

Untersuchungen zum Einfluss von Polyalaninsequenzen auf die Bildung amyloider Fibrillen von PABPN1

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

vorgelegt der
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Till Scheuermann
geb. 12. 04. 1972 in Freiburg im Breisgau

urn:nbn:de:gbv:3-000005723

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000005723>]

Gutachter:

1. Prof. Dr. R. Rudolph
2. Prof. Dr. U. Baumann
3. Prof. Dr. E. Wahle

Verteidigt am 6. November 2003

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Trinukleotidexpansionen als Ursache genetisch bedingter Krankheiten	1
1.2	Okulopharyngeale Muskeldystrophy (OPMD)	4
1.2.1	Das nukleäre Poly(A)-Bindungsprotein 1 (PABPN1).....	5
1.2.1.1	Polyalaninsequenzen in der Natur	7
1.2.2	Intranukleäre fibrilläre Strukturen im Fall der OPMD	8
1.3	Strukturelle Eigenschaften von amyloiden Fibrillen.....	9
1.4	Problemstellung.....	11
2	Materialien und Methoden.....	12
2.1	Materialien.....	12
2.1.1	Chemikalien.....	12
2.1.2	Standards.....	13
2.1.3	Proteine, Enzyme und Peptide.....	13
2.1.4	Säulenmaterialien	13
2.1.5	Sonstige Materialien	14
2.1.6	Geräte.....	14
2.1.7	<i>E. coli</i> -Stämme	14
2.1.8	Primer und Plasmide.....	15
2.2	Methoden.....	16
2.2.1	DNA-Amplifikation mit PCR.....	16
2.2.2	Ortsspezifische Mutagenese	16
2.2.3	Konstruktion der Expressionsplasmide	17
2.2.4	Anzucht von <i>E. coli</i>	18
2.2.4.1	Schüttelkolbenanzucht.....	19
2.2.4.2	Fed-Batch Fermentation	19
2.2.5	Reinigung der überexprimierten Proteine.....	19
2.2.5.1	Reinigung von PABPN1, PABPN1-(+7)Ala und PABPN1-ΔAla	21

2.2.5.2	Reinigung von N-WT, N-ΔAla und N-(+7)Ala.....	21
2.2.5.3	Reinigung der RNP-Domäne.....	22
2.2.5.4	Reinigung der RNP-Domäne mit N-terminaler α-Helix (α-RNP).....	23
2.2.6	Konzentrierung von Proteinlösungen	23
2.2.7	Lyophilisation von Proteinlösungen.....	23
2.2.8	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	23
2.2.9	N-terminale Sequenzanalyse	24
2.2.10	Massenspektrometrie	24
2.2.11	Fluoreszenzspektroskopie.....	24
2.2.12	Chemisch induzierte Entfaltungs- und Rückfaltungsübergänge.....	25
2.2.13	Detektion amyloider Fibrillen durch ThT- und ANS-Fluoreszenzmessungen.....	26
2.2.14	Analytische Ultrazentrifugation.....	26
2.2.15	Circular dichroismus.....	27
2.2.16	Oberflächenplasmonresonanz.....	27
2.2.17	Proteinkristallisation.....	29
2.2.18	Bromcyanspaltung von N-(+7)Ala	29
2.2.19	Elektronenmikroskopie.....	30
2.2.20	Präparation von <i>seeds</i>	30
2.2.21	Kongorotfärbung.....	30
2.2.22	FT-IR-Spektroskopie	31
3	Ergebnisse	32
3.1	Charakterisierung von PABPN1	32
3.1.1	Expression und Reinigung von PABPN1	32
3.1.2	Spektrale Eigenschaften von PABPN1.....	34
3.1.3	Thermische und chemische Stabilität	35
3.1.4	Limitierte Proteolyse von PABPN1.....	37
3.2	Untersuchungen einzelner Domänen von PABPN1	39
3.2.1	Expression und Reinigung der N-terminalen Domäne (N-WT).....	39
3.2.2	Charakterisierung von gereinigtem N-WT	40
3.2.3	Expression und Reinigung von RNP und α-RNP	41
3.2.3.1	Charakterisierung von RNP und α-RNP mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie.....	42
3.2.3.2	Untersuchungen zur Oligomerisierung von RNP und α-RNP	43

3.2.3.3	Wechselwirkung der RNP-Domäne mit ssRNA.....	45
3.2.3.4	Stabilität der RNP-Domäne gegenüber chemischen Denaturierungsmitteln.....	47
3.2.3.5	Kristallisation einzelner Domänen zur Aufklärung der 3D-Struktur	49
3.3	Untersuchungen zum Einfluss der Alaninexpansion und Alanindeletion auf PABPN1	51
3.3.1	Expression und Reinigung von PABPN1-(+7)Ala und PABPN1-ΔAla	51
3.3.2	Untersuchungen zur Struktur und Stabilität von PABPN1-(+7)Ala und PABPN1-ΔAla.....	52
3.4	Untersuchungen zum Einfluss der Alaninexpansion und Alanindeletion auf die N-terminale Domäne von PABPN1	54
3.4.1	Expression und Reinigung von N-(+7)Ala und N-ΔAla	54
3.4.2	Strukturelle Charakterisierung von N-(+7)Ala und N-ΔAla	55
3.4.3	Untersuchung zur Fibrillenbildung der N-terminalen Domänen.....	56
3.4.4	Einfluss des His-tags auf die Fibrillenbildung von N-(+7)Ala	59
3.4.4.1	Bromcyanspaltung von N-(+7)Ala	59
3.4.4.2	Fibrillenbildung von N-(+7)Ala ohne His-tag.....	60
3.4.5	Charakterisierung der Fibrillen der N-terminalen Domäne.....	61
3.4.5.1	Bindung von Kongorot an Fibrillen der N-terminalen Domäne N-(+7)Ala.....	61
3.4.5.2	Untersuchung der Fibrillen von N-(+7)Ala und N-WT mittels FT-IR-Spektroskopie	62
3.4.5.3	Ermittlung der Sekundärstrukturanteile mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie	64
3.4.5.4	Röntgenbeugung von Filamenten aus N-(+7)Ala.....	65
3.4.5.5	Resistenz der Fibrillen gegenüber chemischen Reagenzien und Proteinase K	66
3.4.6	Kinetische Untersuchungen zur Fibrillenbildung.....	67
3.4.6.1	Nachweis von Fibrillen der N-terminalen Domäne mit ANS	67
3.4.6.2	Konzentrationsabhängigkeit der Fibrillenbildung	69
3.4.7	Induktion der Fibrillierung durch die Zugabe von <i>seeds</i>	70
3.4.7.1	Induzierte Fibrillierung von N-(+7)Ala.....	71
3.4.7.2	Einfluss der <i>seed</i> -Konzentration auf das Fibrillenwachstum mit N-(+7)Ala	72
3.4.7.3	Einfluss der Proteinkonzentration auf das Fibrillenwachstum	73
3.4.7.4	Vergleich der initialen Wachstumsraten von N-WT, N-(+7)Ala und N-ΔAla.....	74
3.4.8	Unterdrückung der Fibrillierung durch Trifluorethanol	76

4	Diskussion.....	79
4.1	Strukturelle Charakterisierung von PABPN1	79
4.2	Einfluss der Polyalaninsequenz auf PABPN1.....	82
4.3	Fibrillenbildung der N-terminalen Domänen.....	83
4.4	Strukturelle Charakterisierung der Fibrillen aus N-(+7)Ala und N-WT	86
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	90
6	Literaturverzeichnis	92

Abkürzungen

A ₁₅	Einzelstrang RNA bestehend aus 15 Adenylatresten
Aß-Peptid	die ersten 39-42 Aminosäuren des Amyloid-Vorläuferproteins
ANS	1-Anilino-8-naphtalensulfonat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	Rinderserumalbumin
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Elektronenmikroskopie
ESI	Elektrospray-Ionisation
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HPSF	<i>High Purity Salt Free</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
K _D	Gleichgewichts-Dissoziationskonstante
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation</i>
MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i>
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
NTA	Nitrilotri-Essigsäure
N-WT	N-terminale Domäne von PABPN1
N-(+7)Ala	N-terminale Domäne von PABPN1-(+7)Ala
N-ΔAla	N-terminale Domäne von PABPN1-ΔAla
OPMD	Okulopharyngeale Muskeldystrophie
PABPN1	nukleäres Poly(A)-Bindungsprotein 1 (Wildtyp)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNP	Ribonukleoprotein
RP-HPLC	<i>Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RRM	eukaryotisches RNA-Erkennungsmotiv
SDS	Natriumdodecylsulfat
ssRNA	Einzelstrang RNA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFE	Trifluorethanol
ThT	Thioflavin T
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
U1A	Komponente des kleinen Kern-Ribonukleoproteinpartikel U1
UTR	<i>Untranslated Region</i>
v	Volumen
V _t	Säulenvolumen
w	Gewicht
Xaa	beliebige Aminosäure

Begriffserklärungen

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

Fibrillierung	Übergang von Proteinmolekülen vom löslichen Zustand in den unlöslichen fibrillierten Zustand, unabhängig von der Anwesenheit von <i>seeds</i>
Fibrillenbildung	Fibrillierung ohne die Zugabe von <i>seeds</i>
Fibrillenwachstum	Verlängerung von <i>seeds</i> durch die Fibrillierung von Proteinmolekülen;
<i>lagphase</i>	Inkubationszeit in der keine Fibrillierung nachgewiesen werden konnte
Nukleationskeim	erstes stabiles Oligomer bei der Fibrillenbildung
<i>seeds</i>	fragmentierte Fibrillen
Wachstumsrate	Fibrillenwachstum pro Zeiteinheit

1 Einleitung

1.1 Trinukleotidexpansionen als Ursache genetisch bedingter Krankheiten

Mit der vollständigen Sequenzierung des humanen Genoms konnte in den letzten Jahren eine Reihe von genetisch bedingten Krankheiten beschrieben werden, deren Gemeinsamkeit eine Trinukleotidexpansion im betreffenden Gen ist. In den meisten Fällen besitzt das Wildtyp-Allel eine relativ geringe Anzahl aufeinanderfolgender identischer Trinukleotide, wobei die Anzahl individuell variieren kann. Bei erkrankten Menschen beobachtet man eine erhöhte Anzahl dieser repetitiven Trinukleotide. Als mögliche Ursache für die Erweiterung der Trinukleotidsequenzen werden Ungenauigkeiten bei der DNA-Replikation oder ein ungleiches *crossing-over* diskutiert (Nakamoto *et al.*, 2002; Warren, 1997; Wells, 1996).

Krankheiten in Verbindung mit einer Trinukleotidexpansion können in zwei Kategorien eingeteilt werden. Zur ersten Kategorie zählen Krankheiten mit Trinukleotidexpansionen im nicht kodierenden Bereich (UTR). So weist z.B. beim Fragilen X Syndrom das *FMR1*-Gen eine Expansion im 5'-UTR auf. Diese führt zu einer Hypermethylierung und in der Folge zu einer Reduktion der *FMR1*-Transkription und letztlich zum Ausfall des Genprodukts (Pimentel, 1999). Eine Trinukleotidexpansion im 3'-UTR wurde bei dem Kinase-Gen *DMPK* bei der Myotonischen Dystrophie beobachtet (Brook *et al.*, 1992). Als Folge der Trinukleotidexpansion wird eine Schwankung der Protein-Kinase-Konzentration diskutiert, die zu einer abnormen Phosphorylierung der Proteine in der Zelle führt. Außerdem könnte aufgrund der Trinukleotidexpansion des Transkripts durch einen trans-dominanten Effekt die Prozessierung anderer RNAs beeinträchtigt werden (Amack *et al.*, 1999).

In der zweiten Kategorie werden Krankheiten, die sich auf eine Trinukleotidexpansion im kodierenden Bereich des Gens zurückführen lassen, zusammengefasst. Sie resultieren in einer Verlängerung einer Polyaminosäuresequenz in dem entsprechenden Protein. Bei den bisher bekannten Krankheiten sind die Triplets der Aminosäuren Leucin, Alanin und Glutamin betroffen. Prominentestes Beispiel ist die Verlängerung einer Polyglutaminsequenz bei Chorea Huntington. Inzwischen konnten weitere acht Krankheiten auf eine Glutaminexpansion

zurückgeführt werden. Allen Krankheiten gemeinsam ist eine progressive neuronale Funktionsstörung, die im mittleren Alter auftritt und zu einer schweren Neurodegeneration führt. Je länger die Glutaminexpansion ist, desto früher und schwerwiegender treten die Symptome auf. Die Krankheiten werden meist dominant vererbt. Eine Übersicht über die Länge der Glutaminexpansionen in gesunden und erkrankten Individuen ist in Tab 1.1 dargestellt.

Tab. 1.1 Erkrankungen, bei denen eine expandierte Polyglutaminsequenz als Krankheitsursache vermutet wird.

Krankheit	Protein	Anzahl der Glutaminreste in		Referenz
		gesunden Individuen	erkrankten Individuen	
DRPLA	Atrophin	6-35	49-88	Cummings & Zoghbi, 2000
HD	Huntingtin	6-35	36-121	Cummings & Zoghbi, 2000
SBMA	Androgen-Rezeptor	10-36	40-62	Gusella & MacDonald, 2000
SCA1	Ataxin-1	6-44	39-82	Cummings & Zoghbi, 2000
SCA2	Ataxin-2	14-31	34-64	Cancel <i>et al.</i> , 1997; Riess <i>et al.</i> , 1997a
SCA3 (MJD)	Ataxin-3	12-40	55-84	Cummings & Zoghbi, 2000
SCA6	α_{1A} -spannungsabhängige Calciumkanal-Untereinheit	6-17	21-30	Matsuyama <i>et al.</i> , 1997; Riess <i>et al.</i> , 1997b
SCA7	Ataxin-7	4-35	37-306	Cummings & Zoghbi, 2000
SCA17	TATA-Bindungs-Protein	29-42	47-55	Nakamura, 2001

DRPLA = Dentatorubral Pallidolusyan Atrophy, HD = Huntington Disease, MJD = Machado-Joseph Disease, SBMA = Spinal Bulbar Muscular Atrophy, SCA = Spinocerebellar Ataxia

Zahlreiche Untersuchungen beschäftigen sich mit der Frage, welche Rolle die expandierten Polyglutaminsequenzen bei den beobachteten Erkrankung spielen. Viele Ergebnisse deuten darauf hin, dass die expandierten Polyglutaminsequenzen zur Bildung von Proteinaggregaten führen, wie sie auch bei Patienten der Alzheimer- und Parkinson-Krankheit beobachtet werden. Synthetische Polyglutaminpeptide aggregieren z. B. in Lösung zu einer ausgeprägten β -Faltblattstruktur (Perutz *et al.*, 1994). Transgene Mäuse, die ein Huntingtin-Protein mit einer expandierten Polyglutaminsequenz exprimierten, zeigten die gleichen Symptome wie an Huntington erkrankte Patienten (Mangiarini *et al.*, 1996). Die Neuronen enthielten mikroskopisch sichtbare intranukleäre Aggregate, die mit Antikörpern gegen Huntingtin und Ubiquitin reagierten (DiFiglia *et al.*, 1997). Sogar die Fusion einer Polyglutaminsequenz an ein Protein, welches in keinem Zusammenhang mit den oben

genannten Krankheiten steht, führte in transgenen Mäusen zu Symptomen, wie sie für Huntington bekannt sind (Ordway *et al.*, 1997). Für Ataxin-3 mit einer expandierten Polyglutaminsequenz wurden *in vitro* Fibrillen beobachtet, welche die gleichen charakteristischen Eigenschaften besaßen, wie sie bei den amyloiden Aβ-Fibrillen in der Alzheimer Krankheit vorkommen (Bevivino & Loll, 2001). Bei Zellkulturexperimenten führte die Expression eines Ataxin-3-Fragments mit expandierter Polyglutaminsequenz zum Zelltod (Ikeda *et al.*, 1996). Fibrilläre Aggregate wurden auch im Gewebe von Patienten mit Chorea Huntington, Spinocerebellar Ataxia Typ 1 und Typ 3 beobachtet (DiFiglia *et al.*, 1997; Lieberman *et al.*, 1999). Einige Befunde sprechen dafür, dass die nukleären Aggregate in den Neuronen ein einheitlich pathologische Kennzeichen dieser Krankheiten sind (Ross, 1997). Trotzdem ist noch unklar, ob die nukleären Aggregate Auslöser der Krankheit sind oder nur im Verlauf der Krankheit gebildet werden.

Während bisher nur ein Fall einer Leucinexpansion beschrieben wurde, sind inzwischen sechs Krankheiten bekannt, die in Zusammenhang mit einer Alaninexpansion des Genprodukts gebracht werden (Holmes *et al.*, 2001; Utsch *et al.*, 2002). Im Unterschied zu den Glutaminexpansionen ist die Länge der Alaninexpansionen deutlich geringer. Eine Übersicht über die bisher beobachteten Alaninexpansionen ist in Tab 1.2 gezeigt.

Tab. 1.2 Erkrankungen, bei denen eine expandierte Polyalaninsequenz als eine Krankheitsursache vermutet wird.

Krankheit	Protein	Anzahl der Alaninreste in		Referenz
		gesunden Individuen	erkrankten Individuen	
BPES	FOXL2	14	10	Crisponi, et al., 2001
XLMR	ARX	12,16	20,23	Bienvenu <i>et al.</i> , 2002; Stromme <i>et al.</i> , 2002
HFGS	HOXA13	18	24,26	aus Utsch <i>et al.</i> , 2002
HPE	ZIC2	15	25	aus Utsch <i>et al.</i> , 2002
SPD	HOXD13	15	22-29	aus Utsch <i>et al.</i> , 2002
OPMD	PABPN1	10	12-17	aus Utsch <i>et al.</i> , 2002

BPSE = Blepharophimosis Ptosis Epicanthus Inversus Syndrome, FOXL2 = Forkhead Transcription Factor, HFGS = Hand Foot Genital Syndrome, SPD = Synpolydactyly, HPE = Holoprosencephaly, OPMD = Okulopharyngeale Muskeldystrophie, XLMR = X-linked Mental Retardation, ARX = Aristaless Related Homeobox Protein ZIC2 = Zinc Finger Protein

Bei fünf der sechs aufgelisteten Krankheiten sind Gene von Transkriptionsfaktoren betroffen. Die Ausnahme bildet die Okulopharyngeale Muskeldystrophie (OPMD). Bei dieser

Krankheit ist das Gen von PABPN1^{*}, einem Protein, das bei der Prozessierung eukaryotischer mRNA beteiligt ist, betroffen. Auch bei den Symptomen hebt sich die OPMD von den anderen Krankheiten ab. Während die Trinukleotidexpansionen bei den meisten Transkriptionsfaktoren zu Missbildungen oder geistiger Behinderung führen, und die Patienten schon in der Embryonalentwicklung bzw. in sehr frühem Alter von der Krankheit betroffen sind, erscheinen die Symptome der OPMD erst im fortgeschrittenen Alter.

