedrich, H., Schwarz, E., and Wahle, E. (2003) Stimulation of poly(A) polymerase through a direct interaction with the nuclear poly(A) binding protein allosterically regulated by RNA. *Embo Journal*, 22, 3705-3714.
- [124] Nagai, K. (1996) RNA-protein complexes. *Current Opinion in Structural Biology*, 6, 53-61.
- [125] Kühn, U., Nemeth, A., Meyer, S., and Wahle, E. (2003) The RNA binding domains of the nuclear poly(A)-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 16916-16925.
- [126] Smith, J. J., Rucknagel, K. P., Schierhorn, A., Tang, J., Nemeth, A., Linder, M., Herschman, H. R., and Wahle, E. (1999) Unusual sites of arginine methylation in poly(A)-binding protein II and in vitro methylation by protein arginine methyltransferases PRMT1 and PRMT3. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 13229-13234.
- [127] Kiledjian, M., and Dreyfuss, G. (1992) Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *Embo Journal*, 11, 2655-2664.



- [128] Meyer, S., Urbanke, C., and Wahle, E. (2002) Equilibrium studies on the association of the nuclear poly(A) binding protein with poly(A) of different lengths. *Biochemistry*, 41, 6082-6089.
- [129] Keller, R. W., Kuhn, U., Aragon, M., Bornikova, L., Wahle, E., and Bear, D. G. (2000) The nuclear poly(A) binding protein, PABP2, forms an oligomeric particle covering the length of the poly(A) tail. *Journal of Molecular Biology*, 297, 569-583.
- [130] Shanmugam, V., Dion, P., Rochefort, D., Laganier, J., Brais, B., and Rouleau, G. A. (2000) PABP2 polyalanine tract expansion causes intranuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Annals of Neurology*, 48, 798-802.
- [131] Hino, H., Araki, K., Uyama, E., Takeya, M., Araki, M., Yoshinobu, K., Miike, K., Kawazoe, Y., Maeda, Y., Uchino, M., and Yamamura, K. (2004) Myopathy phenotype in transgenic mice expressing mutated PABPN1 as a model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics*, 13, 181-190.
- [132] Davies, J. E., Wang, L., Garcia-Oroz, L., Cook, L. J., Vacher, C., O'Donovan, D. G., and Rubinsztein, D. C. (2005) Doxycycline attenuates and delays toxicity of the oculopharyngeal muscular dystrophy mutation in transgenic mice. *Nature Medicine*, 11, 672-677.
- [133] Fan, X. P., Dion, P., Laganier, J., Brais, B., and Rouleau, G. A. (2001) Oligomerization of polyalanine expanded PABPN1 facilitates nuclear protein aggregation that is associated with cell death. *Human Molecular Genetics*, 10, 2341-2351.
- [134] Abu-Baker, A., Laganier, S., Fan, X. P., Laganier, J., Brais, B., and Rouleau, G. A. (2005) Cytoplasmic targeting of mutant poly(A)-binding protein nuclear 1 suppresses protein aggregation and toxicity in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Traffic*, 6, 766-779.
- [135] Tavanez, J. P., Calado, P., Braga, J., Lafarga, M., and Carmo-Fonseca, M. (2005) In vivo aggregation properties of the nuclear poly(A)-binding protein PABPN1. *Rna-a Publication of the Rna Society*, 11, 752-762.
- [136] Corbeil-Girard, L. P., Klein, A. F., Sasseville, A. M. J., Lavoie, H., Dicaire, M. J., Saint-Denis, A., Page, M., Duranceau, A., Codere, F., Bouchard, J. P., Karpati, G., Rouleau, G. A., Massie, B., Langelier, Y., and Brais, B. (2005) PABPN1 overexpression leads to upregulation of genes encoding nuclear proteins that are sequestered in oculopharyngeal muscular dystrophy nuclear inclusions. *Neurobiology of Disease*, 18, 551-567.
- [137] Sasseville, A. M.-J., Caron, A. W., Bourget, L., Klein, A. F., Dicaire, M.-J., Rouleau, G. A., Massie, B., Langelier, Y., and Brais, B. (2006) The dynamism of PABPN1 nuclear inclusions during the cell cycle. *Neurobiology of Disease*, 23, 621-629.
- [138] Fan, X. P., Messaed, C., Dion, P., Laganier, J., Brais, B., Karpati, G., and Rouleau, G. A. (2003) hnRNP A1 and A/B interaction with PABPN1 in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 30, 244-251.
- [139] Messaed, C., Dion, P. A., Abu-Baker, A., Rochefort, D., Laganier, J., Brais, B., and Rouleau, G. A. (2007) Soluble expanded PABPN1 promotes cell death in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neurobiology of Disease*, 26, 546-557.
- [140] Raz, V., Routledge, S., Venema, A., Buijze, H., van der Wal, E., Anvar, S., Straasheijm, K. R., Klooster, R., Antoniou, M., and van der Maarel, S. M. (2011) Modeling Oculopharyngeal Muscular Dystrophy in Myotube Cultures Reveals Reduced Accumulation of Soluble Mutant PABPN1 Protein. *American Journal of Pathology*, 179, 1988-2000.

- [141] Winter, R., Kuehn, U., Hause, G., and Schwarz, E. (2012) Polyalanine-independent Conformational Conversion of Nuclear Poly(A)-binding Protein 1 (PABPN1). *Journal of Biological Chemistry*, 287, 22662-22671.
- [142] Chartier, A., Benoit, B., and Simonelig, M. (2006) A Drosophila model of oculopharyngeal muscular dystrophy reveals intrinsic toxicity of PABPN1. *Embo Journal*, 25, 2253-2262.
- [143] Good, P. J., Abler, L., Herring, D., and Sheets, M. D. (2004) Xenopus embryonic poly(A) binding protein 2 (ePABP2) defines a new family of cytoplasmic Poly(A) binding proteins expressed during the early stages of vertebrate development. *Genesis*, 38, 166-175.
- [144] Song, J., McGivern, J. V., Nichols, K. W., Markley, J. L., and Sheets, M. D. (2008) Structural basis for RNA recognition by a type II poly(A)-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 15317-15322.
- [145] Ge, H., Zhou, D., Tong, S., Gao, Y., Teng, M., and Niu, L. (2008) Crystal structure and possible dimerization of the single RRM of human PABPN1. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*, 71, 1539-1545.
- [146] Nilsson, M., Wang, X., Rodziewicz-Motowidlo, S., Janowski, R., Lindstrom, V., Onnerfjord, P., Westermark, G., Grzonka, Z., Jaskolski, M., and Grubb, A. (2004) Prevention of domain swapping inhibits dimerization and amyloid fibril formation of cystatin C - Use of engineered disulfide bridges, antibodies, and carboxymethylpapain to stabilize the monomeric form of cystatin C. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 24236-24245.
- [147] Hafner-Bratkovic, I., Bester, R., Pristovsek, P., Gaedtke, L., Veranic, P., Gaspersic, J., Mancek-Keber, M., Avbelj, M., Polymenidou, M., Julius, C., Aguzzi, A., Vorberg, I., and Jerala, R. (2011) Globular Domain of the Prion Protein Needs to Be Unlocked by Domain Swapping to Support Prion Protein Conversion. *Journal of Biological Chemistry*, 286.
- [148] Schröder-Tittmann, K., Bosse-Doenecke, E., Reedtz-Runge, S., Ihling, C., Sinz, A., Tittmann, K., and Rudolph, R. (2010) Recombinant Expression, in Vitro Refolding, and Biophysical Characterization of the Human Glucagon-like Peptide-1 Receptor. *Biochemistry*, 49, 7956-7965.
- [149] Graham, F. L., and Van Der Eb, A. J. (1973) Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology*, 54, 536-539.
- [150] Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- [151] Sachs, A. B., and Kornberg, R. D. (1985) Nuclear polyadenylate-binding protein. *Molecular and Cellular Biology*, 5, 1993-1996.
- [152] Lineweaver, H., and Burk, D. (1934) The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 658-666.
- [153] Wahle, E., Lustig, A., Jenö, P., and Maurer, P. (1993) Mammalian poly(A)-binding protein II. Physical properties and binding to polynucleotides. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 2937-2945.
- [154] Rügsegger, U., Beyer, K., and Keller, W. (1996) Purification and characterization of human cleavage factor I-m, involved in the 3' end processing of messenger RNA precursors. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 6107-6113.
- [155] Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