1.2 Okulopharyngeale Muskeldystrophy (OPMD)

OPMD ist eine progressive, autosomal dominant vererbte Krankheit, die meist erst ab dem fünfzigsten Lebensjahr in Erscheinung tritt. Erste Symptome sind oftmals hängende Augenlider. Viel schwerwiegender sind jedoch die Schluckbeschwerden, die bei fortschreitender Krankheit eine ausreichende Ernährung gefährden können. Eine Schwächung der Gesichtsmuskulatur und der Muskulatur der proximalen Extremitäten wird erst in den späteren Krankheitsstadien beobachtet (Tome & Fardeau, 1994). Die Krankheit ist weltweit verbreitet, besonders häufig tritt sie jedoch bei Kanadiern französischer Abstammung auf. Das abstammungsspezifische Auftreten konnte bis zur Immigration einer Französin aus Westfrankreich nach Quebec zurückverfolgt werden (Scacheri *et al.*, 1999). Genetische Untersuchungen zeigten, dass die Krankheit durch kurze Trinukleotidexpansionen im *PABPN1*-Gen hervorgerufen wird, die zu einer Verlängerung der natürlichen Alaninsequenz von zehn auf 12-17 Alaninreste führt. Bei einem rezessiven Allel, welches in 2 % der französisch-kanadischen Bevölkerung auftritt, ist die Alaninsequenz auf elf Reste erhöht. Ein Zusammenhang zwischen der Länge der Alaninexpansion und einem früheren bzw. schwereren Krankheitsverlauf konnte bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden (Hill *et al.*, 2001). Auch eine Zunahme der Trinukleotidexpansion von einer Generation zur nächsten wird bei OPMD nicht beobachtet (Brais *et al.*, 1998).

^{*} Das Protein wurde ursprünglich als Poly(A)-Bindungsprotein II (PAB II) beschrieben (Wahle, 1991). Nach der Klonierung des menschlichen Gens erfolgte die Benennung zu PABP2. Eine weitere Umbenennung wurde von der NCBI Datenbank und der *human genome organization nomenclature committee* zum nukleärem Poly(A)-Bindungsprotein (PABPN1) veranlasst.

1.2.1 Das nukleäre Poly(A)-Bindungsprotein 1 (PABPN1)

PABPN1 wurde erstmals bei Untersuchungen zur Synthese des Poly(A)-Schwanzes an prä-mRNA beschrieben (Wahle, 1991). Die Prozessierung der prä-mRNA erfolgt in zwei Teilschritten, der endonukleolytischen Spaltung und der Addition eines Poly(A)-Schwanzes (Übersicht in Wahle & Ruegsegger, 1999). Fast alle Eukaryonten führen diese posttranskriptionale Modifizierung am 3'-Ende der primären Transkripte durch, die für deren Transport vom Zellkern in das Zytosol, für die Initiation der Translation und zur Regulation des Abbaus der mRNA benötigt wird (Mitchell & Tollervey, 2000; Nakielnny & Dreyfuss, 1999; Sachs & Varani, 2000). Für die endonukleolytische Spaltung der prä-mRNA wird ein Komplex von fünf Proteinen benötigt. Zwei davon, die Poly(A)-Polymerase und der *cleavage stimulation*-Faktor, sind auch im zweiten Schritt der Prozessierungsreaktion beteiligt. Die Poly(A)-Polymerase katalysiert die Polyadenylierung. Ihre Bindung an die mRNA ist jedoch relativ schwach, und die Prozessivität ist niedrig und ineffizient. Während der *cleavage stimulation*-Faktor eine hochaffine Bindung der Polymerase an die mRNA bewirkt, vermittelt PABPN1 eine effiziente Polyadenylierung. Die Polyadenylierung unterliegt einer Längenkontrolle; ab einer Länge von ca. 250 Adenylatresten verliert die Reaktion ihre Prozessivität. Der Mechanismus der Längenkontrolle ist noch nicht eindeutig geklärt. Diskutiert wird eine sterisch bedingte Auflösung des ternären Komplexes zwischen dem *cleavage stimulation*-Faktor, der Poly(A)-Polymerase und PABPN1. Möglicherweise wächst der Polyadenylierungskomplex durch die Bindung von PABPN1-Molekülen an den wachsenden Poly(A)-Schwanz bis zu einer kritischen Größe, bei der die Wechselwirkung zwischen der Poly(A)-Polymerase und dem *cleavage stimulation*-Faktor verloren geht (Kerwitz, 2002). Unterstützt wird diese Hypothese durch den Nachweis von sphärischen Partikeln bestehend aus Poly(A)-PABPN1-Komplexen, die ihren maximalen Durchmesser von ca. 21 nm bei 200-300 Adenylatresten erreichen (Keller *et al.*, 2000).

Das *PABPN1*-Gen wird ubiquitär im Gewebe transkribiert, wobei in der Skelettmuskulatur eine erhöhte Expressionsrate gemessen wurde (Brais *et al.*, 1998). Das Protein bindet mit hoher Affinität und Spezifität an RNA und ist überwiegend im Zellkern lokalisiert (Krause *et al.*, 1994). Durch einen aktiven Transport kann PABPN1 aber auch zwischen dem Zellkern und dem Zytosol hin und her wechseln - eine Eigenschaft, die eine Beteiligung von PABPN1 am RNA-Transport in das Zytosol vermuten lässt (Calado *et al.*, 2000a).

PABPN1 besteht aus 306 Aminosäuren und weist eine Molekularmasse von 33 kDa auf. Abb. 1.1 zeigt eine schematische Darstellung von PABPN1 mit Sekundärstrukturelementen, wie sie durch Strukturvorhersage-Programme ermittelt wurden. Direkt nach dem Startmethionin befindet sich eine Sequenz aus zehn aufeinanderfolgenden Alaninresten. Bei der Krankheit OPMD führt eine Trinukleotidexpansion im *PABPN1*-Gen zu einer Verlängerung dieser Alaninsequenz auf bis zu 17 Alaninreste. Der N-Terminus enthält einen hohen Anteil an sauren Aminosäuren, insbesondere Glutamate. In Zellkulturexperimenten wurde durch die Expression der ersten 145 N-terminalen Aminosäuren eine erhöhte Transkriptionsrate der muskelspezifischen Gene *MyoD* und *Myogenin* beobachtet; der Mechanismus zur Regulation der Transkription dieser Gene ist bisher noch ungeklärt (Kim *et al.*, 2001). In der Mitte der Aminosäuresequenz von PABPN1 ist ein RNA *recognition motif* (RRM) lokalisiert. Dieses Motiv ist in RNA-bindenden Proteinen weit verbreitet. In der Aminosäuresequenz des RRM's befinden sich ein hochkonserviertes Oktapeptid (RNP-I) und ein Hexapeptid (RNP-II), deren Abfolge ebenfalls konserviert ist (Nagai, 1996).

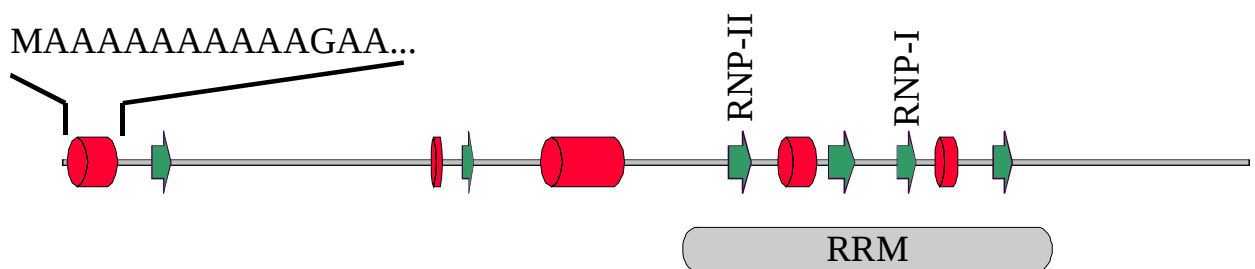


Abb. 1.1: Schematische Darstellung von PABPN1. Sekundärstrukturelemente wurden mit dem Programm PredictProtein am EMBL-Server bestimmt (Rost, 1996). α -helikale Bereiche sind als rote Zylinder, β -Stränge als grüne Pfeile dargestellt.

Die dreidimensionale Struktur einer RNA-Bindungsdomäne von U1A, einem RNA-Bindungsprotein des Ribonukleoprotein-Komplexes, mit der Sequenz eines RRM, ist in Abb. 1.2 dargestellt. Die Sekundärstruktur faltet zu einem viersträngigen antiparallelen β -Faltblatt mit zwei α -Helices in der Abfolge β - α - β - β - α - β , wobei die zwei α -Helices eine Seite des Faltblattes flankieren. Die RNP-I und RNP-II Motive sind in den mittleren β -Strängen lokalisiert. Die RNA bindet an die Oberfläche des β -Faltblatts. Durch die Stapelung der Basen der RNA mit den aus dem β -Faltblatt herausragenden aromatischen Seitenketten der konservierten RNP-I und RNP-II Motive, wird eine hochaffine Bindung erreicht.



Abb. 1.2: Struktur der RNA-Bindungsdomäne von U1A. Die N- und C-Termini der Domäne sind mit N bzw. C gekennzeichnet (Nagai *et al.*, 1990).

Der C-Terminus enthält mehrere Arg-Xaa-Arg Motive, wobei Xaa für eine beliebige Aminosäure steht. Ähnlich wie die Arg-Gly-Gly Motive sollen diese im Zusammenhang mit einem RRM die Affinität des Proteins zur RNA steigern (Bagni & Lapeyre, 1998; Smith *et al.*, 1999). Auch für PABPN1 wird eine Beteiligung des C-Terminus an der RNA-Bindung vermutet (Uwe Kühn, persönliche Mitteilung). Der Argininrest von Arg-Gly-Gly Motiven ist an der Guanidinogruppe zweifach methyliert, eine posttranslationale Modifizierung die ebenfalls bei den Arg-Xaa-Arg Motiven von PABPN1 beobachtet wurde (Kim *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1999). Den Arg-Gly-Gly Motiven wird außerdem eine Rolle bei der Vermittlung von Protein-Protein-Wechselwirkung und der Lokalisierung des Proteins im Nukleus zugeschrieben (Bouvet *et al.*, 1998; Mears & Rice, 1996).

1.2.1.1 Polyalaninsequenzen in der Natur

Polyalaninsequenzen sind in der Natur weit verbreitet. So sind in der SWISS-PROT und TrEMBL Protein-Datenbank über 700 Einträge von Sequenzen mit einer Polyalaninsequenz aus mindestens zehn Alaninresten zu finden. Bekannte Beispiele sind die wiederholten Polyalaninsequenzen in den Proteinen der Spinnenseiden. Diese Alaninsequenzen bilden β -Faltblätter, durch deren hochgeordnete Organisation die Spinnenseide ihre außerordentlichen

mechanischen Eigenschaften erhält (Simmons *et al.*, 1996). Neben ihrer strukturgebenden Rolle in den Spinnenseiden sind keine weiteren Funktionen von Polyalaninsequenzen bekannt. Auffallend ist der überwiegende Anteil an RNA- und DNA-bindenden Proteinen. Von 99 humanen Sequenzen mit einer Polyalaninsequenz sind über 50 RNA- bzw. DNA-bindende Proteine. Die längste bekannte humane Polyalaninsequenz besitzt das *paired mesoderm homeobox protein 2B* mit 20 Alaninresten. Es wird vermutet, dass die Polyalaninsequenzen dieser RNA- bzw. DNA-bindenden Proteine bei der Repression der Transkription beteiligt sind (Galant & Carroll, 2002; Han & Manley, 1993). Experimente zur Bestätigung dieser Vermutung stehen jedoch noch aus.

Die Polyalaninsequenz von PABPN1 ist demnach kein Sonderfall. Der beobachtete Zusammenhang einer verlängerten Polyalaninsequenz von PABPN1 und die bei OPMD-Patienten entdeckten filamentösen Aggregate im Zellkern von Muskelfaserzellen stellt jedoch unter den Proteinen mit einer Polyalaninsequenz eine Ausnahme dar.

1.2.2 Intranukleäre fibrilläre Strukturen im Fall der OPMD

Pathologisches Merkmal von OPMD sind filamentöse Aggregate in Zellkernen von Muskelfaserzellen (Tome & Fardeau, 1980). Die unverzweigten Filamente besitzen einen Durchmesser von ca. 8.5 nm und eine Länge von bis zu 0.25 μm (Abb. 1.3). In den Aggregaten konnte neben PABPN1 und Ubiquitin auch Poly(A)-RNA detektiert werden.

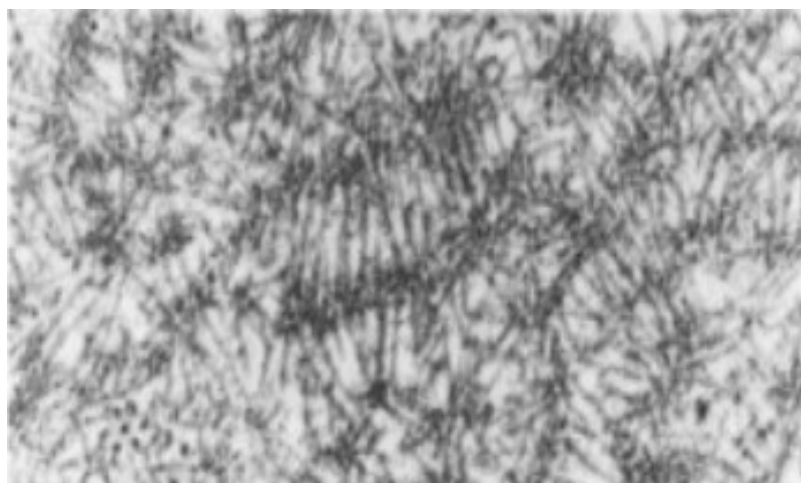


Abb. 1.3: Elektronenmikroskopische Aufnahme von intranukleären Filamenten einer Muskelfaserzelle. Vergrößerung 71000fach (Abbildung aus Tomé & Fardeau, 1980).

Für die Degenerierung der Muskelzellen bei OPMD-Patienten werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert. Die Fibrillen könnten einen direkten toxischen Effekt auf die Zelle ausüben oder durch den Einschluss der mRNA in den Aggregaten zu einem veränderten Expressionsmuster bzw. zum Ausfall von Proteinen in der Zelle führen. Ausgeschlossen werden kann, dass die Funktion von PABPN1 bei der Längenkontrolle des Poly(A)-Schwanzes beeinträchtigt ist. Eine Veränderung der Längenverteilung der Poly(A)-Schwänze in den betroffenen Zellen wurde nicht beobachtet (Calado *et al.*, 2000b).

1.3 Strukturelle Eigenschaften von amyloiden Fibrillen

Ursprünglich wurde der Begriff “amyloid“ (= stärkehaltig) von Virchow 1854 zur Beschreibung von Ablagerungen in Gewebe oder Organen verwendet, die mit Iodlösung blau angefärbt werden konnten. Erst später entdeckte man, dass das Material überwiegend aus Proteinen bestand. Die Anfärbung durch Kongorot, das spezifische Beugungsmuster von Röntgenstrahlen sowie die filamentöse Struktur unter dem Elektronenmikroskop verdeutlichten, dass es sich um einen speziellen fibrillären Proteinzustand handelte. Auch *in vitro* konnten denaturierte Proteine und synthetische Oligopeptide zur spontanen Fibrillenbildung gebracht werden, wenn sie in wässrigem Lösungsmittel aufgenommen wurden (Burke & Rougvie, 1972). Wachsende Bedeutung erlangten diese amyloiden Proteinablagerungen als histologisch nachweisbare Veränderungen bei verschiedenen Erkrankungen. Inzwischen sind ca. 20 Erkrankungen beim Menschen bekannt, einschließlich der *Transmissible Spongiform Enzephalopathies*, der Alzheimer- und der Parkinsonkrankheit, bei denen Ablagerungen amyloider Fibrillen beobachtet wurden (Kelly, 1996). Obwohl bei den löslichen Proteinen bzw. Vorläuferproteinen, aus denen die Fibrillen gebildet werden, weder Aminosäure-Homologien noch strukturelle Ähnlichkeiten oder gemeinsame Funktionen beobachtet wurden, besitzen die Fibrillen untereinander eine erstaunlich ähnliche Morphologie und Sekundärstruktur. Unter dem Elektronenmikroskop wurde für die Fibrillen ein Durchmesser von ca. 10 nm bestimmt. Alle Fibrillen sind aus mehreren Protofilamenten aufgebaut. Lediglich die Anzahl, Größe und Anordnung der Protofilamente variiert zwischen den einzelnen Typen von amyloiden Fibrillen. Röntgenographische Untersuchungen der Fibrillen ergaben das charakteristische Beugungsmuster einer *cross-β* Struktur. Dabei handelt es sich um eine regelmäßige Anordnung der Polypeptidketten, in der ein β -Faltblatt parallel

und die einzelnen β -Stränge senkrecht zur Fibrillenachse orientiert sind (Geddes *et al.*, 1968). Die charakteristischen Reflexe bei 4.7 und 10 Å entsprechen den Abständen der wasserstoffverbrückten β -Stränge im Faltblatt bzw. dem Abstand zwischen übereinanderliegenden β -Faltblättern. Die Abstände der β -Faltblätter variieren je nachdem welche Seitenketten aus dem β -Faltblatt herausragen (Fandrich & Dobson, 2002).

Ein mittels Festkörper-NMR bestimmtes Strukturmodell von Fibrillen des A β -Peptids – dem Verursacher der Alzheimer-Krankheit ist in Abb. 1.4 gezeigt. Die β -Stränge der Aminosäuren 12-24 und 30-40 bilden mit benachbarten Molekülen zwei übereinanderliegende intermolekulare parallele β -Faltblätter. Die Abstände der β -Stränge und der β -Faltblätter mit 4.8 und 9.5 Å entsprechen den Reflexen aus dem Röntgenbeugungsmuster (Petkova *et al.*, 2002).

Ob die amyloiden Fibrillen selbst die toxische Substanz darstellen, die zum beobachteten Absterben der Zellen führt, oder eine Begleiterscheinung der Krankheit darstellen, ist noch unklar.

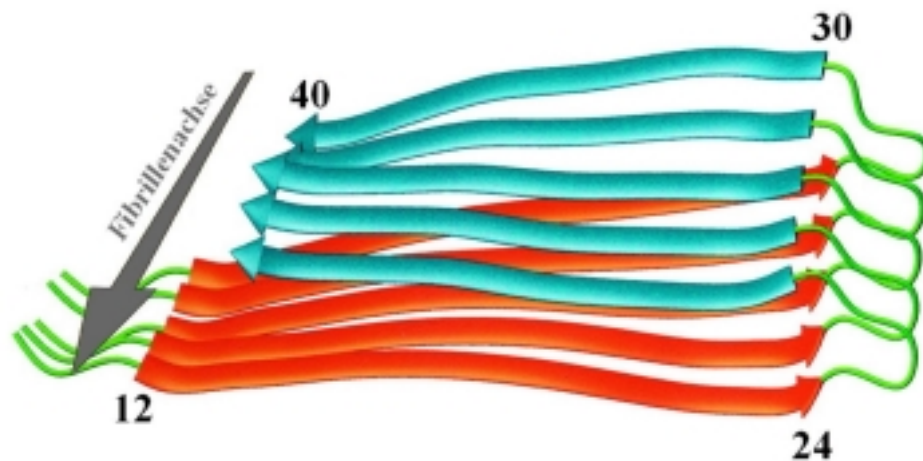


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der vorgeschlagenen *cross- β* Struktur des A β -Peptids. Die ersten acht Reste sind nicht aufgelöst. Die zwei β -Stränge (Reste 12-23 und 30-40) eines Moleküls sind durch rote bzw. blaue Pfeile dargestellt (Petkova *et al.*, 2002).

1.4 Problemstellung

Ziel der Arbeit war es, erste biophysikalische Informationen zur Struktur und Stabilität des Poly(A)-Bindungsproteins 1 (PABPN1) aufzunehmen. Für die Studien wurde bovines PABPN1 verwendet, welches sich von humanem PABPN1 nur in zwei Positionen unterscheidet (S95N, P102S).

Zunächst sollte PABPN1 gereinigt und ausführlich biophysikalisch charakterisiert werden. Anschließend sollten Varianten von PABPN1, die sich durch Expansion bzw. Deletion der N-terminalen Alanine vom Wildtyp-Protein unterscheiden, kloniert und gereinigt werden. Dabei sollte die Expansionsmutante die maximale Anzahl an N-terminalen Alaninresten, die bisher bei OPMD-Patienten beschrieben wurde, aufweisen. Bei der Deletionsmutante sollte die natürliche N-terminale Polyalaninsequenz von zehn Alaninresten entfernt werden. Durch biophysikalische Charakterisierung der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp-Protein sollte untersucht werden, ob eine Expansion oder Deletion der Polyalaninsequenz einen Einfluss auf die Struktur oder Stabilität von PABPN1 hat. Daraus könnten sich möglicherweise Hinweise über die molekularen Ursachen von OPMD ableiten lassen.

Ein weiteres Ziel bestand darin, in Analogie zu den im Zellkern von Muskelfaserzellen bei OPMD-Patienten gefundenen filamentösen Aggregaten, *in vitro* mit PABPN1 fibrilläre Strukturen zu erzeugen. Insbesondere sollte die Auswirkung der N-terminalen Alanine auf die Bildung solcher Fibrillen untersucht werden. Hierbei könnte erstmals *in vitro* ein direkter Zusammenhang zwischen der Alaninexpansion am N-Terminus von PABPN1 und der Bildung von fibrillären Strukturen gezeigt werden. Die strukturelle Charakterisierung solcher Fibrillen und die Untersuchung der Bedingungen, die eine Fibrillierung begünstigen oder inhibieren, könnten als Ausgangspunkt für therapeutische Ansätze dienen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Agarose	ICN (Eschwege)
Ampicillin	Sigma (St. Louis, USA)
ANS	Sigma (St. Louis, USA)
APS	Roth (Karlsruhe)
Bacitracin	Roche Molecular Biochemicals (Mannheim)
Bacto Trypton	Difco (Detroit, USA)
Bromcyan	Sigma (St. Louis, USA)
D ₂ O	Sigma (St. Louis, USA)
Dextranblau	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
DMSO	Sigma (St. Louis, USA)
DTT	ICN (Eschwege)
EDTA	Applichem (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Sigma (St. Louis, USA)
Guanidiniumthiocyanat	Merck (Darmstadt)
Harnstoff	ICN (Eschwege)
Hefeextrakt	Roth (Karlsruhe)
Imidazol	Fluka (Buchs, CH)
IPTG	Applichem (Darmstadt)
Kanamycin	Fluka (Buchs, CH)
Kongorot	Sigma (St. Louis, USA)
L-Arginin	Ajinomoto (Tokio, Japan)
Leupeptin	Roche Molecular Biochemicals (Mannheim)
MOPS	Applichem (Darmstadt)
PEG 400	Fluka (Buchs, CH)
PEG 6000	Fluka (Buchs, CH)
PMSF	Sigma (St. Louis, USA)
SDS	ICN (Eschwege)
Sequagel™ XR	BIOzym (Hess. Oldendorf)
TEMED	Roth (Karlsruhe)
TFE	Fluka (Buchs, CH)
ThT	Fluka (Buchs, CH)
Tris	Applichem (Darmstadt)
Urylacetat	Plano (Wetzlar)

Alle nicht aufgeführten Chemikalien stammen von den Firmen ICN, Sigma und Fluka und hatten den Reinheitsgrad p.a.. Zur Herstellung von Puffern und Lösungen wurde deionisiertes Wasser verwendet.

2.1.2 Standards

Tab 2.1 Verwendete Standards

Produkt	Hersteller
1 kb DNA-Leiter	Gibco BRL (Paisley, UK)
100 bp DNA-Leiter	Gibco BRL (Paisley, UK)
LMW Electrophoresis Calibration Kit	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)

2.1.3 Proteine, Enzyme und Peptide

Tab 2.2 Proteine, Enzyme und Peptide

Produkt	Hersteller
BSA	Sigma (St. Louis, USA)
Carboanhydrase	Sigma (St. Louis, USA)
Chymotrypsin	Roche Diagnostics (Mannheim)
Cytochrom C	Sigma (St. Louis, USA)
DNase I	Roche Diagnostics (Mannheim)
Leupeptin	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Ovalbumin A	Sigma (St. Louis, USA)
Pepstatin	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Proteinase K	Boehringer Mannheim (Mannheim)
Trypsin	Boehringer Mannheim (Mannheim)

2.1.4 Säulenmaterialien

Tab 2.3 In dieser Arbeit verwendete Säulenmaterialien

Säulenmaterial	Hersteller
Fractogel® EMD Phenyl (S)	Novagen (Bad Soden)
Fractogel® EMD SO ₃ ⁻ (S)	Novagen (Bad Soden)
Ni-NTA	Novagen (Bad Soden)
Q-Sepharose HP	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Q-Sepharose Fast Flow	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
SP-Sepharose HP	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Superdex™ 75 prep grade	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
YMC Protein-RP	YMC (Schermbach/Westerwald)

2.1.5 Sonstige Materialien

Tab 2.4 Sonstige Materialien

Produkt	Hersteller
Dialyseschläuche MWCO 3000	Spectrum-Laboratories (Rancho Domingues, USA)
PVDF-Membran	BioRad (München)
Streptavidin-Sensorchip	Biacore AB (Freiburg)
biotinylierte ssRNA (A ₁₅)	IBA (Göttingen)
ssRNA (A ₁₅)	IBA (Göttingen)

2.1.6 Geräte

Tab 2.5 Geräte

Gerät	Hersteller
ÄKTAEexplorer 100	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Avanti J-20, J-25 und J30I Zentrifugen	Beckmann (München)
Gene Pulser [®] II	Biorad (München)
HiLoad™ Pump P-50	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Li-COR 4000 DNA Sequenzierer	MWG Biotech (Ebersberg)
Röntgengenerator RU 2HC	Rigaku (Kent, UK)
Image Plate	MarResearch (Norderstedt)
Mastercycler gradient	Eppendorf (Hamburg)

Außerdem wurden Geräte der Standardlaborausstattung verwendet. Spezielle Geräte, die hier nicht aufgelistet sind, werden im Methodenteil beschrieben.

2.1.7 *E. coli*-Stämme

Tab 2.6 In dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> XLI-Blue	F', <i>Tn10</i> , <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^q , $\Delta(lacZ)M15/recA1$, <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> (NaI ^r), <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i>	Stratagene (Heidelberg)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	B, F', <i>ompT</i> , <i>gal</i> , [<i>dcm</i>], [<i>lon</i>], <i>hsdSB</i> (rB ⁻ mB ⁻), <i>galλ</i> (DE3)	Novagen (Bad Soden)
<i>E. coli</i> TopTen	F', <i>mcrA</i> , $\Delta(mrr\text{-}hsdRMS\text{-}mcrBBC)$, $\Phi80lacZ\Delta M15$, $\Delta lacX74$, <i>recA1</i> , <i>deoR</i> , <i>araD139</i> , $\Delta(ara\text{-}leu)7697$, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , (Str ^R) <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen (Carlsbad, USA)

2.1.8 Primer und Plasmide

Die in dieser Arbeit zur Klonierung der Expressionskonstrukte verwendeten Plasmide sind in Tab. 2.7 aufgelistet. Primer wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) in HPSF-gereinigter Form bezogen. Eine Übersicht über eingesetzte Primer gibt Tab 2.8. Sequenzierprimer waren am 5'-Ende mit dem Farbstoff IRD-41 markiert.

Tab 2.7 Verwendete Plasmide

Plasmid	Herkunft
pGM10synPABPN1	Dr. Uwe Kühn (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)
pGM10synPABPN1-(+7)Ala	Dr. Uwe Kühn (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)
pCR [®] -Blunt II-TOPO	Invitrogen (Carlsbad, USA)
pET11a	Novagen (Bad Soden)
pET15b	Novagen (Bad Soden)
pUBS520	Dr. Ulrich Brinkmann (Epidauros Biotechnology, Bernried)

Tab 2.8 Verwendete Primer

Klonierungsprimer	
α -RNP-C	5'-CCG GGA TCC TTA TCG TGG GAA GCC TCG -3'
α -RNP-N	5'-CAA TAA AAC ATA TGG TTA GGG AGA TGG AGG-3'
Δ Ala	5'- CAC ATA TGG CAG GAG GAA GAG GAT CAG G-3'
N-Term	5'-CCA GGA TCC TTT ATC GAG CTT TTA TTG CTT C-3'
QC-rück	5'-CTG CCG CCG CTG CTG CCG CCA TAT G -3'
QC-vor	5'-CAT ATG GCG GCA GCA GCG GCG GCA G-3'
RNP-N	5'-GGC CCA GTG CAT ATG TCC ATT GAG GAG-3'
TLT7-rück	5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG G-3'
TLT7-vor	5'-CGA AAT TAA TAC GAC TCA C-3'
Sequenzierprimer	
M13-rück ¹⁾	5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3'
M13-vor ¹⁾	5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'
TLT7-rück ²⁾	5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG G-3'
TLT7-vor ²⁾	5'-CGA AAT TAA TAC GAC TCA C-3'

¹⁾Sequenzierung von pCR[®]-Blunt II-TOPO-Derivaten

²⁾Sequenzierung von pET11a- und pET15b-Derivaten

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Amplifikation mit PCR

Zur Amplifikation von DNA mittels PCR wurde die thermostabile *Pfu*-DNA-Polymerase (Tab 2.11) verwendet. Ein Reaktionsansatz von 100 µl enthielt je 0.2 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, je 250 ng der beiden Primer, 10 ng Plasmid-DNA, 10 µl des 10fach konzentrierten Reaktionspuffers und 5 U *Pfu*-DNA-Polymerase. Die Amplifizierung der DNA erfolgte unter den in Tab 2.9 aufgeführten Reaktionsbedingungen.

Tab 2.9 Reaktionsbedingungen bei der DNA-Amplifikation

Segment	Anzahl der Zyklen	Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur
I	1	Denaturierung	45 sec	95°C
II	30	Denaturierung	45 sec	95°C
		Hybridisierung	45 sec	40 - 55°C
		Synthese	2 min/kb	72°C
III	1	Endsynthese	10 min	72°C

2.2.2 Ortsspezifische Mutagenese

Die Durchführung der ortsspezifischen Mutagenese erfolgte mit Hilfe des QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Tab 2.11). Dabei wurde nach der vom Hersteller mitgelieferten Arbeitsvorschrift verfahren. Die verwendeten Primer (Tab 2.8) wurden so entworfen, dass eine erfolgreiche Mutagenese durch Restriktionsanalyse identifizierbar war. Zur Bestätigung der korrekten Sequenz wurde das mutierte Gen anschließend sequenziert.

2.2.3 Konstruktion der Expressionsplasmide

Als Grundlage für die Klonierung der verschiedenen Expressionskonstrukte wurden die Plasmide pGM10synPABPN1 und pGM10synPABPN1-(+7)Ala verwendet. Eine Übersicht über die erstellten Expressionskonstrukte mit den jeweils verwendeten Templates und Primern ist in Tab 2.10 aufgelistet. Zur Durchführung der einzelnen Klonierungsschritte wurden die in Tab 2.11 aufgeführten Enzyme und Kits entsprechend den Angaben der Hersteller eingesetzt.

Tab 2.10 Primer und Templates zur Herstellung der Expressionskonstrukte

Expressionskonstrukt	Primer	Ausgangsplasmid	Arbeitsschritt(e)
pET11a/PABPN1	-	pGM10synPABPN1	Klonierung über <i>NdeI/BamHI</i> in pET11a
pET11a/PABPN1-(+7)Ala	-	pGM10synPABPN1-(+7)Ala	Klonierung über <i>NdeI/BamHI</i> in pET11a
pET11a/PABPN1-(+7)AlaQC	QC-vor, QC-rück	pET11a/PABPN1-(+7)Ala	ortsspezifische Mutagenese
pET11a/PABPN1-ΔAla	TLT7- rück, ΔAla	pET11a/PABPN1	1) PCR 2) Klonierung über <i>NdeI/BamHI</i> in pET11a
pET11a/N-WT	TLT7-vor, N-Term	pET11a/PABPN1	1) PCR 2) Klonierung über <i>NdeI/BamHI</i> in pET11a
pET11a/N-(+7)Ala	TLT7-vor, N-Term	pET11a/PABPN1-(+7)AlaQC	1) PCR 2) Klonierung über <i>NdeI/BamHI</i> in pET11a
pET11a/N-ΔAla	TLT7-vor, N-Term	pET11a/PABPN1-ΔAla	1) PCR 2) Klonierung über <i>NdeI/BamHI</i> in pET11a
pET15b/N-WT	-	pET11a/N-WT	Klonierung über <i>NdeI/BamHI</i> in pET15b
pET15b/N-(+7)Ala	-	pET11a/N-(+7)Ala	Klonierung über <i>NdeI/BamHI</i> in pET15b
pET15b/N-ΔAla	-	pET11a/N-ΔAla	Klonierung über <i>NdeI/BamHI</i> in pET15b
pET11a/α-RNP	αRNP-N, αRNP-C	pET11a/PABPN1	1) PCR 2) Klonierung über <i>NdeI/BamHI</i> in pET11a
pET11a/RNP	RNP-N, αRNP-C	pET11a/PABPN1	1) PCR 2) Klonierung über <i>NdeI/BamHI</i> in pET11a

Wurde für die Klonierung des Expressionsplasids ein PCR-Ansatz verwendet, so wurde das PCR-Produkt zunächst in den Vektor pCR[®]-Blunt II-TOPO zwischenkloniert,

sequenziert und korrekte Gensequenzen unter Verwendung von *NdeI* und *BamHI* umkloniert. Hierbei wurde in einem Reaktionsvolumen von 20 µl 1 µg Plasmid-DNA mit je 5 U der Restriktionsendonukleasen und 2 µl des 10fach konzentrierten Reaktionspuffers vermischt und 6 h bei 37°C inkubiert. Der Verdau wurde nach einer Agarose-Gelelektrophorese mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit gereinigt. Für die Ligationsreaktion wurden 90 fmol des gereinigten DNA-Fragments, 30 fmol Plasmid-DNA, 5 µl 4fach konzentrierter Reaktionspuffer und 1 U T4-DNA Ligase in einem Gesamtvolumen von 20 µl vermischt und 16 h bei 16°C inkubiert. Die Transformation von *E.coli* XL1-Blue erfolgte mit 2 µl des Ligationsansatzes.

Tab 2.11 Verwendete Produkte zur Klonierung der Expressionskonstrukte

Produkt	Methode	Hersteller
QIAprep Spin Miniprep Kit	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	QIAGEN (Hilden)
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	PCR	Stratagene (Heidelberg)
QIAquick PCR Purification Kit	Reinigung von PCR-Produkten	QIAGEN (Hilden)
Zero Blunt™ TOPO™ PCR Cloning Kit	Zwischenklonierung von PCR Produkten	Invitrogen (Carlsbad, USA)
<i>NdeI</i> , <i>BamHI</i>	Restriktionsverdau von DNA	New England Biolabs (Beverly, USA)
QIAquick Gel Extraction Kit	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	QIAGEN (Hilden)
T4-DNA-Ligase	Ligation	Gibco BRL (Paisley, UK)
QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	ortsspezifische Mutagenese	Stratagene (Heidelberg)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	Transformation von Plasmid-DNA	Stratagene (Heidelberg)
SequiTerm EXEL™ II	DNA-Sequenzierung	Biozym (Hessisch Oldendorf)

2.2.4 Anzucht von *E. coli*

Zur rekombinanten Überexpression wurde der *E. coli* Stamm BL21(DE3) mit dem jeweiligen Expressionskonstrukt und dem Plasmid pUBS520 transformiert. Dieses Plasmid enthält das Gen für eine tRNA der in *E. coli* seltenen Arginkodons AGG und AGA (Brinkmann *et al.*, 1989). Durch die Coexpression dieser tRNA konnte die Ausbeute des

Zielproteins erhöht werden. Für die Anzucht wurden generell Einzelkolonien einer Transformation verwendet, die nicht älter als 16 h waren.

2.2.4.1 Schüttelkolbenanzucht

Für die Anzucht im Schüttelkolben wurde zunächst eine Vorkultur hergestellt. Dazu wurde eine Einzelkolonie von einer frischen Transformation in 25 ml LB-Medium (10 g/l Bacto Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl) über Nacht bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurde die Vorkultur 1:100 in frisches LB-Medium verdünnt und die Kulturen bei 37°C bis zum Erreichen einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0.6-1.5$ geschüttelt. Die Expression erfolgte nach Induktion mit 1 mM IPTG für 3 h bei 37°C unter ständigem Schütteln bei 180 rpm.