- [156] Wahle, E., and Keller, W. (1994) 3' end-processing of mRNA. In *RNA Processing A Practical Approach Volume II* (Higgins, S. J., and Hames, B. D., Eds.). Oxford University Press.
- [157] Gill, S. C., and Von Hippel, P. H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data., *Analytical Biochemistry*, 182, 319-326.
- [158] Pace, C. N. (1986) Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods in enzymology*, 131, 266-280.
- [159] Pace, C. N., Shirley, B. A., and Thomson, J. A. (1989) Measuring the conformational stability of a protein. In *Protein structure A practical approach*. (Creighton, T. E., Ed.). IRL Press, Oxford.
- [160] Santoro, M. M., and Bolen, D. W. (1988) Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry*, 27, 8063-8068.
- [161] Jackson, S. E., and Fersht, A. R. (1991) Folding of Chymotrypsin Inhibitor 2. 1. Evidence for a Two-State Transition. *Biochemistry*, 30, 10428-10435.
- [162] Zarrine-Afsar, A., and Davidson, A. R. (2004) The analysis of protein folding kinetic data produced in protein engineering experiments. *Methods*, 34, 41-50.
- [163] Pace, C. N., Hebert, E. J., Shaw, K. L., Schell, D., Both, V., Krajcikova, D., Sevcik, J., Wilson, K. S., Dauter, Z., Hartley, R. W., and Grimsley, G. R. (1998) Conformational stability and thermodynamics of folding of ribonucleases Sa, Sa2 and Sa3. *Journal of Molecular Biology*, 279, 271-286.
- [164] Baldwin, R. L. (1986) Temperature dependence of the hydrophobic interaction in protein folding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, 8069-8072.
- [165] Arnold, U., and Ulbrich-Hofmann, R. (1999) Quantitative protein precipitation from guanidine hydrochloride-containing solutions by sodium deoxycholate trichloroacetic acid. *Analytical Biochemistry*, 271, 197-199.
- [166] Sowdhamini, R., Srinivasan, N., Shoichet, B., Vonsanti, D., Ramakrishnan, C., and Balaram, P. (1989) Stereochemical modeling of disulfide bridges. Criteria for introduction into proteins by site-directed mutagenesis., *Protein Engineering*, 3, 95-103.
- [167] Dani, V. S., Ramakrishnan, C., and Varadarajan, R. (2003) MODIP revisited: re-evaluation and refinement of an automated procedure for modeling of disulfide bonds in proteins. *Protein Engineering*, 16, 187-193.
- [168] Warburg, O., and Christian, W. (1941) Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase. *Naturwissenschaften*, 29, 589-590.
- [169] Damm, S. (2012) Charakterisierung von Varianten des nukleären poly(A)-bindenden Proteins 1 (PABPN1) mit C-terminal fusionierter One-Strep-tag-Sequenz, Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale).
- [170] Fronz, K., Guettinger, S., Burkert, K., Kuehn, U., Stoehr, N., Schierhorn, A., and Wahle, E. (2011) Arginine Methylation of the Nuclear Poly(A) Binding Protein Weakens the Interaction with Its Nuclear Import Receptor, Transportin. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 32986-32994.
- [171] Krause, S., Fakan, S., Weis, K., and Wahle, E. (1994) Immunodetection of poly(A) binding protein II in the cell nucleus. *Experimental Cell Research*, 214, 75-82.
- [172] Raz, V., Abraham, T., van Zwet, E. W., Dirks, R. W., Tanke, H. J., and van der Maarel, S. M. (2011) Reversible aggregation of PABPN1 pre-inclusion structures. *Nucleus-Austin*, 2, 208-218.

- [173] Wang, Q. S., Mosser, D. D., and Bag, J. (2005) Induction of HSP70 expression and recruitment of HSC70 and HSP70 in the nucleus reduce aggregation of a polyalanine expansion mutant of PABPN1 in HeLa cells. *Human Molecular Genetics*, 14, 3673-3684.
- [174] Scherzinger, E., Lurz, R., Turmaine, M., Mangiarini, L., Hollenbach, B., Hasenbank, R., Bates, G. P., Davies, S. W., Lehrach, H., and Wanker, E. E. (1997) Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell*, 90, 549-558.
- [175] Wang, Q. S., and Bag, J. (2006) Ectopic expression of a polyalanine expansion mutant of poly(A)-binding protein N1 in muscle cells in culture inhibits myogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340, 815-822.
- [176] Chang, E., and Kuret, J. (2008) Detection and quantification of tau aggregation using a membrane filter assay. *Analytical Biochemistry*, 373, 330-336.
- [177] Junghans, V. (2011) Untersuchungen zur Fibrillierung unterschiedlicher Varianten von PABPN1, Bachelorarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale).
- [178] Schikora, F. (2012) Expression, Reinigung und proteinbiochemische Charakterisierung von Disulfid-enthaltenden Varianten des nukleären Poly(A)-Bindeproteins (PABPN1), Masterarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale).
- [179] Scheuermann, T. (2003) Untersuchungen zum Einfluss von Polyalaninsequenzen auf die Bildung amyloider Fibrillen von PABPN1, Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale).
- [180] Ellman, G. L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82, 70-77.
- [181] Kelly, S. M., and Price, N. C. (2000) The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. *Current Protein & Peptide Science*, 1, 349-384.
- [182] Sreerama, N., Manning, M. C., Powers, M. E., Zhang, J. X., Goldenberg, D. P., and Woody, R. W. (1999) Tyrosine, phenylalanine, and disulfide contributions to the circular dichroism of proteins: Circular dichroism spectra of wild-type and mutant bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry*, 38, 10814-10822.
- [183] Hofmeister, F. (1888) Zur Lehre von der Wirkung der Salze. Zweite Mittheilung. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 24, 247-260.
- [184] Von Hippel, P. H., and Wong, K. Y. (1964) Neutral Salts - Generality of Their Effects on Stability of Macromolecular Conformations. *Science*, 145, 577-580.
- [185] Kliemann, M., Rattenholl, A., Golbik, R., Balbach, J., Lille, H., Rudolph, R., and Schwarz, E. (2004) The mature part of proNGF induces the structure of its pro-peptide. *Febs Letters*, 566, 207-212.
- [186] Lin, S. H., Konishi, Y., Nall, B. T., and Scheraga, H. A. (1985) Influence of an extrinsic cross-link on the folding pathway of ribonuclease A. Kinetics of folding-unfolding. *Biochemistry*, 24, 2680-2686.
- [187] Pace, C. N., and Laurents, D. V. (1989) A new method for determining the heat capacity change for protein folding. *Biochemistry*, 28, 2520-2525.
- [188] Swint, L., and Robertson, A. D. (1993) Thermodynamics of unfolding for turkey ovomucoid third domain: thermal and chemical denaturation. *Protein Science*, 2, 2037-2049.
- [189] Pace, C. N., Grimsley, G. R., Thomson, J. A., and Barnett, B. J. (1988) Conformational stability and activity of ribonuclease T1 with zero, one, and two intact disulfide bonds. *Journal of Biological Chemistry*, 263, 11820-11825.