2.2.4.2 Fed-Batch Fermentation

Die Fermentationen wurden in einem Biostat ED mit 10 l Arbeitsvolumen und einem digitalen Mess- und Regelsystem durchgeführt (Braun, Melsungen). Es wurden 7.5 l einer Hefeextraktlösung (50 g/l) im Bioreaktor 60 min bei 121°C autoklaviert. Anschließend wurde das Medium unter sterilen Bedingungen mit 5 g/l Glucose, 0.5 g/l $MgSO_4 \times 7 H_2O$, 0.1 g/l Thiamin sowie mit 0.1 g/l Ampicillin versetzt. Der pH-Wert wurde mit K_2HPO_4 auf pH 7.6 eingestellt. Das Medium wurde mit einer 8 h alten Vorkultur in LB-Medium angeimpft, so dass zu Beginn der Fermentation eine optische Dichte von $OD_{600} = 0.1$ vorlag. Die Kultivierung wurde bei 37°C durchgeführt. Die Regulierung des pH-Wertes erfolgte mit einer 15 %igen Ammoniaklösung und 15 %iger Phosphorsäure, wobei der pH-Wert erst nach dem Abfallen auf pH 7.0 konstant gehalten wurde. Als Antischaummittel wurde eine 50 %ige Polypropylenglykollösung (PLURIOL® P2000, BASF, Ludwigshafen) verwendet. Ab einer optischen Dichte von $OD_{600} = 10$ wurde kontinuierlich mit 2 g/min eine 50 %ige Hefeextraktlösung zugeführt. Die Induktion erfolgte bei $OD_{600} = 25-30$ mit 1 mM IPTG für 3 h bei 37°C.

2.2.5 Reinigung der überexprimierten Proteine

Die durch Zentrifugation bei 5000 x g erhaltene Zellfeuchtmasse wurde so resuspendiert, dass auf 1g Zellen 10 ml des jeweiligen Resuspensionspuffers eingesetzt wurden. Anschließend wurden 0.3 mg/ml PMSF, 0.5 µg/ml Leupeptin und 0.5 µg/ml Pepstatin

hinzugefügt. Der Zellaufschluss erfolgte durch Hochdruckdispersion bei 1000-1200 bar in einem Micron LAB 40 Gaulin Homogenisator (APV, Lübeck). Nach dem Aufschluss wurden 10 µg/ml DNase zugegeben und 10 min bei 10°C inkubiert. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation bei 48000 x g für 15 min entfernt. Im Folgenden sind die verschiedenen Reinigungsvorschriften detailliert beschrieben. Dabei wurde, falls nicht anders erwähnt, bei den Chromatographieschritten das Gelmaterial vor dem Probenauftrag mit dem jeweiligen Auftragspuffer äquilibriert. Zum Auswaschen von ungebundenem Protein wurden 10 Säulenvolumen des angegebenen Puffers verwendet. Die Elution erfolgte durch lineare Gradienten über 6 Säulenvolumen. Elutionsfraktionen wurden anhand von SDS-PAGE auf die Anwesenheit des Zielproteins analysiert. Alle bei der Proteinreinigung verwendeten Puffer sind in Tab 2.12 aufgelistet. Der pH-Wert wurde bei Tris-Puffern mit HCl, bei MOPS-Puffern mit NaOH eingestellt. Alle Puffer wurden filtriert und entgast. DTT wurde den Puffern erst unmittelbar vor ihrer Verwendung zugesetzt.

Tab 2.12 Verwendete Puffer zur Proteinreinigung

Puffer	Zusammensetzung	pH
Puffer A	50 mM MOPS, 50 mM Na ₄ P ₂ O ₇ , 5 mM EDTA, 1 mM DTT	6.5
Puffer B	50 mM MOPS, 50 mM Na ₄ P ₂ O ₇ , 3 M KCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT	6.5
Puffer C	50 mM MOPS, 50 mM Na ₄ P ₂ O ₇ , 1.5 M KCl, 1.75 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5 mM EDTA, 1 mM DTT	6.5
Puffer D	50 mM MOPS, 50 mM Na ₄ P ₂ O ₇ , 1.5 M KCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT	6.5
Puffer E	50 mM MOPS, 50 mM Na ₄ P ₂ O ₇ , 1 M Arginin, 5 mM EDTA, 1 mM DTT	6.5
Puffer F	50 mM MOPS, 5 mM EDTA, 1 mM DTT	6.5
Puffer G	50 mM Tris, 20 mM Imidazol, 300 mM NaCl	8.0
Puffer H	50 mM Tris, 300 mM NaCl	8.0
Puffer I	50 mM Tris, 5 mM EDTA	8.0
Puffer J	50 mM Tris, 100 mM NaCl	8.0
Puffer K	50 mM Tris, 6 M Guanidiniumhydrochlorid, 20 mM Imidazol	8.0
Puffer L	50 mM Tris, 5 mM EDTA, 1 mM DTT	8.0
Puffer M	50 mM Tris, 4.375 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5 mM EDTA, 1 mM DTT	8.0
Puffer N	50 mM Tris, 1.75 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 5 mM EDTA, 1 mM DTT	8.0
Puffer O	20 mM MOPS, 1 mM DTT	6.5
Puffer P	10 mM Tris, 1 mM DTT	8.0

2.2.5.1 Reinigung von PABPN1, PABPN1-(+7)Ala und PABPN1-ΔAla

Je 200 ml der Zellrohextrakte in Puffer A wurden 1:1 mit Puffer B verdünnt, mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bis zu einer Konzentration von 1.75 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ versetzt, 1 h bei 4°C inkubiert und nach Zentrifugation bei 48000 x g für 20 min auf eine Fractogel[®] EMD Phenyl (S) Säule ($V_t = 30$ ml) mit 12 cm/h aufgetragen. Die Fractogel[®] EMD Phenyl (S) Säule war zuvor mit Puffer C äquilibriert worden. Nach Waschen mit Puffer D erfolgte die Elution durch einen linearen Gradienten mit Puffer E bei einer Flussrate von 16 cm/h. Fraktionen mit dem gewünschten Zielprotein wurden vereinigt und in Anwesenheit von 10 ml des Gelmaterials Fractogel[®] EMD SO_3^- (S) gegen Puffer F dialysiert. Anschließend wurde das beladene Gelmaterial in eine Leersäule überführt, mit Puffer F gewaschen und gebundenes Protein durch einen linearen Gradienten von 0-1.5 M KCl mit einer Flussrate von 16 cm/h eluiert. PABPN1 enthaltende Fraktionen wurden 1:1 mit Puffer B versetzt. Abschließend wurde eine Gelfiltration mittels Superdex 75 ($V_t = 120$ ml) bei 24 cm/h in Puffer D durchgeführt. Aufgrund der starken Aggregationstendenz der gereinigten Proteine, konnten diese nicht für längere Zeit gelagert werden und wurden deshalb unmittelbar nach der Aufreinigung charakterisiert.

2.2.5.2 Reinigung von N-WT, N-ΔAla und N-(+7)Ala

Eine erfolgreiche Überexpression der N-terminalen Domänen von PABPN1 (N-WT), der Deletionsmutante (N-ΔAla) bzw. der Expansionsmutante (N-(+7)Ala) konnte nur durch die Verwendung der Expressionplasmide pET15b/N-WT, pET15b/N-(+7)Ala und pET15b/N-ΔAla erreicht werden. Dabei wurde das jeweilige Protein mit einem N-terminalen His-tag erhalten. Die Reinigungen erfolgten sowohl unter nativen, als auch unter denaturierenden Bedingungen.

Für die Reinigung unter nativen Bedingungen wurden die in Puffer G erhaltenen Zellrohextrakte (je 200 ml) auf eine Ni-NTA Säule (10 ml) aufgetragen. Nach Waschen mit Puffer G wurden die gebundenen Proteine in einem linearen Imidazolgradienten von 20-250 mM Imidazol eluiert. Die Flussrate betrug 10 cm/h. Fraktionen mit dem gewünschten Zielprotein wurden konzentriert und eine Gelfiltration mit 24 cm/h an einer Superdex 75-Säule ($V_t = 120$ ml) in Puffer H durchgeführt.

Für die Aufarbeitung der Biomasse aus Fermentationen wurde ein Reinigungsprotokoll unter teilweise denaturierenden Bedingungen erstellt. Ziel war es, das Zielprotein in den großen Aufschlussvolumina anzureichern und vorzureinigen. Hierzu wurde der Zellrohextrakt

(1000 ml) in Puffer I 5 min bei 80°C inkubiert und anschließend 15 min bei 48000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde 1:1 mit Isopropanol verdünnt und 10 min bei 20°C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 48000 x g für 20 min wurde der Überstand 1:1 mit Puffer I versetzt und auf eine zuvor mit Puffer I äquilibrierte Q-Sepharose Fast Flow ($V_t = 150$ ml) aufgetragen. Nach Waschen mit Puffer J erfolgte die Elution durch einen Stufengradienten mit Puffer H. Die Flussrate betrug jeweils 15 cm/h. Zu den Fraktionen, die das Zielprotein enthielten, wurde Guanidiniumhydrochlorid bis zu einer Endkonzentration von 6 M zugesetzt und der pH Wert auf 8.0 eingestellt. Anschließend wurde die Proteinlösung auf eine mit Puffer K äquilibrierte Ni-NTA Säule ($V_t = 80$ ml) aufgetragen. Nach Waschen mit Puffer K erfolgte die Elution in einem linearen Imidazolgradienten von 20-250 mM Imidazol bei einer Flussrate von 20 cm/h. Als abschließenden Reinigungsschritt wurde nach Dialyse der Elutionsfraktionen gegen Puffer I und Konzentrierung des Dialysats eine Gelfiltration in Puffer I an einer Superdex 75-Säule ($V_t = 1200$ ml) bei 15 cm/h durchgeführt. Die gereinigten Proteine wurde gegen Wasser dialysiert, lyophilisiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.5.3 Reinigung der RNP-Domäne

Der Zellrohextrakt (200 ml) in Puffer L wurde mit 15 cm/h auf eine Q-Sepharose fast flow ($V_t = 40$ ml) aufgetragen. Die RNP-Domäne eluierte verzögert im Durchlauf und wurde fraktioniert, um eine erste Vorreinigung des Proteins zu erhalten. RNP-haltige Fraktionen wurden vereinigt, die $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration mit Puffer M auf 1.75 M eingestellt, 10 min inkubiert, 15 min bei 48000 x g zentrifugiert und auf eine mit Puffer N äquilibrierte Fractogel[®] EMD Phenyl (S) Säule ($V_t = 30$ ml) mit 12 cm/h aufgetragen. Nach Waschen mit Puffer N erfolgte die Elution in einem linearen Gradienten von 1.75–0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bei einer Flussrate von 16 cm/h. Die vereinigten Fraktionen wurden gegen Puffer O dialysiert und auf eine SP-Sepharose HP ($V_t = 10$ ml) aufgetragen. Nach Waschen mit Puffer O wurde im linearen Gradienten von 0-500 mM NaCl eluiert. Die Flussrate während diesem Reinigungsschritt betrug 10 cm/h. Abschließend wurden Fraktionen, welche die RNP-Domäne enthielten, vereinigt, konzentriert und eine Gelfiltration mit einer Superdex 75-Säule ($V_t = 120$ ml) in Puffer O bei 24 cm/h durchgeführt. Das gereinigte Protein wurde gegen Wasser dialysiert, lyophilisiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.5.4 Reinigung der RNP-Domäne mit N-terminaler α -Helix (α -RNP)

Die Reinigung von α -RNP erfolgte im Wesentlichen nach dem Reinigungsverfahren der RNP-Domäne. Anstelle der SP-Sepharose HP wurde jedoch eine Q-Sepharose HP ($V_t = 10$ ml) verwendet, die zuvor in Puffer P äquilibriert worden war. Die Dialyse der von der Fractogel[®] EMD Phenyl (S)Fractogel eluierten Fraktionen erfolgte entsprechend in Puffer P.

2.2.6 Konzentrierung von Proteinlösungen

Verdünnte Proteinlösungen wurden zur Konzentrierung in einen Dialyseschlauch (MWCO 3000) der Firma Spectrum-Laboratories (Rancho Domingues, USA) überführt. Der Dialyseschlauch wurde bei 10°C in PEG 35000 eingebettet und bis zum gewünschten Volumen eingeeengt.

2.2.7 Lyophilisation von Proteinlösungen

Für die Lagerung wurden die gereinigten Proteine bei –80°C eingefroren und anschließend in der Gefriertrocknungsanlage BETA 1-16 (Christ, Osterode am Harz) bei 25°C lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde bis zu seiner weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

2.2.8 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Konzentrationsbestimmungen gereinigter Proteine wurden spektroskopisch an einem DU-7400 Spektrophotometer (Beckmann, München) durchgeführt. Die Konzentrationen der Proteinlösungen wurde nach dem Lambert-Beerschen Gesetz (Gl. 2.1) berechnet.

$$A_{280} = \epsilon_{280} \times c \times d \quad \text{Gl. 2.1}$$

mit	
A_{280}	Absorption der Proteinlösung bei 280 nm
ϵ_{280}	molarer dekadischer Extinktionskoeffizient bei 280 nm in $M^{-1} \times cm^{-1}$
c	Proteinkonzentration in M
d	Schichtdicke der Küvette in cm

Die Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine und Proteindomänen wurden nach Gill und von Hippel berechnet und sind in Tab 2.13 aufgelistet (Gill & von Hippel, 1989).

Tab 2.13 Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine und Domänen

Protein bzw. Proteindomäne	ϵ_{280} [$M^{-1} \times cm^{-1}$]
PABPN1, PABPN1- Δ Ala, PABPN1-(+7)Ala	18610
N-WT, N- Δ Ala, N-(+7)Ala	1280
RNP-Domäne mit N-terminaler α -Helix (α -RNP)	3960
RNP-Domäne	3960

2.2.9 N-terminale Sequenzanalyse

Die zu analysierenden Proben wurden auf einem SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und anschließend durch Elektrottransfer auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Banden wurden ausgeschnitten und die ersten fünf bis sieben Aminosäuren an einem Applied Biosystems 476A Gasphasen Sequenzer (Applied Biosystems, Foster City, U.S.A) bestimmt. Die Sequenzanalyse wurde freundlicherweise von Herrn Dr. K. P. Rücknagel (Forschungsstelle „Enzymologie der Proteinfaltung“ der Max-Planck-Gesellschaft, Halle) durchgeführt.

2.2.10 Massenspektrometrie

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

2.2.11 Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzmessungen wurden an einem Fluoromax2 Spektrofluorimeter (SPEX Instruments S. A., Inc., Edison, NJ, USA) in 1 cm Küvetten mit 5 nm Spaltbreiten des Anregungs- und Emissionsstrahls durchgeführt. Temperaturübergänge wurden an einem Hitachi F-4500 Spektrofluorimeter (Hitachi, Tokyo, Japan) mit den gleichen Einstellungen gemessen. Dabei wurde zur Steuerung der Temperatur der Küvetten-Halterung das Programm FTLM.BAS verwendet (Waldmann, 1998). Proteinkonzentrationen, Anregungs- und

Auswerte-Wellenlängen sind in den jeweiligen Abbildungslegenden angegeben. Alle Spektren wurden pufferkorrigiert.

2.2.12 Chemisch induzierte Entfaltungs- und Rückfaltungsübergänge

Zur Messung von Entfaltungs- bzw. Rückfaltungsübergängen wurden native bzw. denaturierte Proteinlösungen in Pufferlösungen mit unterschiedlichen Denaturierungsmittelkonzentrationen verdünnt und 16 h bei 20°C inkubiert. Anschließend wurde ein Emissionsspektrum der jeweiligen Proteinlösung aufgenommen. Die exakte Bestimmung der Denaturierungsmittelkonzentration erfolgte refraktrometrisch mittels Gl. 2.2 für Guanidiniumthiocyanat und Gl. 2.3 für Harnstoff (Pace, 1986; Takase *et al.*, 1974). Die Auswertung der gemessenen Übergänge erfolgte nach Pace unter der Annahme eines Zwei-Zustands-Modells (Pace & Scholtz, 1997). Die freie Stabilisierungsenthalpie $\Delta G(\text{H}_2\text{O})$ wurde durch nichtlineare Regression mit Gl. 2.4 nach Santoro bestimmt (Santoro & Bolen, 1988). Die Denaturierungsmittelkonzentration beim Übergangsmittelpunkt $D_{1/2}$ wurde durch Gl. 2.5 bestimmt.

$$[\text{Guanidiniumthiocyanat}] = \Delta N \times 40.4 \quad \text{Gl. 2.2}$$

$$[\text{Harnstoff}] = 117.66 \times \Delta N + 29.753 \times \Delta N^2 + 185.56 \times \Delta N^3 \quad \text{Gl. 2.3}$$

mit	
[Guanidiniumthiocyanat]	Guanidiniumthiocyanatkonzentration
[Harnstoff]	Harnstoffkonzentration
ΔN	Differenz der Brechungsindices zwischen Proteinlösung mit und ohne Denaturierungsmittel

$$Y = \frac{(F_n + m_n \times D) + (F_u + m_u \times D) \times \exp^{(m \times D - \Delta G)/(R \times T)}}{1 + \exp^{(m \times D - \Delta G)/(R \times T)}} \quad \text{Gl. 2.4}$$

$$D_{1/2} = \Delta G/m \quad \text{Gl. 2.5}$$

mit	
F	gemessene Fluoreszenzintensität
F_n	spezifische Fluoreszenz des nativen Proteins bei 0 M Denaturierungsmittel
m_n	lineare Abhängigkeit der Fluoreszenz des nativen Proteins von der Denaturierungsmittelkonzentration
D	Denaturierungsmittelkonzentration
F_u	spezifische Fluoreszenz des denaturierten Proteins bei 0 M Denaturierungsmittel
m_u	lineare Abhängigkeit der Fluoreszenz des denaturierten Proteins von der Denaturierungsmittelkonzentration
m	lineare Abhängigkeit der freien Stabilisierungsenthalpie von der Denaturierungsmittelkonzentration (Kooperativität)
ΔG	freie Stabilisierungsenthalpie bei 0 M Denaturierungsmittel (= $\Delta G(H_2O)$)
$D_{1/2}$	Denaturierungsmittelkonzentration am Übergangsmittelpunkt

2.2.13 Detektion amyloider Fibrillen durch ThT- und ANS-

Fluoreszenzmessungen

Zur Detektion von amyloiden Fibrillen wurden Fluoreszenzmessungen am Fluoromax2 Spektrofluorimeter mit den Farbstoffen ThT und ANS durchgeführt. Für ThT-Fluoreszenzmessungen wurde die zu untersuchende Proteinlösung zu 5 μ M ThT in 5 mM KH_2PO_4 und 150 mM NaCl pH 7.4 in einer 1 cm Küvette pipetiert, gut durchmischt, 1 min bei 20°C inkubiert und vor der Fluoreszenzmessung nochmals vorsichtig geschüttelt. Das Emissionsspektrum von ThT wurde von 460–550 nm bei einer Anregungswellenlänge von 450 nm aufgenommen. Emissionsspektren von ANS wurden von 400–600 nm bei einer Anregungswellenlänge von 370 nm und einer Farbstoffkonzentration von 250 μ M in 5 mM KH_2PO_4 und 150 mM NaCl pH 7.4 aufgenommen. Die eingesetzten Proteinkonzentrationen sind in den jeweiligen Abbildungslegenden angegeben.

2.2.14 Analytische Ultrazentrifugation

Sedimentations- und Gleichgewichtsläufe wurden in einer Optima XL-A analytischen Ultrazentrifuge (Beckmann Instruments, Inc., Fullerton, USA) in einem AN60Ti-Rotor bei 20°C durchgeführt. Sedimentationsläufe erfolgten bei 20000 rpm, Gleichgewichtsläufe bei 40000 rpm in Doppelsektorzellen. Die Auswertung der experimentellen Daten wurde mit Hilfe eines von A. Minton entwickelten Programms von Dr. Hauke Lilie durchgeführt (Rivas *et al.*, 1999). Die Berechnungen beruhten auf der Annahme, dass das spezifische Volumen der Proteine 0.734 ml/g betrug (Harding, 1997).

2.2.15 Circular dichroismus

Fern-UV-CD-Spektren wurden an einem Aviv 62A DS Spektrometer (Aviv Lakewood, NJ, USA) und einem Jasco J710 Spektrometer (Jasco, Gross-Umstadt) in Quarzglasküvetten mit Schichtdicken von 0.01 bis 0.1 cm aufgenommen. CD-Messungen von fibrilliertem N-(+7)Ala wurde mit freundlicher Unterstützung von Herrn Dr. Klaus Gast am Max Dellbrückzentrum in Berlin durchgeführt.

Die Spektren wurden 10fach akkumuliert bei einer Zeitkonstante von 3 s und 1 nm Bandbreite. Alle Spektren wurden pufferkorrigiert und, falls nicht anders vermerkt, bei 20°C aufgenommen. Die gemessene Elliptizität Θ wurde anhand Gl. 2.6 in die mittlere residuelle Elliptizität $[\Theta]_{\text{MRW}}$ umgerechnet. Die Berechnung der Differenzspektren erfolgte über die molare Elliptizität $[\Theta]$ (Gl. 2.7) nach Gl. 2.8.

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \frac{\Theta \times 100 \times M_r}{c \times d \times N_A} \quad \text{Gl. 2.6}$$

$$[\Theta] = \frac{\Theta \times 100 \times M_r}{c \times d} \quad \text{Gl. 2.7}$$

$$[\Theta]_{\text{DIFFMRW}} = \frac{[\Theta]_{\text{Pt1}} - [\Theta]_{\text{Pt2}}}{\Delta N_A} \quad \text{Gl. 2.8}$$

mit	
Θ	gemessene Elliptizität in Grad
$[\Theta]_{\text{MRW}}$	mittlere residuelle Elliptizität
$[\Theta]_{\text{DIFFMRW}}$	residuelle Elliptizität des Differenzspektrums
$[\Theta]$	mittlere molare Elliptizität
$[\Theta]_{\text{Pt1}}$	mittlere molare Elliptizität von Protein 1
$[\Theta]_{\text{Pt2}}$	mittlere molare Elliptizität von Protein 2
M_r	Molekularmasse in Dalton
c	Proteinkonzentration in mg/ml
d	Schichtdicke der Küvette in cm
N_A	Anzahl der Aminosäuren im Proteinmolekül
ΔN_A	Differenz der Aminosäurezahl von Protein 1 und Protein 2

2.2.16 Oberflächenplasmonresonanz

Zur Bestimmung der Wechselwirkung von RNP und ssRNA wurde das BIAcoreX System (Biacore AB, Freiburg) verwendet. Die Herstellung der Sensorchips erfolgte durch Kopplung von biotinylierter ssRNA (A_{15}) an einen Streptavidin-Sensorchip. Hierzu wurden auf die Flusszelle 20 μl einer 0.1 pM A_{15} -Lösung in 5 mM MOPS und 100 mM NaCl, pH 6.5

aufgetragen. Die Messungen wurden bei 20°C mit Flussraten von 15 µl/min durchgeführt. Die gemessenen Daten wurden mit dem Programm BIAevaluation Version 3.1 (Biacore AB, Freiburg) unter der vereinfachenden Annahme einer Bindungsstöchiometrie von 1:1 nach Gl. 2.9 ausgewertet. Die Berechnung der Bindungskonstante aus dem Competitionsexperiment erfolgte durch nichtlineare Regression. Nach dem Massenerhaltungsgesetz ergeben sich die Konzentration von freiem A₁₅ [L] und freier RNP-Domäne [P] aus Gl. 2.10 und Gl. 2.11, wobei [P]₀ und [L]₀ die eingesetzten Konzentrationen an A₁₅ und der RNP-Domäne sind. Für die Dissoziationskonstante gilt somit Gl. 2.12.



$$[L]_0 = [L] + [PL] \quad \text{Gl. 2.10}$$

$$[P]_0 = [P] + [PL] \quad \text{Gl. 2.11}$$

$$K_D = \frac{([L]_0 - [PL]) \times ([P]_0 - [PL])}{[PL]} \quad \text{Gl. 2.12}$$

Durch Auflösen der Gleichung nach der Konzentration des Komplexes [PL] erhält man:

$$[PL] = \frac{([L]_0 + [P]_0 + K_D)}{2} - \sqrt{\frac{([L]_0 + [P]_0 + K_D)^2}{4} - [P]_0 \times [L]_0} \quad \text{Gl. 2.13}$$

Das gemessene Resonanzsignal im Gleichgewicht ergibt sich aus der Differenz des Resonanzsignals ohne freien Liganden und der partiellen Signaländerung bei Zugabe von freiem Liganden:

$$R_{eq} = R_{eq0} - \Delta R_{max} \times \frac{[PL]}{[P]_0} \quad \text{Gl. 2.14}$$

Setzt man Gl. 2.13 in Gl. 2.14 ein so erhält man

$$R_{eq} = R_{eq0} - \Delta R_{max} \times \frac{\frac{([L]_0 + [P]_0 + K_D)}{2} - \sqrt{\frac{([L]_0 + [P]_0 + K_D)^2}{4} - [P]_0 \times [L]_0}}{[P]_0} \quad \text{Gl. 2.15}$$

mit	
R_{eq}	Resonanzsignal im Gleichgewicht
R_{eq0}	Resonanzsignal im Gleichgewicht ohne Zugabe von freiem Liganden
ΔR_{max}	Differenz des Resonanzsignals im Gleichgewicht bei vollständiger Sättigung mit freiem Liganden
$[P]_0$	Konzentration an eingesetztem Protein
$[L]_0$	Konzentration an eingesetztem freien Liganden
K_D	Dissoziationskonstante

Durch einen Kurvenangleich der gemessenen Resonanzsignale im Gleichgewicht an Gl. 2.15 in Abhängigkeit der freien Ligandenkonzentration $[L]_0$ erhält man die gesuchte Dissoziationskonstante K_D .

2.2.17 Proteinkristallisation

Die Proteinkristallisation wurde nach der Hängetropfmethode nach McPherson in 24-Loch-Zellkulturplatten der Firma ICN (Eschwege) durchgeführt (McPherson, 1990). Für die Kristallisation wurde die Proteinlösung mit Kristallisationspuffer auf einem Deckglas vermischt. Mit diesem Deckglas wurde ein Reservoir der Zellkulturplatte, welches 500 μ l des Kristallisationspuffers enthielt, luftdicht verschlossen. Die Kristallisation wurde mit Hilfe eines Axiolab Mikroskop (Carl Zeiss, Göttingen) beobachtet und zur Dokumentation mit einer Pentax Z20 Kamera (PENTAX Europe, Hamburg) photographiert. Um erste Kristallisationsbedingungen zu erhalten, wurden die in Tab. 2.14 aufgelisteten Screens der Firma Hampton Research (Laguna Niguel, USA) verwendet.

Tab 2.14 Kristallisations-Screens

Screen	Anzahl unterschiedlicher Bedingungen
Crystal Screen™ I	50
Crystal Screen™ II	40
Grid Screen PEG 6000™	24
Grid Screen Ammonium Sulfate™	24

2.2.18 Bromcyanspaltung von N-(+7)Ala

Für die Bromcyanspaltung wurde N-(+7)Ala gegen Wasser dialysiert und anschließend lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in stickstoffbegaster 70 %iger Ameisensäure aufgenommen und mit 50-100fachem molarem Überschuss an Bromcyan, bezogen auf die Methioninkonzentration versetzt. Der Ansatz wurde 24 h im Dunklen bei 20°C inkubiert und

anschließend gegen Wasser dialysiert. Nach weiterer Dialyse gegen Puffer G wurde gespaltenes N-(+7)Ala durch eine Metallaffinitätschromatographie an Ni-NTA in Puffer G von ungespaltenem Protein abgetrennt. Das gereinigte Produkt wurde dabei im Durchlauf erhalten.

2.2.19 Elektronenmikroskopie

Für den Nachweis fibrillärer Strukturen wurden Proteinproben auf einem kohlebeschichteten Kupfergrid (Plano, Wetzlar) adsorbiert und anschließend mit einem Elektronenmikroskop EM 900 (Zeiss, Jena) untersucht. Für die Adsorption der Proteinproben wurde die beschichtete Seite des Grids 1 min mit Bacitracin-Lösung (0.1 mg/ml) behandelt und getrocknet. Anschließend wurde 3 min mit der zu untersuchenden Proteinlösung (0.5 mg/ml) inkubiert, getrocknet, mit Wasser gewaschen und wieder getrocknet. Die Kontrastierung erfolgte durch Inkubation mit einer 1 %igen Uranyl-Acetat-Lösung für 15 sec. Die Aufnahmen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Hause (Biozentrum, Halle) angefertigt.

2.2.20 Präparation von *seeds*

Um eine Fibrillierung mit *seeds* zu induzieren, wurden Fibrillen bei 70000 rpm für 1 h bei 10°C abzentrifugiert. Das gelartige Pellet wurde 16 h lang mit Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach erneutem Waschen wurden die Fibrillen in dem ursprünglichen Volumen aufgenommen und 5 min mit einem UP200S Ultraschallprozessor (Dr. Hielscher, Stuttgart) bei einer Amplitude und einem Pulsbereich von jeweils 50% behandelt.

2.2.21 Kongorotfärbung

Kongorot wird häufig zum Nachweis amyloider Strukturen in Gewebeproben und von *in vitro* erzeugten amyloiden Fibrillen verwendet. Vor Verwendung des Farbstoffes wurde Kongorot zweimal in einem 1:10 Wasser-Ethanolgemisch umkristallisiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über UV-Spektroskopie in 5 mM KH_2PO_4 , 150 mM NaCl, pH 7.4. Die hierfür verwendeten Extinktionskoeffizienten sind in Tab 2.15 angegeben.

Tab 2.15 Extinktionskoeffizienten von Kongorot

Wellenlänge	ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]
349 nm	28299
406 nm	14677
477 nm	34722
540 nm	18955

Kongorot, das an amyloide Fibrillen gebunden ist, weist eine gelb-grüne Doppelbrechung unter linear polarisiertem Licht auf. Die Bindung von Kongorot an amyloide Fibrillen wurde mit einem Nikon Umkehrmikroskop Eclipse TE200 (Nikon, Düsseldorf) unter Verwendung eines NCB11 Filters beobachtet. Für die Probenpräparation wurden 125 μ l der Fibrillenlösung 15 min bei 14000 x g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 500 μ l 95 μ M Kongorot in 5 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7.4 resuspendiert und 16 h unter ständiger Überkopfbewegung inkubiert. Anschließend wurde 15 min bei 14000 x g zentrifugiert, das Pellet zweimal mit 5 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7.4 und einmal mit Wasser gewaschen. Nach dem letzten Waschen wurde das Pellet in 100 μ l Wasser aufgenommen und 20 μ l davon unter dem Mikroskop im Hellfeld- und Polarisationsmodus untersucht. Die Aufnahmen wurden freundlicherweise mit Unterstützung von Frau Dr. Gudrun Wildegger (Aventis Pharma) durchgeführt.

2.2.22 FT-IR-Spektroskopie

FT-IR-Spektren wurden im kontinuierlichen Stickstoffstrom an einem Bruker IFS 66 FT-IR-Spektrometer (Bruker Optik, Ettlingen) aufgenommen. Die zu untersuchenden Proben wurden bei einer Schichtdicke von 50 μ m zwischen zwei CaF₂ Fenstern vermessen. Vor der Aufnahme der Spektren wurde der Probenraum 15 min mit Stickstoff gespült. Für die Fourier Transformation wurden 256 Spektren von 4000–0 cm⁻¹ aufgenommen und gemittelt. Die Auswertung der Spektren erfolgte über einen Frequenzbereich von 1720–1560 cm⁻¹. Die Messungen wurden freundlicherweise von Frau Schaller und Herrn Dr. Wigand Hübner (Institut für Physikalische Chemie MLU Halle-Wittenberg) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung von PABPN1

PABPN1 wurde erstmals bei Untersuchungen der Polyadenylierung eukaryotischer mRNA beschrieben (Wahle, 1991). Für die erste Charakterisierung wurde PABPN1 aus Kalbsthymus isoliert. Nach Klonierung einer cDNA-Bibliothek aus Kalbsthymus in ein prokaryotisches Expressionssystem gelang eine rekombinante Überexpression von PABPN1 in *E. coli* (Nemeth *et al.*, 1995). Das rekombinant erhaltene Protein enthält zwar nicht die von Smith gefundenen posttranslationalen Arginin-Methylierungen, dennoch besitzt es *in vitro* die gleiche Aktivität (Smith *et al.*, 1999). Sowohl bei der Polyadenylierung als auch bei der Poly(A)-Bindung verhält sich rekombinantes PABPN1 wie das aus Kalbsthymus isolierte PABPN1 (Meyer *et al.*, 2002). Bei der heterologe Expression von PABPN1 in *E. coli* werden nur sehr geringe Ausbeute erhalten. Daher wurde ein synthetisches Gen von PABPN1 hergestellt, bei dem die ersten 122 Kodons an die optimierte Kodon-Auswahl in *E. coli* angepasst wurden (Kühn *et al.*, Manuskript eingereicht). Dieses synthetische Gen im Vektor pGM10 war Ausgangspunkt dieser Arbeit (Martin & Keller, 1996).

3.1.1 Expression und Reinigung von PABPN1

Da bisherige strukturelle Informationen zu PABPN1 nur aus Strukturvorhersagen und Sequenzvergleichen vorhanden waren, sollte zunächst eine biophysikalische Charakterisierung von PABPN1 durchgeführt werden. Um hierfür ausreichende Proteinmengen produzieren zu können, musste die Expression deutlich optimiert werden. Dies gelang durch die Expression des synthetischen Gens im Vektor pET11a bei gleichzeitiger Expression einer tRNA für die in *E. coli* seltenen Argininkodons AGG und AGA. Die tRNA war dabei auf dem Plasmid pUBS520 kodiert (Brinkmann *et al.*, 1989). Insgesamt enthält das synthetische Gen von PABPN1 14 dieser seltenen Argininkodons. In Abb. 3.1 sind die Gesamtzellfraktionen vor und nach dreistündiger Expression dargestellt. Das ungewöhnliche Laufverhalten von PABPN1 im Gel bei ca. 50 kDa anstatt bei den erwarteten 32 kDa konnte bisher nicht geklärt werden, wurde

jedoch auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (Chen *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001; Nemeth *et al.*, 1995). Rekombinant exprimiertes PABPN1 wurde zunächst nach Vorschrift gereinigt (Wahle *et al.*, 1993). Dabei wurde wie bereits beschrieben, eine Tendenz zur Aggregation festgestellt, die anhand von Lichtstreuung beobachtet wurde (Nemeth *et al.*, 1995). Da für eine exakte Charakterisierung eine Proteinpräparation ohne Aggregate erforderlich war, musste zunächst nach Bedingungen gesucht werden, unter denen PABPN1 nicht aggregierte. Frisch gereinigtes PABPN1 lag nach der Vorschrift von Wahle in 50 mM Tris/HCl pH 7.9, 10 % (v/v) Glycerin, 100 mM KCl, 1 mM EDTA und 0.5 mM DTT vor. Zur Ermittlung geeigneter Pufferbedingungen, die eine Aggregation unterdrücken bzw. deutlich verzögern, wurden Proteinlösungen gegen verschiedene Puffer dialysiert und das Aggregationsverhalten alle 24 h anhand der Lichtstreuung beobachtet. Unter Verwendung von 50 mM MOPS pH 6.5 und einer hohen Ionenstärke von 1.5 M KCl konnte die Aggregation für 3-4 Tage unterdrückt werden. Entscheidend scheint dabei die hohe Salzkonzentration zu sein. Um auch während der Aufreinigung Hochsalzbedingungen zu gewährleisten, wurde eine neue Reinigungsstrategie entwickelt (vgl. 2.2.5). Direkt nach dem Zellaufschluss wurde der Rohextrakt in Gegenwart von 1.5 M KCl auf eine Fractogel[®] EMD Phenyl (S) Säule geladen. Um bei der Elution die Aggregation zu unterdrücken, wurde anstatt mit einer niedrigen Salzkonzentration mit 1 M L-Arginin eluiert. L-Arginin wird in vielen Fällen bei der *in vitro* Faltung von Proteinen verwendet, um eine Aggregation von Faltungsintermediaten zu unterdrücken (Buchner & Rudolph, 1991). Die anschließende Bindung an den Kationentauscher Fractogel[®] EMD SO³⁻ (S) gelang durch Dialyse gegen argininfreien Puffer in Anwesenheit des Gelmaterials. Auf diese Weise wurde das Protein durch die Bindung an das Gelmaterial während der Dialyse auch bei niedrigen Salzkonzentration stabilisiert. Die anschließende Gelfiltration wurde wieder unter Hochsalzbedingungen in 50 mM MOPS, 1.5 M KCl pH 6.5 durchgeführt. Aus 6 l Kulturmedium konnten auf diese Weise 2-3 mg gereinigtes PABPN1 erhalten werden. Eine Analyse des gereinigten PABPN1 mittels SDS-PAGE zeigte eine Proteinbande bei ca. 50 kDa, wobei keine weiteren Verunreinigungen sichtbar waren (Abb. 3.1).