- [190] Marky, L. A., and Breslauer, K. J. (1987) Calculating thermodynamic data for transitions of any molecularity from equilibrium melting curves. *Biopolymers*, 26, 1601-1620.
- [191] Winter, R. (2012) Untersuchungen zur Fibrillenbildung des nukleären Polyadenylat-Bindeproteins 1 (PABPN1), Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale).
- [192] Matsumura, M., Bechtel, W. J., Levitt, M., and Matthews, B. W. (1989) Stabilization of phage T4 lysozyme by engineered disulfide bonds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 6562-6566.
- [193] Kelly, J. W. (1996) Alternative conformations of amyloidogenic proteins govern their behavior. *Current Opinion in Structural Biology*, 6, 11-17.
- [194] Junttila, M. R., Saarinen, S., Schmidt, T., Kast, J., and Westermarck, J. (2005) Single-step Strep-tag (R) purification for the isolation and identification of protein complexes from mammalian cells. *Proteomics*, 5, 1199-1203.
- [195] Trollet, C., Anvar, S. Y., Venema, A., Hargreaves, I. P., Foster, K., Vignaud, A., Ferry, A., Negroni, E., Hourde, C., Baraibar, M. A., t Hoen, P. A. C., Davies, J. E., Rubinsztein, D. C., Heales, S. J., Mouly, V., van der Maarel, S. M., Butler-Browne, G., Raz, V., and Dickson, G. (2010) Molecular and phenotypic characterization of a mouse model of oculopharyngeal muscular dystrophy reveals severe muscular atrophy restricted to fast glycolytic fibres. *Human Molecular Genetics*, 19, 2191-2207.
- [196] Dion, P., Shanmugam, V., Gaspar, C., Messaed, C., Meijer, I., Toulouse, A., Laganriere, J., Roussel, J., Rochefort, D., Laganriere, S., Allen, C., Karpati, G., Bouchard, J. P., Braid, B., and Rouleau, G. A. (2005) Transgenic expression of an expanded (GCG)(13) repeat PABPN1 leads to weakness and coordination defects in mice. *Neurobiology of Disease*, 18, 528-536.
- [197] Berciano, M. T., Villagra, N. T., Ojeda, J. L., Navascues, J., Gomes, A., Lafarga, M., and Carmo-Fonseca, M. (2004) Oculopharyngeal muscular dystrophy-like nuclear inclusions are present in normal magnocellular neurosecretory neurons of the hypothalamus. *Human Molecular Genetics*, 13, 829-838.
- [198] Calado, A., and Carmo-Fonseca, M. (2000) Localization of poly(A)-binding protein 2 (PABP2) in nuclear speckles is independent of import into the nucleus and requires binding to poly(A) RNA. *Journal of Cell Science*, 113, 2309-2318.
- [199] Bengoechea, R., Tapia, O., Casafont, I., Berciano, J., Lafarga, M., and Berciano, M. T. (2012) Nuclear speckles are involved in nuclear aggregation of PABPN1 and in the pathophysiology of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neurobiology of Disease*, 46, 118-129.
- [200] Bao, Y. P., Sarkar, S., Uyama, E., and Rubinsztein, D. C. (2004) Congo red, doxycycline, and HSP70 overexpression reduce aggregate formation and cell death in cell models of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Journal of Medical Genetics*, 41, 47-51.
- [201] Wang, Q., and Bag, J. (2008) Induction of expression and co-localization of heat shock polypeptides with the polyalanine expansion mutant of poly(A)-binding protein N1 after chemical stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 370, 11-15.
- [202] Anvar, S. Y., t Hoen, P. A. C., Venema, A., van der Sluijs, B., van Engelen, B., Snoeck, M., Vissing, J., Trollet, C., Dickson, G., Chartier, A., Simonelig, M., van Ommen, G.-J. B., van der Maarel, S. M., and Raz, V. (2011) Deregulation of the ubiquitin-proteasome system is the predominant molecular pathology in OPMD animal models and patients. *Skeletal Muscle*, 1.

- [203] Anvar, S. Y., Raz, Y., Verwey, N., van der Sluijs, B., Venema, A., Goeman, J. J., Vissing, J., van der Maarel, S. M., t Hoen, P. A. C., van Engelen, B. G. M., and Raz, V. (2013) A decline in PABPN1 induces progressive muscle weakness in Oculopharyngeal muscle dystrophy and in muscle aging. *Aging-U.S.*, 5, 412-426.
- [204] Siemering, K. R., Golbik, R., Sever, R., and Haseloff, J. (1996) Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Current Biology*, 6, 1653-1663.
- [205] Zimmer, M. (2002) Green fluorescent protein (GFP): Applications, structure, and related photophysical behavior. *Chemical Reviews*, 102, 759-781.
- [206] Zacharias, D. A., Violin, J. D., Newton, A. C., and Tsien, R. Y. (2002) Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science*, 296, 913-916.
- [207] Arrasate, M., Mitra, S., Schweitzer, E. S., Segal, M. R., and Finkbeiner, S. (2004) Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature*, 431, 805-810.
- [208] Takahashi, T., Kikuchi, S., Katada, S., Nagai, Y., Nishizawa, M., and Onodera, O. (2008) Soluble polyglutamine oligomers formed prior to inclusion body formation are cytotoxic. *Human Molecular Genetics*, 17, 345-356.
- [209] Askanas, V., Serdaroglu, P., Engel, W. K., and Alvarez, R. B. (1991) Immunolocalization of ubiquitin in muscle biopsies of patients with inclusion body myositis and oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neuroscience Letters*, 130, 73-76.
- [210] Gaiser, A. M., Kaiser, C. J. O., Haslbeck, V., and Richter, K. (2011) Downregulation of the Hsp90 System Causes Defects in Muscle Cells of Caenorhabditis Elegans. *Plos One*, 6.
- [211] Papsdorf, K., Sacherl, J., and Richter, K. (2014) The Balanced Regulation of Hsc70 by DNJ-13 and UNC-23 Is Required for Muscle Functionality. *Journal of Biological Chemistry*, 289, 25250-25261.
- [212] Pace, C. N. (1990) Conformational stability of globular proteins. *Trends Biochem.Sci.*, 15, 14-17.
- [213] Matsumura, M., Signor, G., and Matthews, B. W. (1989) Substantial increase of protein stability by multiple disulphide bonds. *Nature*, 342, 291-293.
- [214] Futami, J., Tada, H., Seno, M., Ishikami, S., and Yamada, H. (2000) Stabilization of human RNase 1 by introduction of a disulfide bond between residues 4 and 118. *Journal of Biochemistry*, 128, 245-250.
- [215] Pecher, P., and Arnold, U. (2009) The effect of additional disulfide bonds on the stability and folding of ribonuclease A. *Biophysical Chemistry*, 141, 21-28.
- [216] Lin, S. H., Konishi, Y., Denton, M. E., and Scheraga, H. A. (1984) Influence of an extrinsic cross-link on the folding pathway of ribonuclease A. Conformational and thermodynamic analysis of cross-linked (lysine7-lysine41)-ribonuclease A. *Biochemistry*, 23, 5504-5512.
- [217] Betz, S. F. (1993) Disulfide bonds and the stability of globular proteins. *Protein Science*, 2, 1551-1558.
- [218] Baldwin, R. L. (1996) How Hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophysical Journal*, 71, 2056-2063.
- [219] Park, S. H., Oneil, K. T., and Roder, H. (1997) An early intermediate in the folding reaction of the B1 domain of protein G contains a native-like core. *Biochemistry*, 36, 14277-14283.

- [220] Ramirez-Alvarado, M., Merkel, J. S., and Regan, L. (2000) A systematic exploration of the influence of the protein stability on amyloid fibril formation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 8979-8984.
- [221] Sturtevant, J. M. (1987) Biochemical Applications of Differential Scanning Calorimetry. *Annual Review of Physical Chemistry*, 38, 463-488.
- [222] Apetri, A. C., and Surewicz, W. K. (2002) Kinetic intermediate in the folding of human prion protein. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 44589-44592.
- [223] Kiefhaber, T. (1995) Protein folding kinetics. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 40, 313-341.
- [224] Harper, J. D., and Lansbury, P. T. (1997) Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: Mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 66, 385-407.
- [225] Colon, W., and Kelly, J. W. (1992) Partial denaturation of transthyretin is sufficient for amyloid fibril formation in vitro. *Biochemistry*, 31, 8654-8660.
- [226] Lai, Z. H., Colon, W., and Kelly, J. W. (1996) The acid-mediated denaturation pathway of transthyretin yields a conformational intermediate that can self-assemble into amyloid. *Biochemistry*, 35, 6470-6482.
- [227] Hornemann, S., and Glockshuber, R. (1998) A scrapie-like unfolding intermediate of the prion protein domain PrP(121-231) induced by acidic pH. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 6010-6014.
- [228] Calamai, M., Chiti, F., and Dobson, C. M. (2005) Amyloid fibril formation can proceed from different conformations of a partially unfolded protein. *Biophysical Journal*, 89, 4201-4210.
- [229] Van Grondelle, W., Iglesias, C. L., Coll, E., Artzner, F., Paternostre, M., Lacombe, F., Cardus, M., Martinez, G., Montes, M., Cherif-Cheikh, R., and Valery, C. (2007) Spontaneous fibrillation of the native neuropeptide hormone Somatostatin-14. *Journal of Structural Biology*, 160, 211-223.
- [230] Chiti, F., Taddei, N., Bucciantini, M., White, P., Ramponi, G., and Dobson, C. M. (2000) Mutational analysis of the propensity for amyloid formation by a globular protein. *Embo Journal*, 19, 1441-1449.
- [231] Maiti, N. R., and Surewicz, W. K. (2001) The role of disulfide bridge in the folding and stability of the recombinant human prion protein. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 2427-2431.
- [232] Kong, Q., Mills, J. L., Kundu, B., Li, X., Qing, L., Surewicz, K., Cali, I., Huang, S., Zheng, M., Swietnicki, W., Sonnichsen, F. D., Gambetti, P., and Surewicz, W. K. (2013) Thermodynamic Stabilization of the Folded Domain of Prion Protein Inhibits Prion Infection in Vivo. *Cell Reports*, 4, 248-254.
- [233] Hurle, M. R., Helms, L. R., Li, L., Chan, W. N., and Wetzel, R. (1994) A role for destabilizing amino acid replacements in light-chain amyloidosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 5446-5450.
- [234] Espargaro, A., Castillo, V., de Groot, N. S., and Ventura, S. (2008) The in vivo and in vitro aggregation properties of globular proteins correlate with their conformational stability: The SH3 case. *Journal of Molecular Biology*, 378, 1116-1131.
- [235] Buttstedt, A., Winter, R., Sackewitz, M., Hause, G., Schmid, F.-X., and Schwarz, E. (2010) Influence of the Stability of a Fused Protein and Its Distance to the Amyloidogenic Segment on Fibril Formation. *Plos One*, 5.

- [236] Kühn, U., and Wahle, E. (2004) Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta-Genes Structure and Expression*, 1678, 67-84.
- [237] Thakur, A. K., Jayaraman, M., Mishra, R., Thakur, M., Chellgren, V. M., Byeon, I.-J. L., Anjum, D. H., Kodali, R., Creamer, T. P., Conway, J. F., Gronenborn, A. M., and Wetzel, R. (2009) Polyglutamine disruption of the huntingtin exon 1 N terminus triggers a complex aggregation mechanism. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16, 380-389.
- [238] De Chiara, C., Menon, R. P., Dal Piaz, F., Calder, L., and Pastore, A. (2005) Polyglutamine is Not All: The Functional Role of the AXH Domain in the Ataxin-1 Protein. *J. Mol. Biol.*, 354, 883–893.
- [239] Ellisdon, A. M., Thomas, B., and Bottomley, S. P. (2006) The two-stage pathway of ataxin-3 fibrillogenesis involves a polyglutamine-independent step. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 16888-16896.
- [240] Ellisdon, A. M., Pearce, M. C., and Bottomley, S. P. (2007) Mechanisms of ataxin-3 misfolding and fibril formation: Kinetic analysis of a disease-associated polyglutamine protein. *Journal of Molecular Biology*, 368, 595-605.
- [241] Saunders, H. M., Gilis, D., Rومان, M., Dehouck, Y., Robertson, A. L., and Bottomley, S. P. (2011) Flanking domain stability modulates the aggregation kinetics of a polyglutamine disease protein. *Protein Science*, 20, 1675-1681.
- [242] Semisotnov, G. V., Rodionova, N. A., Razgulyaev, O. I., Uversky, V. N., Gripas, A. F., and Gilmanshin, R. I. (1991) Study of the "molten globule" intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe. *Biopolymers*, 31, 119-128.
- [243] Welker, E., Wedemeyer, W. J., and Scheraga, H. A. (2001) A role for intermolecular disulfide bonds in prion diseases?, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 4334-4336.



## 7. Abkürzungsverzeichnis

AB/AM	<i>antibiotic/antimycotic</i> (Antibiotikum/Antimykotikum)
Ala	Alanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CD	Circulardichroismus
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSC	dynamische Differenzkalorimetrie
DTT	Dithiothreitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI-QTOF-MS/MS	<i>electrospray ionization quadrupole time-of-flight</i> -Tandem-Massenspektrometrie
FBS	<i>fetal bovine serum</i> (fötales Kälberserum)
GdmCl	Guanidiniumchlorid
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
LB	<i>lysogeny broth</i>
MLU	Martin-Luther-Universität
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRW	<i>mean residue weight</i>
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i> (Molekulare Ausschlussgröße)
n.d.	nicht definiert

NP-40	Nonidet® P40 (Nonylphenylpolyethylenglycol)
PABPN1	nukleäres Polyadenylat-Bindeprotein 1
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PDB	Proteindatenbank
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	<i>ribonucleoprotein</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TB	<i>terrific broth</i>
TCA	Trichloressigsäure
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
tRNA	Transfer-RNA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i> (Enzym-Einheit)
UV	Ultraviolett
v/v	<i>volume per volume</i>
Vol.	Volumen
w/v	<i>weight per volume</i>
WT	Wildtyp
x g	x-fache Erdbeschleunigung

Die Begriffe "Expression" und „exprimieren“ werden in dieser Arbeit zur Vereinfachung auch dann verwendet, wenn die Biosynthese des Expressionsproduktes gemeint ist.

## 8. Anhang

### 8.1 Zentrifugation von PABPN1-Fibrillen

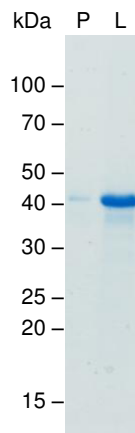


Abbildung 39: SDS-PAGE zentrifugierter PABPN1-Fibrillen. Die Zentrifugation erfolgte für zwei Minuten bei 100 x g. Ein geringer Anteil der Fibrillen ist im Pellet (P) zu finden. Überwiegend befinden sich die Fibrillen im löslichen Überstand (L).

### 8.2 Massenspektrometrie

In Tabelle 26 sind die Ergebnisse der Untersuchung der RNP-Domäne-Varianten mittels Massenspektrometrie zusammengefasst. Zur Identifizierung der Proteine wurde die entsprechende Bande aus einem SDS-Polyacrylamid-Gel ausgeschnitten. Anschließend wurde die Übereinstimmung mit der Aminosäuresequenz der RNP-Domäne-Varianten in Prozent berechnet. Für die Bestimmung der Gesamtmasse wurden die Proben vor der Messung mittels *Zip Tips* entsalzt. Zur Überprüfung des gemessenen Molekulargewichts wurde mit dem Programm *ProtParam tool* (<http://web.expasy.org/protparam/>) das theoretische Molekulargewicht berechnet [157]. Die Experimente wurden von Dr. Angelika Schierhorn (MLU Halle-Wittenberg, Serviceeinheit für Massenspektrometrie) durchgeführt.

	WT-RNP	$\Delta$ Cys-RNP	dS-RNP
Übereinstimmung mit der Sequenz	81,8 %	88,6 %	89,8 %
Berechnetes Molekulargewicht	9775,0 Da	9742,9 Da	9776,9 Da
Gemessenes Molekulargewicht	9778,4 Da	9742,3 Da	9780,4 Da

Tabelle 26: Daten der Untersuchung der RNP-Domäne-Varianten mittels Massenspektrometrie.

### 8.3 Harnstoff-induzierte Denaturierung der RNP-Domäne

Für die vier Varianten WT-RNP,  $\Delta$ Cys-RNP, dS-RNP und SH-RNP sind exemplarisch Rohdaten der Harnstoff-induzierten Denaturierung gezeigt, um die Reversibilität zu belegen. Während die Entfaltung der anderen Varianten vollständig reversibel war, betrug die Reversibilität für SH-RNP ca. 70 %.