Durch N-terminale Proteinsequenzierung wurde die Identität des gereinigten Proteins nachgewiesen. Außerdem konnte in einem Aktivitätstest, bei dem die Bindung von PABPN1 an Poly(A) getestet wurde gezeigt werden, dass die Reinigung unter Hochsalzbedingungen keinen Einfluss auf die Funktion des Proteins hat. Der Aktivitätstest wurde freundlicherweise von Barbe Schulz (Institut für Biochemie MLU Halle-Wittenberg) durchgeführt.

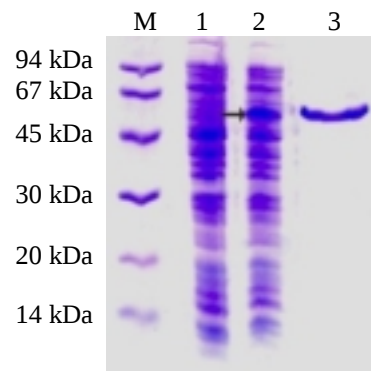


Abb. 3.1 SDS-PAGE zur Kontrolle der Expression und Reinheit von PABPN1. Bahn 1: Gesamtzellfraktion vor Induktion, Bahn 2: Gesamtzellfraktion nach dreistündiger Induktion, Bahn 3: gereinigtes PABPN1 nach Gelfiltration, M = Molekularmassenstandard.

3.1.2 Spektrale Eigenschaften von PABPN1

Für eine erste Charakterisierung von PABPN1 wurde ein Fern-UV-CD-Spektrum aufgenommen (Abb. 3.2 A). Aufgrund der hohen Salzkonzentration konnten im Wellenlängenbereich unter 210 nm keine auswertbaren Datenpunkte erhalten werden. Das Spektrum besitzt eine Schulter bei 215–225 nm. In Übereinstimmung mit Strukturvorhersagen mittels PredictProtein lässt die niedrige Signalamplitude auf einen geringen Anteil an Sekundärstrukturelementen im Protein schließen. Eine weitere Charakterisierung von PABPN1 wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie durchgeführt. Die Fluoreszenzemissions-Spektren von PABPN1 werden durch die Fluoreszenz des einzigen Tryptophanrestes bestimmt (Abb. 3.2 B). Natives PABPN1 besitzt ein Emissionsmaximum bei 344 nm. Unter denaturierenden Bedingungen verschiebt sich das Emissionsmaximum zu 354 nm. Eine solche Rotverschiebung des Emissionsmaximums kann durch die Veränderung der Umgebung der Tryptophanreste im Proteinmolekül erklärt werden. Befinden sich die Tryptophane in einer wässrigen Umgebung, so liegen dessen Emissionsmaxima bei ca. 350–353 nm (Burstein *et al.*, 1973). Die Einbettung der Seitenketten in eine hydrophobe Umgebung im Proteininneren führt zu Emissionsmaxima bei kürzeren Wellenlängen zwischen 320–340 nm. PABPN1 besitzt nur einen Tryptophanrest, welcher im C-terminalen Teil des Proteins an fünftletzter Position lokalisiert ist. Das Emissionsmaximum des nativen Proteins bei 344 nm deutet auf eine partielle Exposition dieses Tryptophanrestes hin.

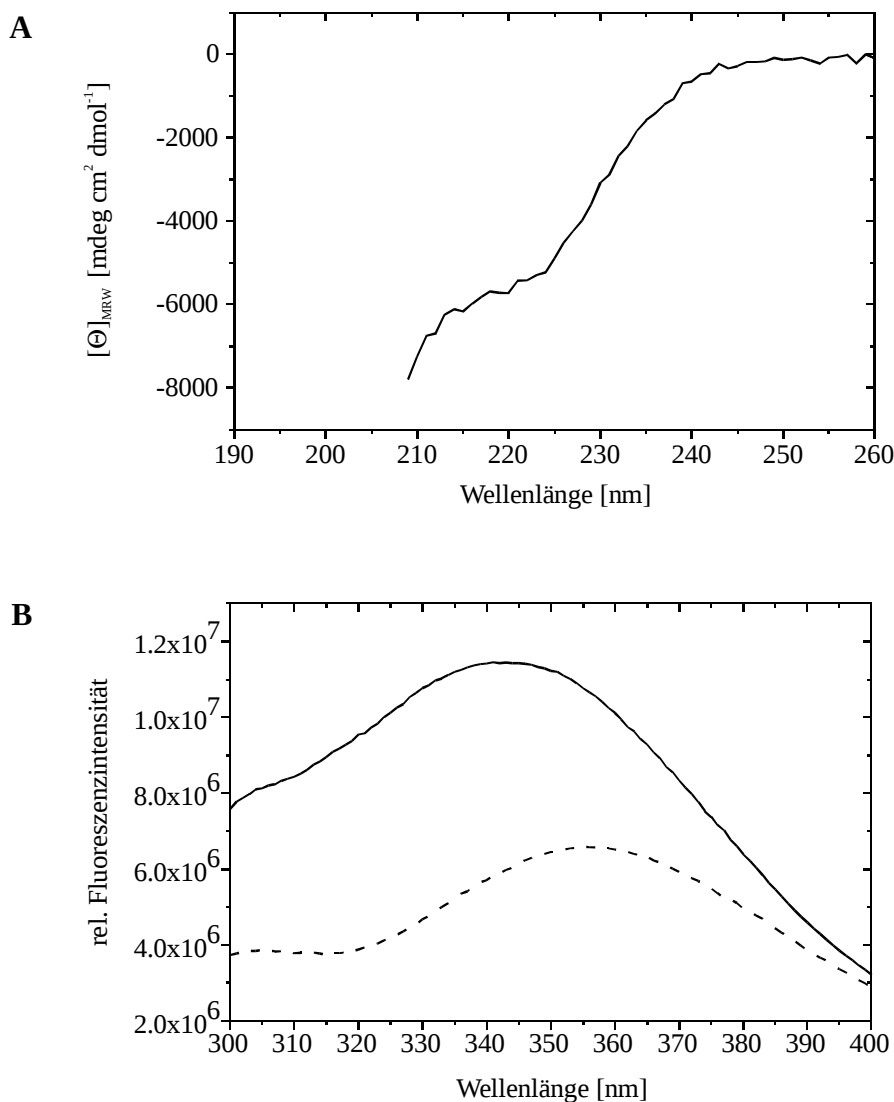


Abb. 3.2 A) Fern-UV-CD-Spektrum von PABPN1. Das Spektrum wurde in 50 mM MOPS, 1.5 M KCl, pH 6.5 in einer 1 mm Küvette bei 20°C aufgenommen und pufferkorrigiert. Die Proteinkonzentration betrug 9 μ M. **B) Fluoreszenzemissions-Spektren von PABPN1.** Das Spektrum des nativen Proteins (—) wurde in 50 mM MOPS, 1.5 M KCl, pH 6.5, das Spektrum des denaturierten Proteins (- - -) mit zusätzlich 4 M Guanidiniumthiocyanat bei einer Proteinkonzentration von 5 μ M und einer Anregungswellenlänge von 295 nm aufgenommen.

3.1.3 Thermische und chemische Stabilität

Zur Untersuchung der Stabilität von PABPN1 gegenüber dem Denaturierungsmittel Guanidiniumthiocyanat wurden Fluoreszenzspektren bei unterschiedlichen Guanidiniumthiocyanatkonzentrationen aufgenommen und deren Maxima bestimmt (Abb. 3.3 A). Bei niedrigen Guanidiniumthiocyanatkonzentrationen verschiebt sich das Emissionsmaximum zunächst zu niedrigeren Wellenlängen. Diese eher ungewöhnliche Blauverschiebung verläuft parallel zum Auftreten eines Lichtstreusignals und deutet auf die Bildung von Aggregaten hin. Die Aggregate lösen sich bei weiterer Erhöhung der

Guanidiniumthiocyanatkonzentration wieder auf. Das Protein liegt dann denaturiert vor und besitzt ein dafür typisches Emissionsmaximum bei 356 nm.

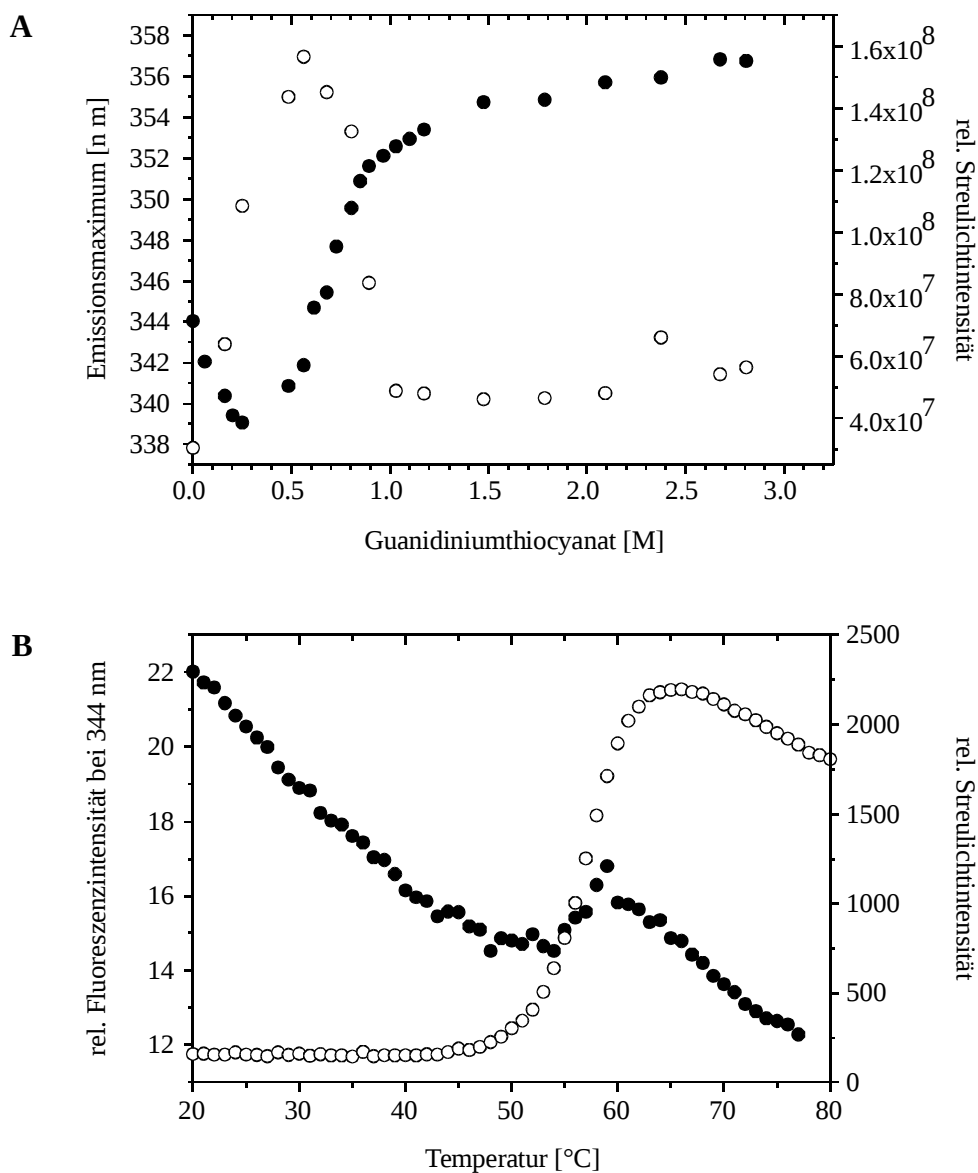


Abb. 3.3 A) Chemische Entfaltung von PABPN1. PABPN1 wurde bei einer Proteinkonzentration von 2 μM in 50 mM MOPS, 1.5 M KCl, pH 6.5 mit der jeweiligen Guanidiniumthiocyanatkonzentration verdünnt und 16 h bei 20°C inkubiert. Die Fluoreszenzmaxima (●) wurden von den pufferkorrigierten Fluoreszenzspektren bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm bestimmt. Die Lichtstreuung (○) wurde bei 360 nm (Anregungswellenlänge: 360 nm) gemessen. **B) Thermische Entfaltung von PABPN1.** Die Fluoreszenzemission (●) wurde bei 345 nm (Anregungswellenlänge: 295 nm), die Lichtstreuung (○) bei 360 nm (Anregungswellenlänge: 360 nm) bei einer Proteinkonzentration von 3.5 μM in Abhängigkeit von der Temperatur in 50 mM MOPS, 1.5 M KCl, pH 6.5 unter Rühren vermessen.

Neben der Stabilität gegenüber chaotrophen Chemikalien wurde die thermische Stabilität gemessen (Abb. 3.3 B). Analog der chemischen Entfaltung korreliert hier eine Intensitätszunahme des Fluoreszenzsignals mit dem Auftreten von Aggregaten, die erneut durch Lichtstreuungsmessungen detektiert wurden. Erste Aggregatbildungen wurden ab ca.

45°C beobachtet. Da sowohl die chemisch, als auch die thermisch induzierte Entfaltung von PABPN1 irreversibel sind, konnten keine thermodynamischen Parameter bestimmt werden.

3.1.4 Limitierte Proteolyse von PABPN1

PABPN1 besitzt selbst bei hoher Salzkonzentration, die eine ausführliche biophysikalische Charakterisierung von PABPN1 nicht zulässt, eine deutliche Aggregationstendenz. Ursache für die Aggregation könnte die entgegengesetzte Ladung der beiden Termini sein. Einzelne Domänen von PABPN1, die keine solche zwitterionische Struktur aufweisen, sollten ein besseres Löslichkeitsverhalten besitzen. Mit Hilfe einer limitierten Proteolyse sollten Domänen von PABPN1 identifiziert werden. Hierfür wurde PABPN1 mit Trypsin im Massenverhältnis von 1:600 inkubiert, und die Proteolyse zu verschiedenen Zeitpunkten anhand einer SDS-PAGE analysiert.

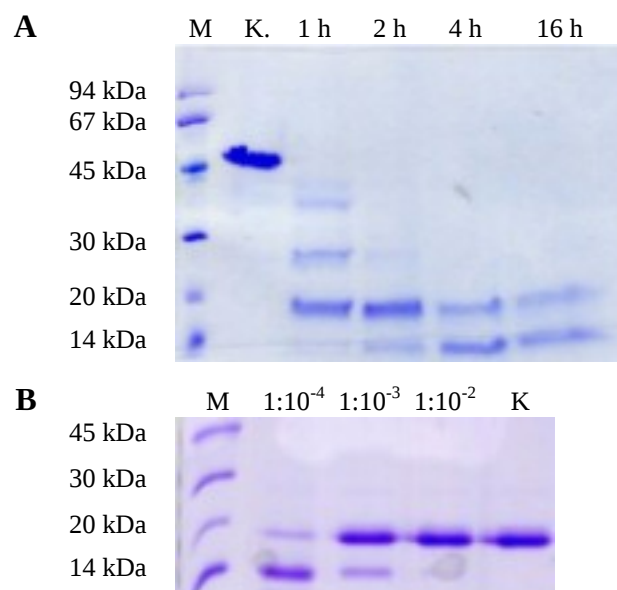


Abb. 3.4 A) Tryptischer Verdau von PABPN1. Die Proteolyse von 330 μ g/ml PABPN1 erfolgte in 50 mM MOPS, 1.5 M KCl, pH 6.5 bei 20°C mit 690 ng/ml Trypsin. 20 μ l des Ansatzes wurden nach verschiedenen Zeitpunkten auf eine SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Als Kontrolle (K) wurde ein Ansatz ohne Trypsin nach 16 h Inkubationszeit aufgetragen. **B) Chymotryptischer Verdau von α -RNP.** Die Proteolyse erfolgte in 100 mM Tris, 10 mM CaCl₂, pH 7.8 bei 20°C und einer Proteinkonzentration von 500 μ g/ml α -RNP und Chymotrypsin in verschiedenen Massenverhältnissen. Die Reaktion wurde nach 1 h abgestoppt und 10 μ l auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Als Kontrolle (K) wurde ein Ansatz ohne Chymotrypsin nach 2 h aufgetragen.

Zunächst wurde im SDS-PAGE-Gel ein stabiles Fragment bei ca. 18 kDa beobachtet (Abb. 3.4 A). Dieses wurde bei längerer Inkubation zu einem kleineren Fragment von ca. 13 kDa abgebaut. Für eine Zuordnung im Protein wurden die Fragmente nach Auftrennung im SDS-PAGE-Gel auf eine PVDF-Membran geblottet und N-terminal ansequenziert. Eine

einheitliche Sequenz ergab sich nur bei dem größeren 18 kDa Fragment. Die ermittelte Aminosäuresequenz (VREME) konnte den Aminosäuren 126-130 von PABPN1 zugeordnet werden. Zur Ermittlung der C-terminalen Schnittstelle wurde das Fragment mittels RP-HPLC gereinigt und anschließend durch Massenspektrometrie analysiert. Die Masse von 15443 Da entspricht einer Domäne von PABPN1, welche die Reste M₁₂₆-R₂₆₃ umfasst. Dieses Fragment, flankiert durch zwei tryptische Schnittstellen, enthält das RNP-I- und RNP-II-Motiv und besitzt N-terminal eine α -Helix. Diese Domäne wurde mit α -RNP bezeichnet.

Die N-terminale Sequenzanalyse des kleineren 13 kDa Fragments ergab keine einheitliche Sequenz. Vielmehr wurden verschiedene N-Termini ab Aminosäure 145 von PABPN1 ermittelt, wobei diese Fragmente auf eine chymotryptische Proteolyse hinwiesen. Möglicherweise sind leichte Verunreinigungen des Trypsins mit Chymotrypsin eine Ursache für diese Proteolyseprodukte. Um für das 13 kDa Fragment eine eindeutige N-terminale Sequenz bestimmen zu können, wurde die gereinigte α -RNP-Domäne einem Verdau mit Chymotrypsin unterzogen (Abb. 3.4 B). Hierbei wurde, wie vermutet, ein Fragment mit einer Größe von ca. 13 kDa im SDS-PAGE-Gel erhalten. Bei der N-terminalen Sequenzanalyse konnte dieses Mal eine einheitliche Sequenz (SIEEK) bestimmt werden, welche den Aminosäuren 161-165 von PABPN1 entsprach.

Für eine weitere biophysikalische Charakterisierung wurden nach Auswertung der limitierten Proteolyse mit Trypsin bzw. Chymotrypsin folgende Domänen kloniert: die N-terminale Domäne mit den Aminosäuren 1-125 (N-WT), die RNP-Domäne bestehend aus den Aminosäureresten 161-263, sowie die α -RNP-Domäne von Aminosäure 126-263. Eine schematische Darstellung der klonierten Domänen ist in Abb. 3.5 gezeigt.

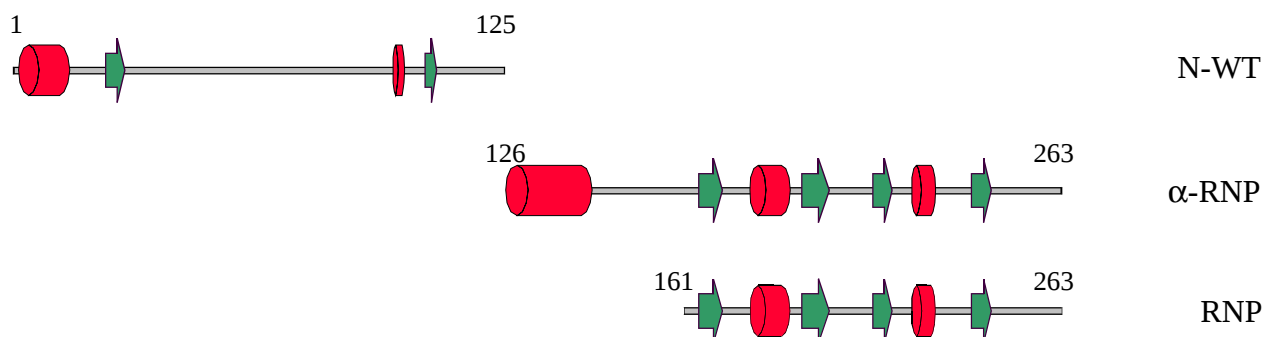


Abb. 3.5 Schematische Darstellung der klonierten Konstrukte von PABPN1. Sekundärstrukturelemente, die mittels PredictProtein vorhergesagt wurden, sind durch rote Zylinder (α -Helix) und grüne Pfeile (β -Strang) dargestellt. Die Nummerierung der Aminosäuren entspricht der von PABPN1.

3.2 Untersuchungen einzelner Domänen von PABPN1

3.2.1 Expression und Reinigung der N-terminalen Domäne (N-WT)

Eine Expression der N-terminalen Domäne von PABPN1 (N-WT) konnte nur im Kontext mit einem N-terminalen His-tag erreicht werden. Für die Reinigung von N-WT wurde deshalb zunächst eine Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA und anschließend eine Gelfiltration durchgeführt. Das so erhaltene Protein lässt sich bei ca. 25 kDa ohne sichtbare Verunreinigungen mit SDS-PAGE nachweisen (Abb. 3.6.).

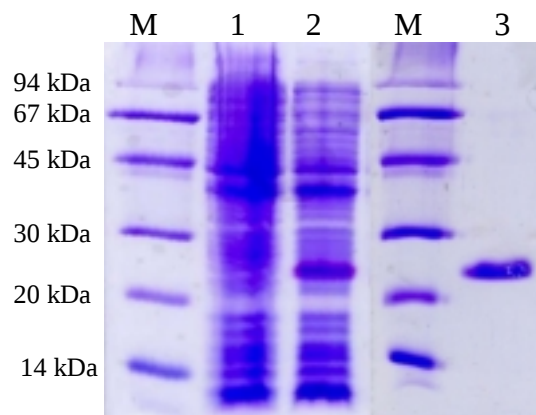


Abb. 3.6 SDS-PAGE zur Kontrolle der Expression und Reinheit der N-terminalen Domäne von PABPN1 (N-WT). Bahn 1: Gesamtzellfraktion vor Induktion, Bahn 2: Gesamtzellfraktion nach dreistündiger Induktion, Bahn 3: gereinigte N-terminale Domäne von PABPN1 nach Gelfiltration, M = Molekularmassenstandard.

Aus 6 l Kulturmedium wurden 5 - 10 mg gereinigtes N-WT erhalten. Laut Strukturvorhersagen wurden für N-WT keine ausgeprägten Sekundärstrukturen erwartet, dennoch wurde weder bei der Expression noch während der Reinigung ein proteolytischer Abbau beobachtet. Die Identität des gereinigten Proteins wurde durch N-terminale Sequenzierung und Bestimmung der Masse bestätigt. Eine Aggregationstendenz wie bei PABPN1 wurde, selbst bei hohen Proteinkonzentrationen (2.2 mM) in einem pH-Wert Bereich von 4.5–9.0, nicht beobachtet.

3.2.2 Charakterisierung von gereinigtem N-WT

Zur Analyse des Sekundärstrukturgehaltes von N-WT wurden Fern-UV-CD-Spektren mit und ohne Denaturierungsmittel aufgenommen (Abb. 3.7 A). Das Spektrum in Anwesenheit von 6 M Guanidiniumhydrochlorid zeigt den Verlauf einer vollständig entfalteten Polypeptidkette. Ohne Denaturierungsmittel verläuft das Spektrum mit einer breiten Schulter bei 215-223 nm und einem tiefen Minimum bei 198 nm. Die geringe Intensität der Schulter und das tiefe Minimum bei 198 nm deuten auf eine überwiegend durch *random coil* geprägte Struktur hin, die nur sehr geringe Anteile von Sekundärstrukturelementen aufweist.

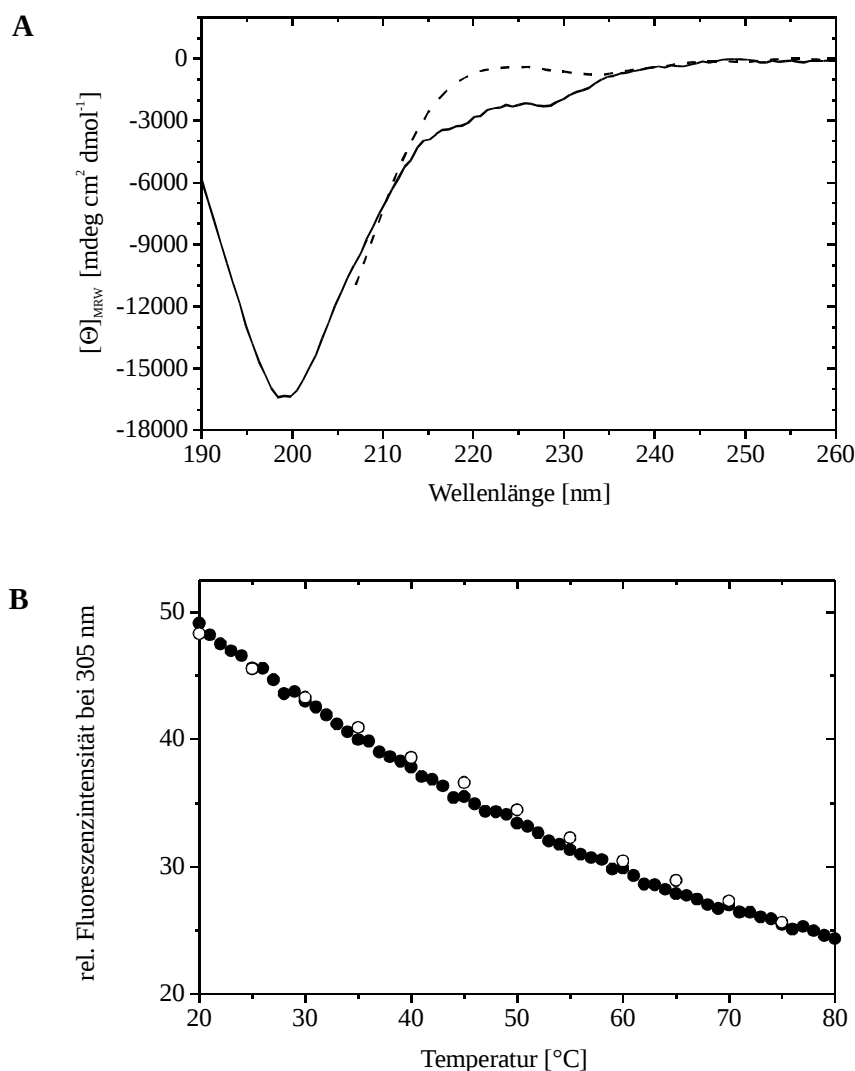


Abb. 3.7 A) Fern-UV-CD-Spektren der N-terminalen Domäne von PABPN1. CD-Spektren von N-WT wurden in 5 mM MOPS, pH 6.5 (—) in einer 0.1 mm Küvette und in 5 mM MOPS, 6 M Guanidiniumhydrochlorid, pH 6.5 (- - -) in einer 1 mm Küvette gemessen. Beide Spektren wurden bei einer Proteinkonzentration von 70 μ M aufgenommen und pufferkorrigiert. **B) Temperaturinduzierte Entfaltung von N-WT.** Die Fluoreszenzemission wurde bei 305 nm (Anregungswellenlänge: 277 nm) in einer rührbaren 1 cm Küvette in 5 mM MOPS, pH 6.5 in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen. Während der Aufheizphase (●) wurden Datenpunkte in 1°C-Schritten, während der die Abkühlphase (○) in 5°C-Schritten aufgenommen.

Für eine geringe Strukturierung von N-WT spricht auch der nicht-kooperative Verlauf der thermischen Denaturierung (Abb. 3.7 B). Sowohl in der Aufheiz- als auch in der Abkühlphase wurde eine nahezu lineare Änderung des Fluoreszenzsignals beobachtet. Auch die chemischen Entfaltungen mittels Guanidiniumthiocyanat und Harnstoff besaßen keinen kooperativen Kurvenverlauf. Die isolierte N-terminale Domäne weist vermutlich keine nennenswerte Tertiärstruktur auf.

3.2.3 Expression und Reinigung von RNP und α -RNP

Sowohl bei RNP als auch bei α -RNP konnte eine sehr starke Überexpression mit dem Expressionsplasmid pET11a/RNP bzw. pET11a/ α -RNP erreicht werden (Abb. 3.8). Die Aufreinigung von RNP und α -RNP erfolgte, wie in Kap. 2.2.5 beschrieben. Eine Stabilisierung durch Hochsalzbedingungen wie bei PABPN1 wurde nicht benötigt. Beide Proteine konnten ohne Aggregatbildung in hohen Konzentrationen (> 1.5 mM) erhalten werden. Aus 6 l Kulturmedium wurde in beiden Fällen eine Ausbeute von 50–70 mg erzielt. Nach der abschließenden Gelfiltration waren mittels SDS-PAGE weder bei RNP noch bei α -RNP Verunreinigungen detektierbar (Abb. 3.8).

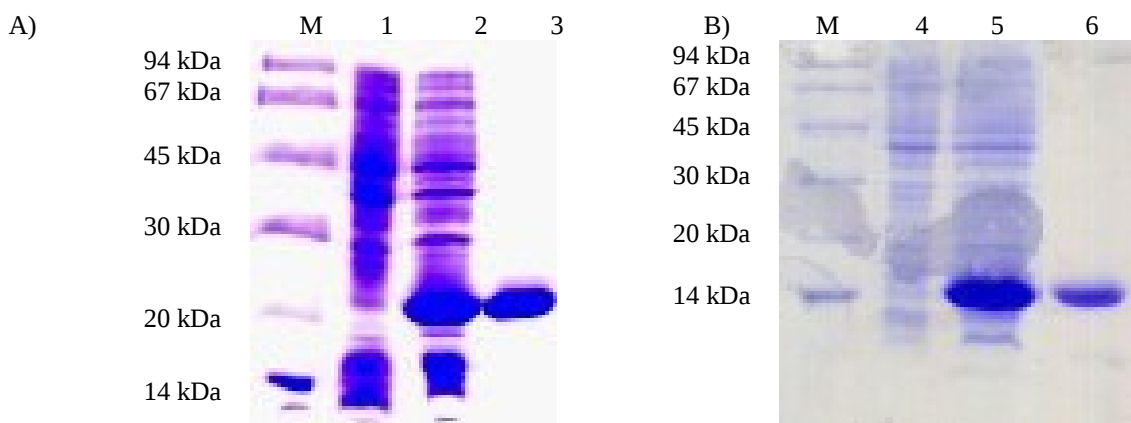


Abb. 3.8 SDS-PAGE zur Kontrolle der Expression und Reinheit von A) α -RNP und B) RNP. Bahn 1 und 4: Gesamtzellfraktion vor Induktion, Bahn 2 und 5: Gesamtzellfraktion nach dreistündiger Induktion, Bahn 3 und 6: gereinigte Proteindomänen nach Gelfiltration, M = Molekularmassenstandard.

Die Identität der gereinigten Proteine wurde mittels Massenspektrometrie überprüft (vgl. Anhang). Während die RNP-Domäne als homogene Spezies ohne Startmethionin vorlag, waren 20 % der Präparation der α -RNP-Domäne mit Startmethionin.

3.2.3.1 Charakterisierung von RNP und α -RNP mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie

Zur Analyse des Sekundärstrukturgehalts wurden Fern-UV-CD-Spektren beider Proteine aufgenommen (Abb. 3.9 A). Das Spektrum von RNP, mit einer kleinen Schulter bei ca. 221 nm und zwei schwach ausgeprägten Minima bei 212 und 207 nm, weist auf das Vorhandensein von α - und β -Strukturen hin. Bei α -RNP, das aminoterminal um 35 Aminosäuren länger ist, wird das Fern-UV-CD-Spektrum deutlich durch α -helikale Anteile bestimmt. Es wurden ein Minimum bei 210 nm und zwei kleine Schultern bei 221 und 226 nm beobachtet. Für eine genauere Interpretation der Änderung der Sekundärstrukturanteile wurde ein Differenzspektrum anhand von Gl. 2.8 berechnet (Abb. 3.9 B).

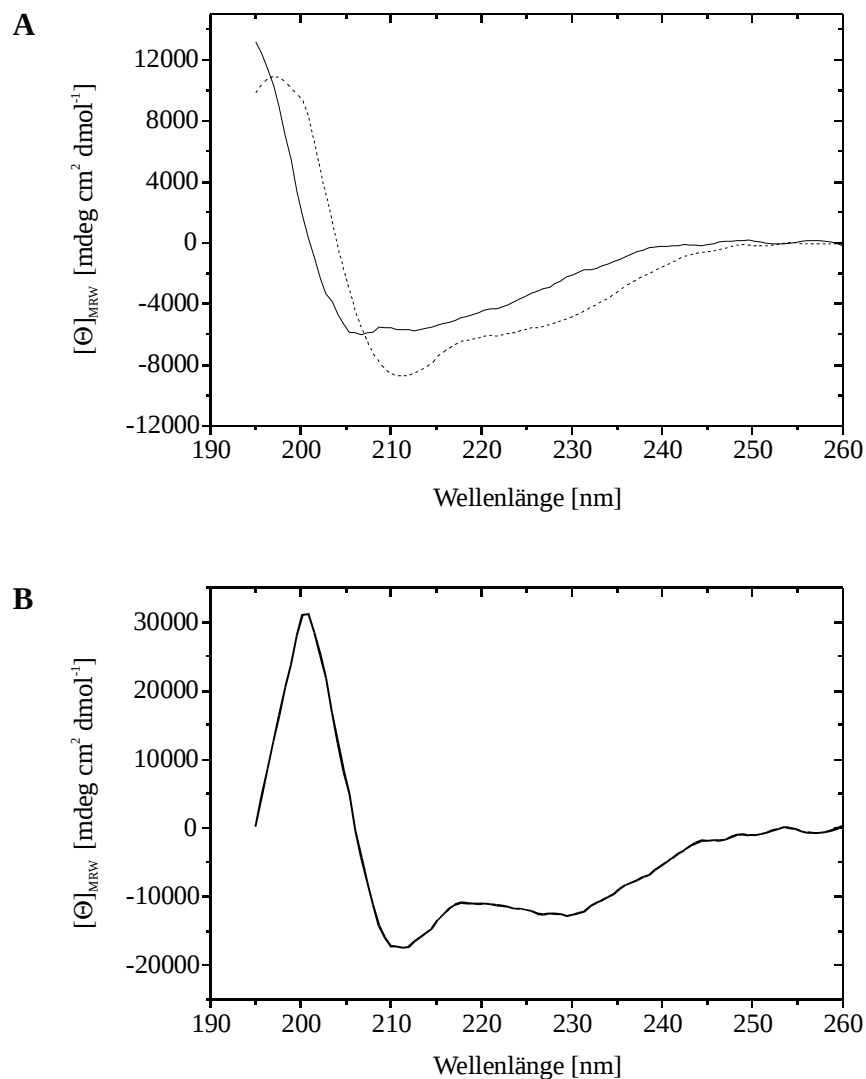


Abb. 3.9 A) Fern-UV-CD-Spektren von α -RNP und RNP. CD-Spektren von RNP (—) und α -RNP (- - -) wurden in 5 mM MOPS, pH 6.5 in 0.1 mm Küvetten bei einer Proteinkonzentration von 65 μ M bzw. 75 μ M aufgenommen und pufferkorrigiert. B) Berechnetes Differenzspektrum von α -RNP und RNP. Die Berechnung des Differenzspektrums erfolgte nach Gl. 2.8 mit $\Delta N = 35$ Aminosäuren.

Dabei werden zwei Minima bei 228 und 209 nm und ein Maximum bei 298 nm deutlich. Das entspricht weitgehend einem Fern-UV-CD-Spektrum eines α -helikalen Proteins und bestätigt die computergestützte Vorhersage einer α -helikalen Struktur für den Bereich dieser 35 Aminosäuren von α -RNP.

3.2.3.2 Untersuchungen zur Oligomerisierung von RNP und α -RNP

Berechnungen mit dem Programm COILS am EMBnet-Server ergaben eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung einer *coiled coil* Struktur der N-terminalen α -Helix von α -RNP (Lupas, 1996). Solche Strukturen dienen bei Proteinen meist zur Ausbildung von Dimeren oder höheren Oligomeren. Um eine Dimerisierung bzw. höhere Oligomerisierung von α -RNP zu untersuchen, wurden analytische Gelfiltrationsläufe an einer Superdex 75-Säule durchgeführt. Zunächst wurde die Säule mit BSA, Cytochrom C, Ovalbumin A und Carboanhydrase geeicht und das Ausschluss- und Gesamtvolumen mit Dextranblau und Aceton bestimmt. Die Quotienten der Elutionsvolumina (V_e) und dem Ausschlussvolumen (V_0) wurden gegen die logarithmierten Molekularmassen der Eichproteine aufgetragen. Die Eichgerade wurde durch lineare Regression erhalten (Abb. 3.10). Anschließend wurden Gelfiltrationsläufe mit unterschiedlichen Konzentrationen (10–60 μ M) von α -RNP und RNP durchgeführt. Eine konzentrationsabhängige Änderung des Elutionsvolumens wurde nicht beobachtet. Anhand der Eichgerade wurde für α -RNP eine Molekularmasse von ca. 24 kDa und für RNP von ca. 11 kDa ermittelt (Abb. 3.10).