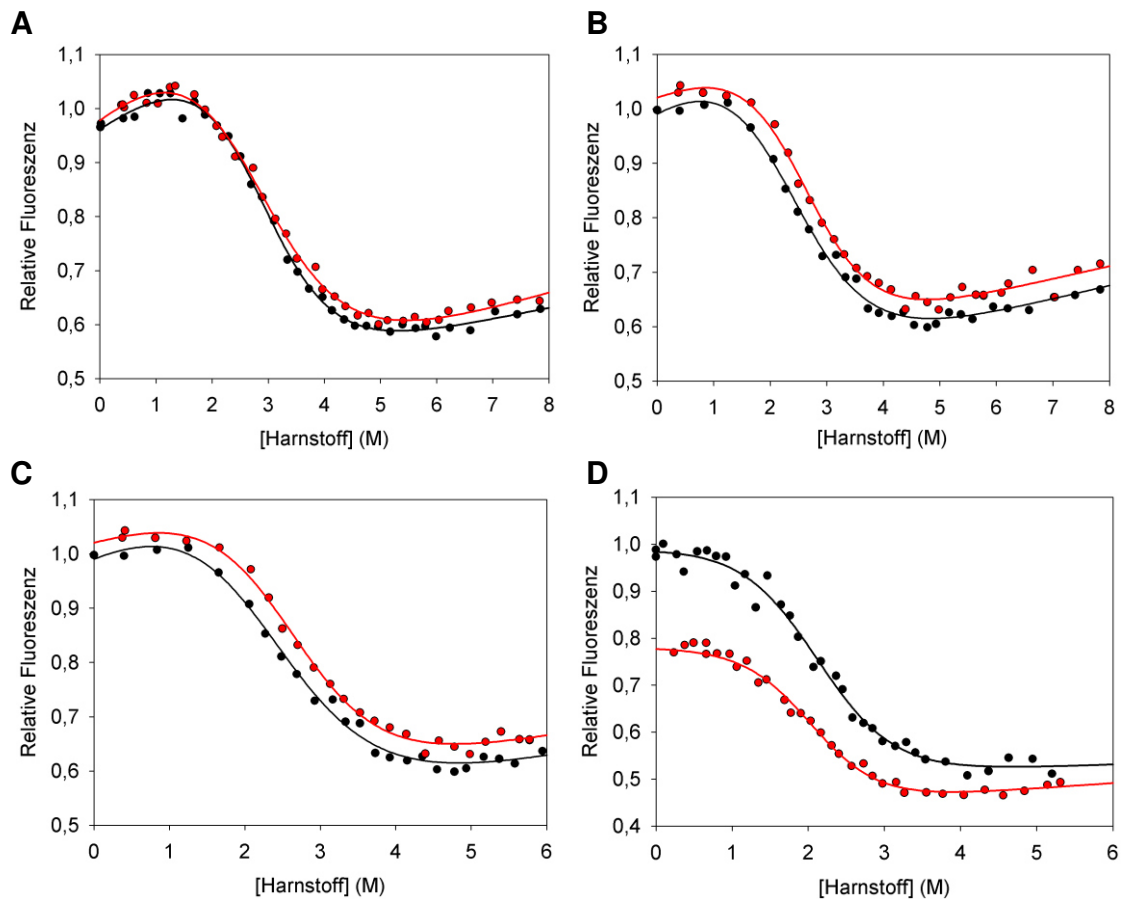


Abbildung 40: Rohdaten der Harnstoff-induzierten Entfaltungsübergänge der RNP-Domäne-Varianten. (A) WT-RNP, (B) dS-RNP, (C)  $\Delta$ Cys-RNP in Gegenwart von 0,8 M Ammoniumsulfat, (D) SH-RNP in Gegenwart von 1,0 M Ammoniumsulfat. Dargestellt sind die Denaturierung (schwarz) und die Renaturierung (rot). Die Anregungs-Wellenlänge lag bei 274 nm. Die Fluoreszenzemission wurde bei 307 nm aufgezeichnet. Die Messungen erfolgten in RNP-Puffer.

## 8.4 Faltungskinetiken der RNP-Domäne

Um die „monophasischen“ Verläufe der Denaturierungs- und Renaturierungskinetiken zu belegen, sind in diesem Abschnitt exemplarisch Kinetiken bei verschiedenen Harnstoffkonzentrationen gezeigt.

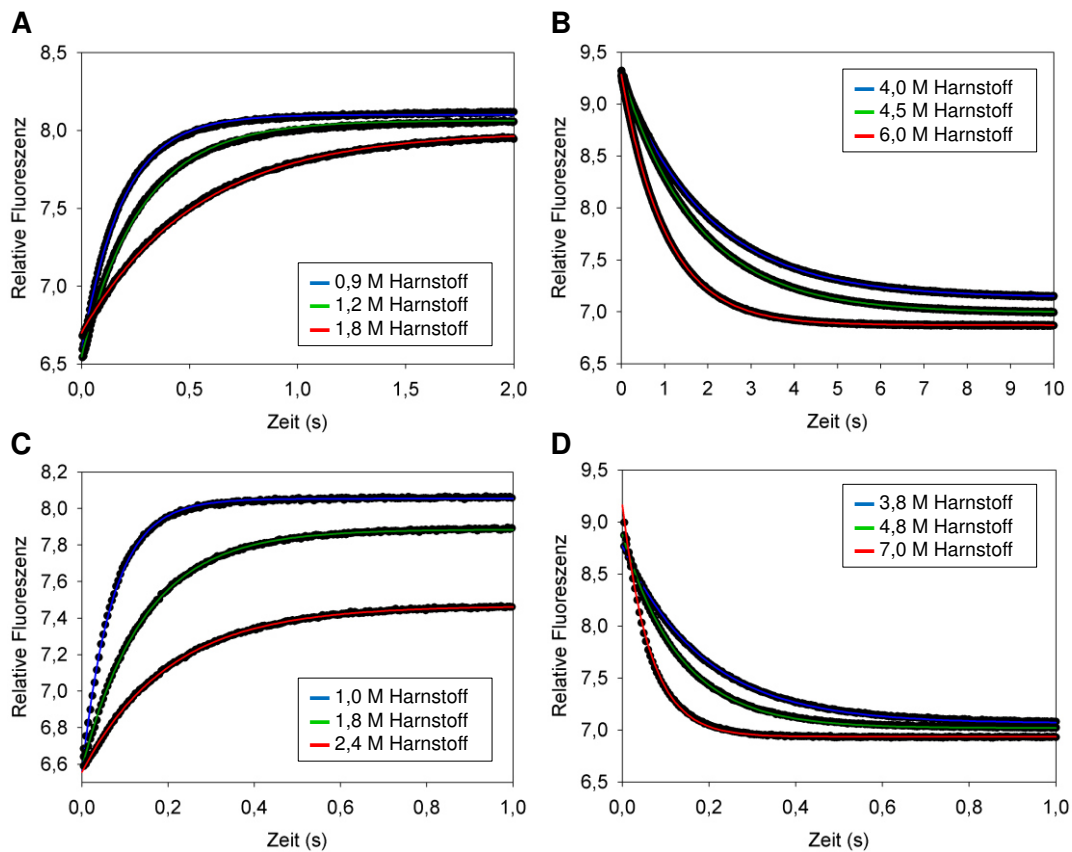


Abbildung 41: Faltungskinetiken der RNP-Domäne-Varianten. (A) Renaturierung von WT-RNP, (B) Denaturierung von WT-RNP, (C) Renaturierung von dS-RNP und (D) Denaturierung von dS-RNP. Die Messpunkte sind schwarz dargestellt. Die exponentiellen *fits* sind als durchgezogene Linien farbig hervorgehoben. Die Daten wurden anhand des Fluoreszenzsignals ermittelt. Die Anregung erfolgte bei 280 nm, die Detektion bei Wellenlängen größer als 305 nm.

## 8.5 Temperatur-induzierte Denaturierung der RNP-Domäne

In diesem Abschnitt sind die Rohdaten der Temperatur-induzierten Denaturierung und Renaturierung der RNP-Domäne-Varianten gezeigt. Die Reversibilität lag bei ca. 80 %.

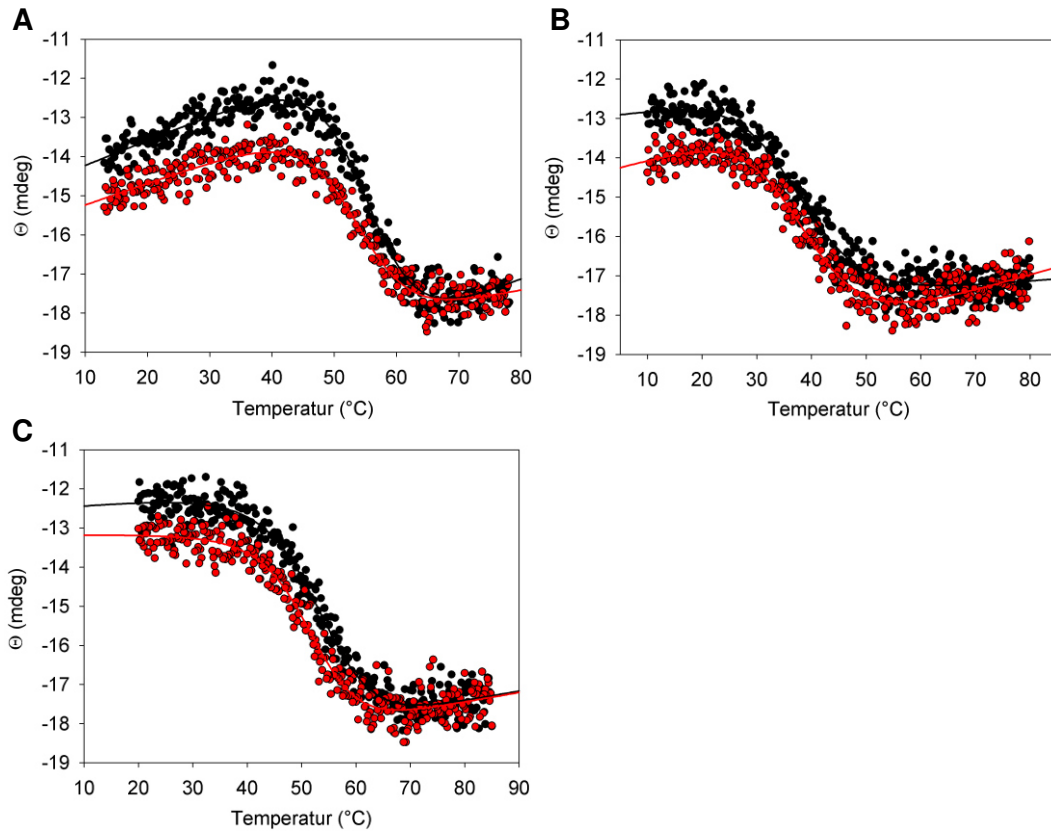


Abbildung 42: Rohdaten der Temperatur-induzierten Denaturierung der RNP-Domäne-Varianten. (A) WT-RNP, (B)  $\Delta$ Cys-RNP und (C) dS-RNP. Die Denaturierung ist in Schwarz, die Renaturierung in Rot dargestellt. Gemessen wurde das CD-Signal bei 208 nm in RNP<sup>K</sup>-Puffer.

## 8.6 Temperatur-induzierte Denaturierung von PABPN1

Die Temperatur-induzierte Denaturierung von PABPN1 wurde neben der Messung der Streulicht-Intensität (Kapitel 3.2.2.2) mit weiteren Methoden untersucht (Kapitel 2.2.5.8). Anhand des CD-Signals bei 220 nm wurden kooperative Übergangskurven von WT-PABPN1 und  $\Delta$ Cys-PABPN1 beim Erhitzen gemessen. Bei SH-PABPN1 war ein zweiphasiger Übergang zu beobachten. Bei der Erhitzung von dS-PABPN1 stieg das CD-Signal zunächst linear an und blieb ab etwa 60 °C konstant (Abbildung 43 A). Die Denaturierung der PABPN1-Varianten war irreversibel. Unter identischen Bedingungen zum Volllängen-Protein wurde ebenfalls ein Entfaltungsübergang der WT-RNP-Domäne in PABPN1<sup>K</sup>-Puffer aufgenommen. Wie bei den Experimenten in RNP-Puffer war dabei eine Reversibilität von 80 % zu verzeichnen (siehe Kapitel 3.2.1.4.). Sowohl für WT-PABPN1 als auch für WT-RNP lag der Übergangsbereich vom gefalteten Protein zum entfalteten Protein zwischen 50 °C und 65 °C. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass mit der thermischen Entfaltung der RNP-Domäne eine Denaturierung von Volllängen-PABPN1 einhergeht.

Die Temperatur-induzierte Denaturierung von PABPN1 wurde auch in Gegenwart des Fluoreszenzfarbstoffs ANS untersucht. Der Farbstoff bindet unter Erhöhung der Fluoreszenzintensität und Blauverschiebung des Fluoreszenzmaximums an exponierte hydrophobe Oberflächen und wird beispielsweise genutzt, um *molten globule state* Intermediate [242] oder Fibrillen nachzuweisen [30]. Unter der Voraussetzung, dass es während der Entfaltung oder Aggregation von PABPN1 zur Exposition hydrophober Reste kommt, kann der Farbstoff zur Detektion der Temperatur-induzierten Denaturierung von PABPN1 verwendet werden (Kapitel 2.2.5.8). Es wurde angenommen, dass der Farbstoff auch bei höheren Temperaturen in Sättigung vorlag. Anhand der ANS-Fluoreszenz bei 480 nm wurde für WT-PABPN1,  $\Delta$ Cys-PABPN1 und SH-PABPN1 ein Anstieg der Fluoreszenzintensität in dem Temperaturbereich beobachtet, in welchem mit einer Denaturierung oder Aggregation zu rechnen war (Abbildung 43 B). Die Variante dS-PABPN1 bildete auch hier eine Ausnahme, da kein Anstieg der ANS-Fluoreszenzintensität bei erhöhter Temperatur sichtbar war. Der Grund war vermutlich die geringere Aggregationstendenz dieser Variante bei thermischer Denaturierung.

Unter Einbeziehung der Messwerte aus Kapitel 3.2.2.2 wurden die Übergangsmittelpunkte der Messkurven der Temperatur-induzierten Denaturierung anhand der Wendepunkte abgeschätzt (Tabelle 27). Die thermische Denaturierung von WT-PABPN1 und  $\Delta$ Cys-PABPN1 erfolgte in einem Temperaturbereich, welcher jenem der entsprechenden isolierten RNP-Domänen entsprach (Kapitel 3.2.1.4). Aus den Daten ist zu schließen, dass hauptsächlich die Stabilität der RNP-Domäne die Stabilität des Volllängen-Proteins bestimmt. Diese Annahme könnte auch für dS- und SH-PABPN1 gelten, eine direkte Bestätigung war jedoch nicht möglich.

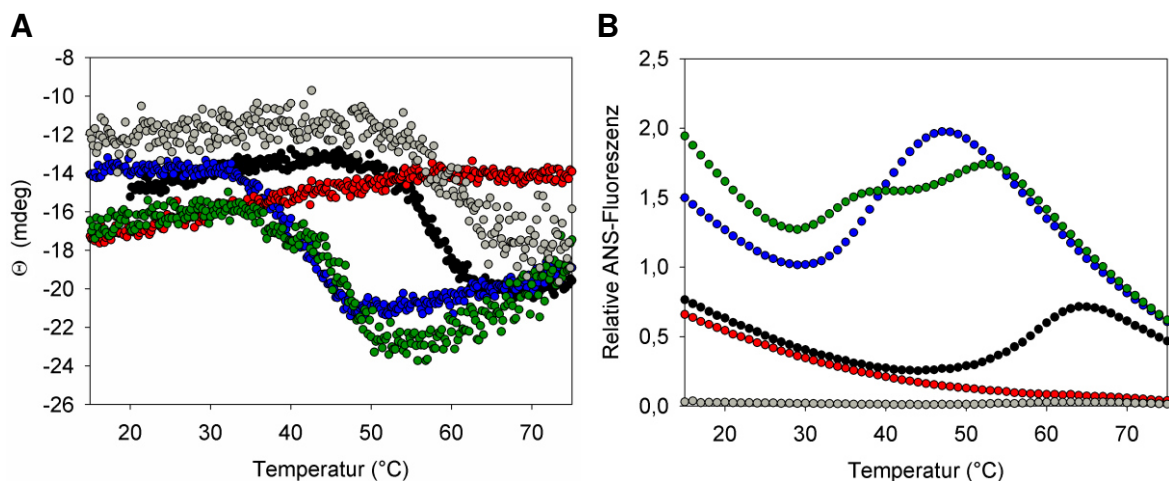


Abbildung 43: Temperatur-induzierte Denaturierung von PABPN1-Varianten. Die Messungen erfolgten in PABPN1-Puffer<sup>k</sup> wie in Kapitel 2.2.5.8 beschrieben. WT-PABPN1 (●),  $\Delta$ Cys-PABPN1 (●), dS-PABPN1 (●), SH-PABPN1 (●) und WT-RNP (●). (A) CD-Signal bei 220 nm. (B) ANS-Fluoreszenzmessung unter Anregung bei 370 nm. Ausgewertet wurde das Integral der Messwerte zwischen 470 und 500 nm.

Protein	Streulicht-Signal bei 360 nm	CD-Signal bei 220 nm	ANS-Fluoreszenz bei 480 nm
WT-PABPN1	54 °C	58 °C	55 °C
$\Delta$ Cys-PABPN1	37 °C	42 °C	38 °C
dS-PABPN1	65 °C	-	-
SH-PABPN1	35 °C	44 °C	41 °C

Tabelle 27: Apparente Übergangsmittelpunkte der Temperatur-induzierten Denaturierung von PABPN1-Varianten anhand verschiedener Messmethoden (abgelesen aus Abbildung 32 und Abbildung 43).



## 8.7 Vollständige Fibrillierungskinetik von PABPN1

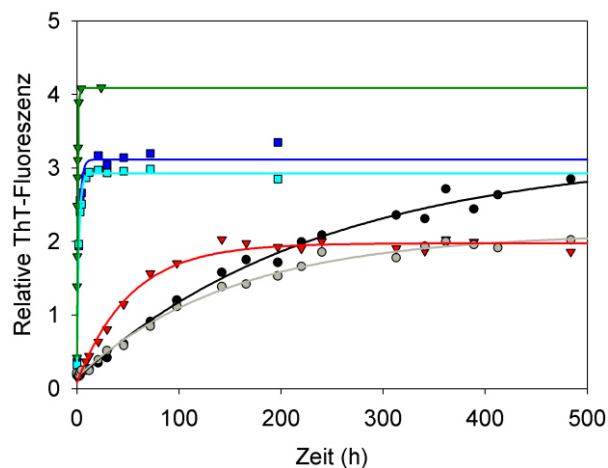


Abbildung 44: Vollständige Fibrillierungskinetik der PABPN1-Varianten. Die Fibrillierungsansätze in PABPN1-Puffer wurden bei 20 °C und einer Proteinkonzentration von 60  $\mu$ M inkubiert. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurden Proben entnommen und die Fibrillenbildung anhand der Fluoreszenzintensität des Farbstoffs ThT bei 482 nm verfolgt. WT-PABPN1 (Punkte; grau, 0 mM DTT; schwarz, 10 mM DTT),  $\Delta$ Cys-PABPN1 (Quadrate; hellblau, 0 mM DTT; dunkelblau, 10 mM DTT), dS-PABPN1 (nach unten zeigende Dreiecke; rot, 0 mM DTT) und SH-PABPN1 (nach unten zeigende Dreiecke; grün, 100 mM DTT). Die durchgezogenen Linien entsprechen hyperbolen *fits* entsprechend Gleichung 30.

## 8.8 Stabilität der Disulfidbrücke von dS-PABPN1 bei der Fibrilierung

Da sich dS-PABPN1 trotz der Disulfidbrücke verzögert zu Fibrillen umlagerte, sollte getestet werden, ob die Disulfidbrücke während des Fibrillierungsprozesses stabil bleibt. Eine Neuverknüpfung von Disulfidbrücken wurde beispielsweise während der Dimerisierung bzw. Oligomerisierung des Prion-Proteins beschrieben [69, 243]. Um die Stabilität der Disulfidbrücke zu überprüfen, wurde dS-PABPN1 parallel in Anwesenheit und Abwesenheit von Iodacetamid fibrilliert. Sollte es während der Fibrillierung zu einem spontanen Öffnen der Disulfidbrücke kommen, könnten die freien Cystein-Reste durch Iodacetamid carbamidomethyliert werden. Falls die Disulfidbrücke instabil werden würde, könnte dies zu einer beschleunigten Fibrillierung führen, ähnlich wie dies für die reduzierte Variante SH-PABPN1 beobachtet wurde. Hinsichtlich der Fibrillierungskinetik ließ sich jedoch kein Unterschied in Gegenwart von Iodacetamid feststellen (Abbildung 45). Dies deutet darauf hin, dass die Disulfidbrücke während der Fibrillierung intakt bleibt. Außerdem wurde bei elektronenmikroskopischen Aufnahmen festgestellt, dass auch in der Anwesenheit von Iodacetamid Fibrillen gebildet werden (Abbildung 46 A). Vermutlich können daher Auswirkungen auf den Fibrillierungsmechanismus ausgeschlossen werden.

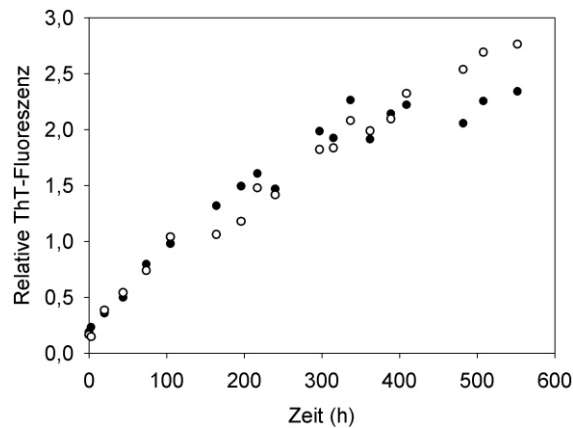


Abbildung 45: Kinetik der Fibrillenbildung von dS-PABPN1. Die Fibrillierungsansätze wurden in PABPN1-Puffer bei einer Proteinkonzentration von 40  $\mu$ M und 20  $^{\circ}$ C inkubiert. Die Fibrillenbildung wurde anhand der ThT-Fluoreszenzintensität bei 482 nm verfolgt. dS-PABPN1 wurde in Abwesenheit (●) und in Gegenwart von 20 mM Iodacetamid (○) fibrilliert.

Zur Überprüfung, ob die Disulfidbrücke intakt bleibt, wurden die Fibrillierungsansätze nach einer Inkubationszeit von 500 h mittels SDS-PAGE analysiert. Im Laufverhalten war kein signifikanter Unterschied zwischen in Abwesenheit und in Gegenwart von Iodacetamid fibrilliertem dS-PABPN1 ersichtlich. Beide Proben waren im Gel bei scheinbar geringerem Molekulargewicht als die vollständig reduzierte bzw. die vollständig modifizierte Probe sichtbar (Abbildung 46 B). Folglich kann davon ausgegangen werden, dass es während der Inkubationszeit des Fibrillierungsexperiments nicht zu einer Modifikation mit Iodacetamid kommt. Die Disulfidbrücke bleibt während der Fibrillierung sehr wahrscheinlich intakt.

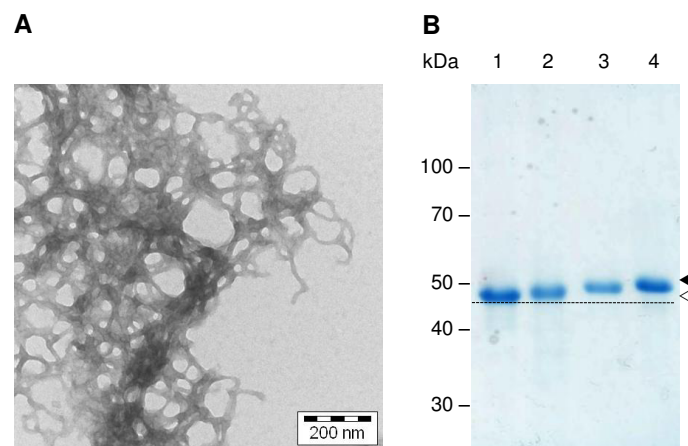


Abbildung 46: Analyse der Fibrillen von dS-PABPN1. (A) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von dS-PABPN1, fibrilliert in Gegenwart von 20 mM Iodacetamid. (B) SDS-Polyacrylamid-Gel zur Analyse von Fibrillen. dS-PABPN1 wurde in PABPN1-Puffer ohne Iodacetamid (1) und in PABPN1-Puffer mit 20 mM Iodacetamid fibrilliert (2). In Abwesenheit von Iodacetamid fibrilliertes dS-PABPN1 wurde im Nachhinein vollständig reduziert und durch Iodacetamid modifiziert (3) oder durch 100 mM DTT vollständig reduziert (4). Die intakte Disulfidbrücke von dS-PABPN1 bewirkt ein Laufverhalten bei scheinbar geringerem Molekulargewicht ( $\triangleleft$ ) im Vergleich zu vollständig reduziertem dS-PABPN1 ( $\blacktriangleleft$ ). Die Unterschiede im Laufverhalten sind durch eine gepunktete Linie verdeutlicht.

## Danksagung

Ich möchte hiermit allen Personen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. Elisabeth Schwarz danke ich für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Möglichkeit, hier meine Promotion anzufertigen. Ich bedanke mich besonders für die flexible Gestaltung des Projekts, sodass ich ab der zweiten Hälfte der Promotion das Thema „RNP-Domäne“ übernehmen durfte. Außerdem danke ich für die gute Betreuung, die ständige Diskussionsbereitschaft und die freundliche Atmosphäre während der ganzen Zeit.

Ich danke PD Dr. Ralph Golbik für die umfangreiche Unterstützung rund um die Themen Thermodynamik und Faltungskinetiken, für die praktische Hilfe an den *stopped-flow*-Maschinen, für die Diskussionen meiner Daten bei der Erstellung des „RNP-Domäne-Papers“ und die wertvollen Hinweise bei der schriftlichen Fertigstellung der Arbeit.

PD Dr. Hauke Lilie danke ich für viele experimentelle Tipps und hilfreiche Diskussionen zu meinem Thema und die Hilfe bei der analytischen Ultrazentrifugation.

Bei Dr. Dr. Gerd Hause bedanke ich mich für die Geduld bei der Aufnahme unzähliger Bilder mit dem Elektronenmikroskop.

Dr. Christoph Parthier danke ich für die Unterstützung des Projekts durch die computer-gestützte Modellierung von Disulfidbrücken in die RNP-Domäne.

Frau Dr. Angelika Schierhorn spreche ich meinen Dank für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen aus.

Für die Erklärungen und praktische Hilfe bei den DSC-Messungen danke ich Dr. Tino Thieme.

Ich danke den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier, vor allem Dr. Marcell Lederer, Dr. Nadine Stöhr und Marcel Köhn für Hilfe und Ratschläge bei Zellkultur-Methoden und der Immunfluoreszenzmikroskopie.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Elmar Wahle, besonders Dr. Uwe Kühn, Dr. Claudia Weißbach, Dr. Christiane Rammelt und Dr. Christiane Harnisch danke ich für wertvolle Tipps bei der Selektion stabiler Zelllinien und die Möglichkeit, im Radioaktivlabor die Bindung von PABPN1 an RNA zu untersuchen.

Ich danke Prof. Dr. Jochen Balbach und Dr. Tobias Gruber für die Möglichkeit *stopped-flow*-Fluoreszenz-Messungen an ihren Messgeräten durchzuführen. Dr. Cordelia Schiene-Fischer danke ich für die Messzeit an den *stopped-flow*-CD-Geräten.

Christiane Harnisch danke ich besonders für die vielen vorbereitenden Arbeiten, mit denen sie uns im Labor stets zur Seite stand. Mein Dank gilt außerdem Uta Best für die Unterstützung bei der Fermentation der PABPN1-Varianten – ohne diese Hilfe wäre eine ausreichende Produktion dieser Varianten kaum möglich gewesen.

Ein großes Dankeschön richte ich an alle Diplom-, Bachelor- und Masterstudenten, die mich bei meinem Thema tatkräftig unterstützten oder das GDF-5-Projekt bereicherten: Steffen Damm, Julia Hennicke, Karen Hertel, Felix Neumann und Katharina Schulz. Sandra Grund und Sarah Vorndran danke ich für die Reinigung verschiedener Proteine während ihrer Praktika.

Mein besonderer Dank für die angenehme Arbeitsatmosphäre gilt außerdem Dr. Reno Winter, Dr. Silke Kuhfahl, Dr. Christian Ursel, Martin Voigtmann, Franziska Gehle, Marcus Böhme, Anja Greschuchna, Peter Enke und Philipp Zimmermann sowie allen anderen Mitarbeitern der AG Schwarz und des Instituts für Biochemie und Biotechnologie, welche hier nicht namentlich erwähnt sind. Es waren unvergessliche und schöne Zeiten mit euch allen während der Kaffeepausen, Film- und Spieleabende sowie der jährlichen Kirschblütenfeste im Institut.

Zum Abschluss möchte ich ganz besonders meinen Eltern Hannelore und Jürgen Liebold danken. Ich danke euch für die Unterstützung über die ganze Zeit des Studiums und der Promotion. Ich danke euch, weil ihr immer an mich geglaubt habt und bei all meinen Entscheidungen zu mir gehalten habt.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

---

Jens Liebold

geboren am 27.07.1985 in Greiz

Staatsangehörigkeit: deutsch

## Studium

---

07/2015 bis 12/2015 Schriftliche Fertigstellung Dissertation

01/2011 bis 06/2015 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter** an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; AG Rekombinante therapeutische Proteine (Prof. Dr. Elisabeth Schwarz)

10/2010 bis 12/2010 **Wissenschaftliche Hilfskraft** an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; AG Membranproteine (Dr. Peter Hanner)

10/2005 bis 09/2010 **Studium der Biochemie** an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; Studium Note 1,5; Diplomarbeit in der Abteilung Technische Biochemie (Prof. Dr. Rainer Rudolph); Thema: „Rekonstitution des humanen Parathormon Rezeptors 1 in Nanodiscs“; Diplomarbeit Note 1,1

## Praktika und Nebenjobs

---

03/2009 bis 08/2009 Nebenjob bei Scil Proteins Production GmbH in Halle (Saale); Probenentnahme in der GMP-Produktionsanlage

08/2008 bis 09/2008 Praktikum bei Scanbec GmbH in Halle (Saale); Validierung eines molekularbiologischen Schnelltests

## Zivildienst

---

07/2004 bis 04/2005 Hol- und Bringedienst Kreiskrankenhaus Greiz GmbH

## Schulbildung

---

08/1996 bis 06/2004 Staatliches Gymnasium Greiz; Abschluss Abitur; Note 1,8

## Publikationen

Liebold, J., Winter, R., Golbik, R., Hause, G., Parthier, C. and Schwarz, E. (2015). Conformational stability of the RNP domain controls fibril formation of PABPN1. Protein Science, Volume 24, 1789-1799.

Thieme, T., Patzschke, R., Job, F., Liebold, J., Seemann, P., Lilie, H., Balbach, J. and Schwarz, E. (2014). Biophysical and structural characterization of a folded core domain within the proregion of growth and differentiation factor-5. FEBS Journal, Volume 281, Issue 21, 4866-4877.

Winter, R., Liebold, J. and Schwarz, E. (2013). The unresolved puzzle why alanine extensions cause disease. Biol. Chem., 394, 951-963.

## Präsentationen und Poster

Vortrag mit dem Titel: „Cell Culture Model for PABPN1 Fibrillation Assays“ bei einem Workshop des Sonderforschungsbereichs „SFB 610“ in Oppurg am 17.11.2011.

Poster mit dem Titel: “The conformational stability of the RNP domain controls fibril formation of PABPN1” bei den Faltertagen 2015; 23.-25. Oktober; Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg; Melanchthonianum; Universitätsplatz 9 in Halle (Saale).

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe, nur unter Benutzung der aufgeführten Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden als solche gekennzeichnet.

Ich versichere weiterhin, dass ich mich mit dieser Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe. Ich habe mich mit der vorliegenden Arbeit weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg noch an einer anderen Einrichtung um die Erlangung eines akademischen Grades beworben.

Jens Liebold

Halle (Saale), 21.12.2015