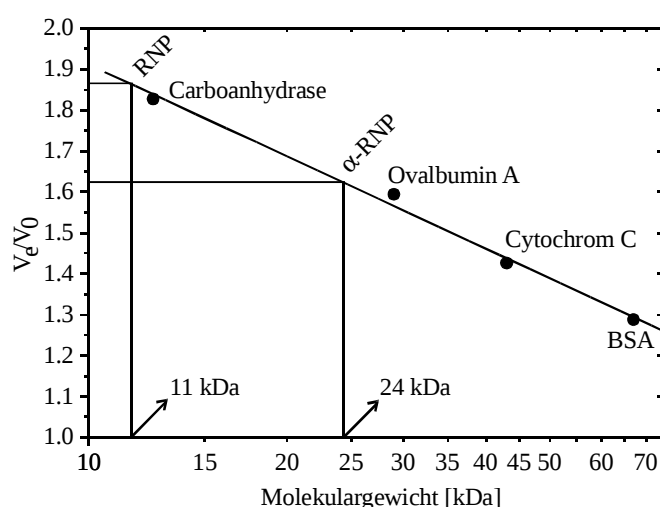


Abb. 3.10 Analytische Gelfiltration von α -RNP und RNP. Die Gelfiltrationsläufe der Eichproteine wurden bei einer Flussrate von 24 cm/h bei einer Konzentration von 0,5 mg/ml und einem Auftragsvolumen von 0,8 % des Säulenvolumens durchgeführt. Das Ausschlussvolumen (V_0) wurde mittels Dextranblau unter gleichen Bedingungen bestimmt. Die Gelfiltrationsläufe von α -RNP und RNP erfolgten bei Konzentrationen von 10–60 μ M unter ebenfalls identischen Bedingungen.

Die durch Gelfiltration bestimmte Masse von RNP ist in sehr guter Übereinstimmung mit der eines Monomers (11.5 kDa). Da eine Massenbestimmung mittels Gelfiltration globuläre Proteine voraussetzt, kann weiterhin davon ausgegangen werden, dass die RNP-Domäne in einem globulär gefalteten Zustand vorliegt. Bei α -RNP hingegen lag die mit 24 kDa bestimmte Masse zwischen der eines Monomers (15.5 kDa) und eines Dimers (31 kDa).

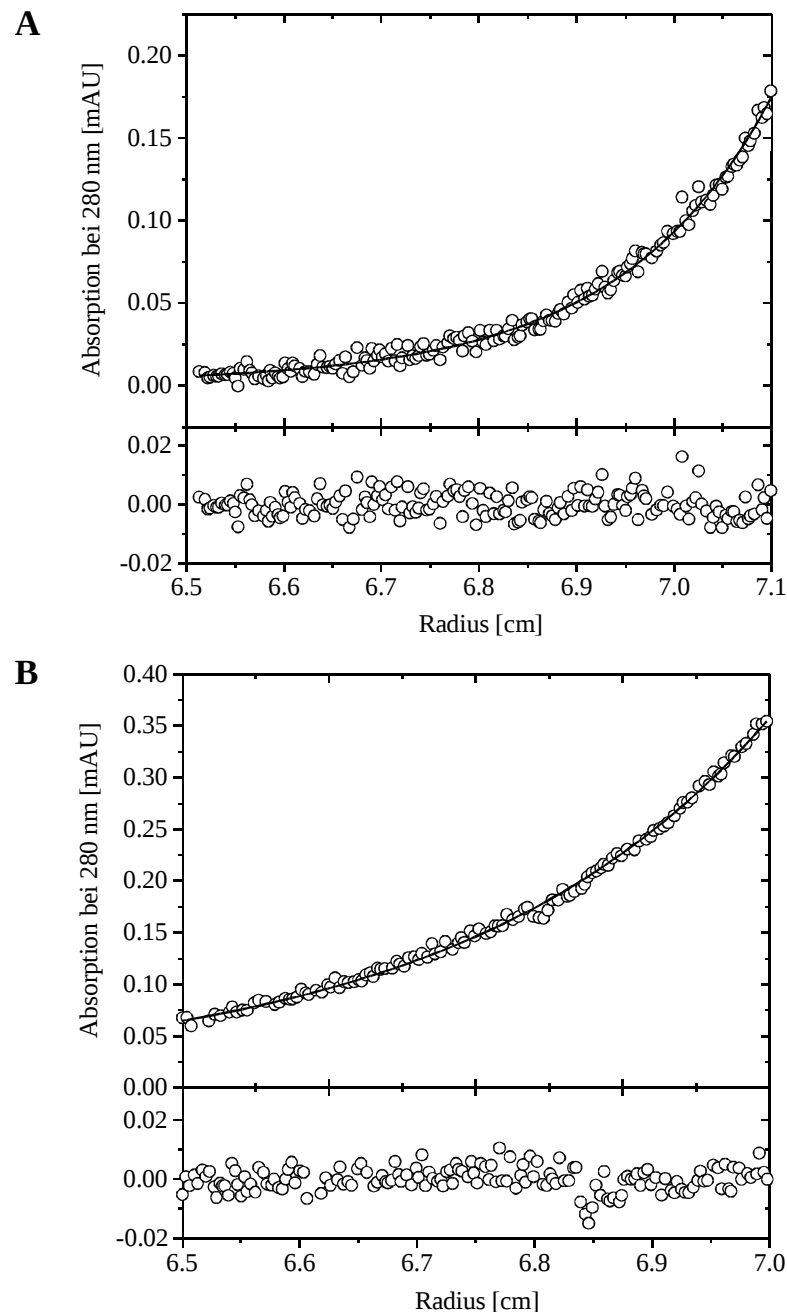


Abb. 3.11 Analytische Ultrazentrifugation von A) α -RNP und B) RNP. Dargestellt sind die jeweiligen Gleichgewichtsläufe bei 20000 rpm über 16 h bei 20°C. Die Läufe wurden in 5 mM MOPS, 100 mM NaCl, pH 6.5 bei einer Proteinkonzentration von 25 μ M α -RNP bzw. 30 μ M RNP durchgeführt. Unterer Teil: Abweichung des Kurvenangleichs von den experimentellen Daten

Um zu unterscheiden, ob diese Abweichung auf ein Gleichgewicht zwischen Monomeren und Dimeren hinweist, oder durch eine nicht-globuläre Molekülstruktur hervorgerufen wird, wurde die α -RNP-Domäne mittels Ultrazentrifugation untersucht. Dabei wurden sowohl Sedimentations- als auch Gleichgewichtsläufe mit der α -RNP-Domäne durchgeführt (Abb. 3.11). Die RNP-Domäne wurde als Kontrolle mitgeführt. Für α -RNP wurde eine Molekularmasse von ca. 15 kDa und für RNP eine Masse von ca. 11 kDa bestimmt. Beide Proteine liegen somit eindeutig monomer vor. Während die RNP-Domäne eine kompakte globuläre Molekülform besitzt, scheint die RNP-Domäne mit der zusätzlichen α -Helix nicht als globuläres Protein vorzuliegen.

3.2.3.3 Wechselwirkung der RNP-Domäne mit ssRNA

Untersuchungen zur Wechselwirkung von PABPN1 mit Poly(A) ergaben, dass durchschnittlich 11-15 Adenylatreste von einem Molekül PABPN1 gebunden werden (Meyer *et al.*, 2002; Nemeth *et al.*, 1995). Mittels Filterbindungsexperimenten wurde eine Dissoziationskonstante von $K_D = 2$ nM bestimmt (Wahle *et al.*, 1993). Im Folgenden wurde die Wechselwirkung der isolierten RNP-Domäne mit einer ssRNA mit 15 Adenylatresten (A_{15}) mittels Oberflächenplasmonresonanz untersucht. Die ssRNA wurde hierfür über Biotin an einem Streptavidin-Chip immobilisiert. Zur Ermittlung der Bindungskonstante wurde die Proteinlösung in einer Flusszelle über den Chip geleitet und die Massenzunahme konzentrationsabhängig gemessen (Abb. 3.12 A). Nach Injektion stellte sich durch eine sehr schnelle Assoziationsreaktion rasch ein Bindungsgleichgewicht ein. Die schnelle Abnahme des Resonanzsignals nach Beendigung der Injektion weist auf eine sehr schnelle Dissoziation hin. Die Ermittlung der Bindungskonstante erfolgte über die Resonanzintensitäten im Gleichgewicht nach Gl. 2.9. Der Kurvenangleich durch nichtlineare Regression ist in Abb. 3.12 B gezeigt. Es wurde eine Dissoziationskonstante von $K_D = 1.1 \pm 0.2$ μ M bestimmt. Die Spezifität der Bindung zwischen der RNP-Domäne und immobilisierter RNA wurde durch Kompetitionsversuche mit freiem A_{15} gezeigt. Hierzu wurden unterschiedliche Konzentrationen an freiem A_{15} mit einer konstanten Konzentration von RNP vorinkubiert und anschließend die Bindung an immobilisiertes A_{15} gemessen. Die hierbei erhaltenen Sensogramme sind in Abb. 3.13 A dargestellt. Die Auswertung der Resonanzsignale im Gleichgewicht (Abb. 3.13 B) ergab in guter Übereinstimmung mit dem zuvor bestimmten Wert eine Dissoziationskonstante von $K_D = 0.7 \pm 0.2$ μ M. Eine unspezifische Wechselwirkung der RNP-Domäne mit dem Sensorchip kann somit ausgeschlossen werden.

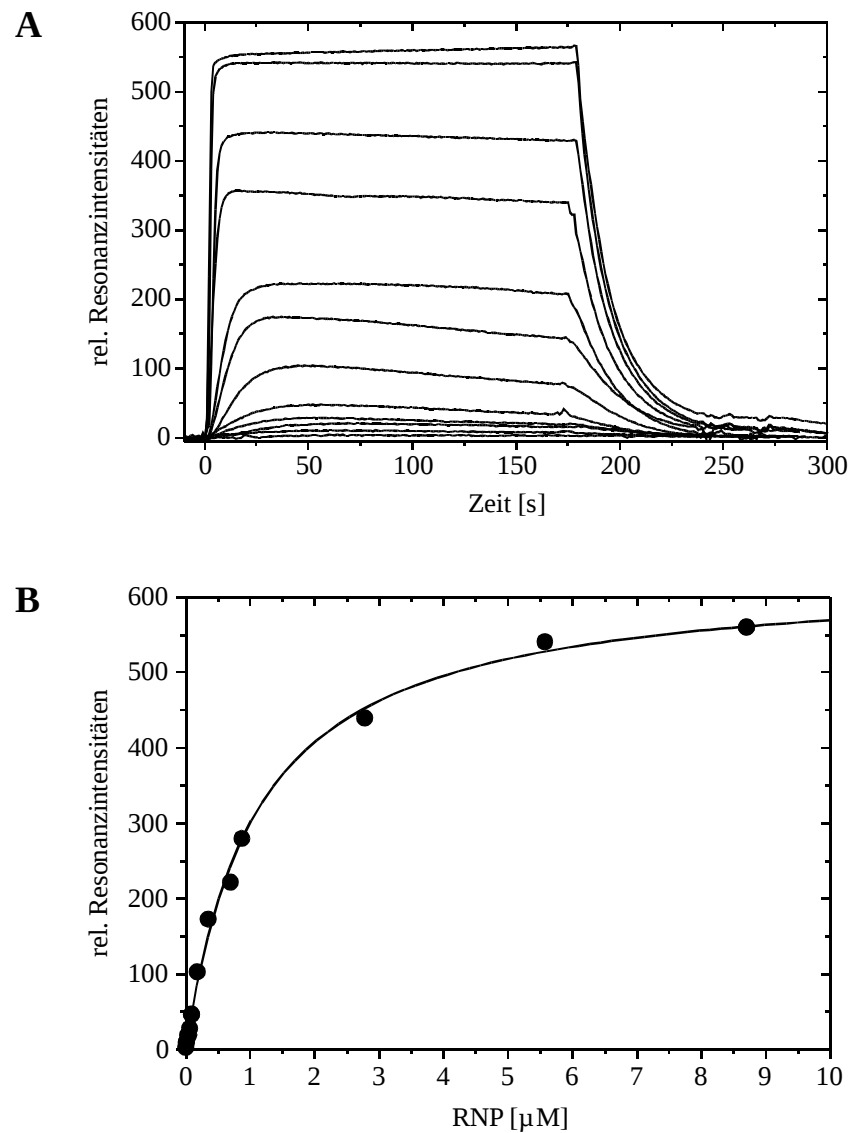


Abb. 3.12 A) Sensogramme der Bindung von RNP an einen Sensorchip mit immobilisiertem A₁₅. Die Sensogramme wurden bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen mit einer Flussrate von 15 $\mu\text{l}/\text{min}$ in 50 mM MOPS, 100 mM NaCl, pH 6.5 bei 20°C gemessen. **B) Resonanzintensitäten der Bindungsmessungen im Gleichgewicht.** Die ermittelten Resonanzintensitäten im Bindungsgleichgewicht wurden gegen die Proteinkonzentration aufgetragen und mit Hilfe des Programms BIAevaluation 3.0 (Biacore AB, Freiburg) unter der Annahme einer 1:1 Bindung die Dissoziationskonstante nach Gl. 2.15 bestimmt.

In unabhängigen Filterbindungsexperimenten wurde für die isolierte RNP-Domäne eine Bindungskonstante von 1.5 μM bestimmt (Kühn, persönliche Mitteilung). Die ermittelte Dissoziationskonstante der isolierten RNP-Domäne ist um drei Zehnerpotenzen höher als die des Gesamtproteins. Die isolierte RNP-Domäne bindet zwar ssRNA, für eine starke Wechselwirkung scheinen jedoch weitere Bereiche von PABPN1 verantwortlich zu sein.

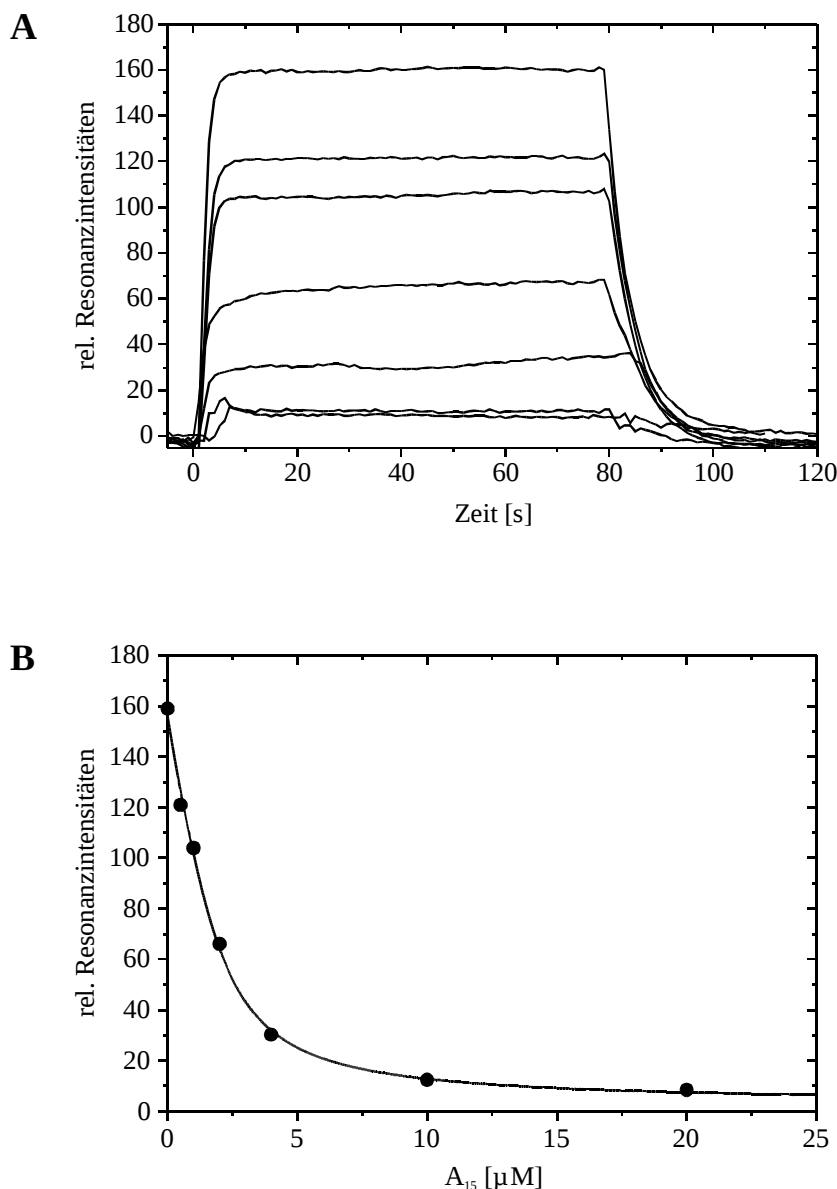


Abb. 3.13 A) Sensogramme der Konkurrenzexperimente zur Wechselwirkung der RNP-Domäne mit A_{15} . Unterschiedliche Konzentrationen an freiem A_{15} wurden mit $1.6 \mu\text{M}$ RNP in 5 mM MOPS, 100 mM NaCl, $\text{pH } 6.5$ für 1 min inkubiert und anschließend die Bindung an einem Sensorchip mit immobilisiertem A_{15} gemessen. **B) Resonanzintensitäten der Konkurrenzmessungen im Gleichgewicht.** Aufgetragen wurden die Resonanzintensitäten im Gleichgewicht gegen die Konzentrationen an freiem A_{15} . Die Bestimmung der Dissoziationskonstante erfolgte durch nichtlineare Regression unter Verwendung von Gl. 2.15.

3.2.3.4 Stabilität der RNP-Domäne gegenüber chemischen Denaturierungsmitteln

Nach Überprüfung der Funktionalität der RNP-Domäne wurde deren Stabilität gegenüber chemischen Denaturierungsmitteln untersucht. Beobachtet wurde die Änderung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Guanidiniumthiocyanatkonzentration (Abb. 3.14 A). Der Übergang vom nativen in den denaturierten Zustand verlief reversibel. Mit Gl. 2.4 und Gl. 2.5 wurde die freie Stabilisierungsenthalpie zu $\Delta G(\text{H}_2\text{O}) = 15.2 \pm 0.8 \text{ kJ/mol}$ und eine Kooperativität von $31.6 \pm 1.8 \text{ kJ/mol/M}$ bestimmt. Der Übergangsmittelpunkt liegt bei ca.

0.5 M Guanidiniumthiocyanat. Da die Entfaltung bereits bei relativ geringen Guanidiniumthiocyanatkonzentrationen beginnt, stehen nur wenig Datenpunkte zur Ermittlung der linearen Abhängigkeit der Fluoreszenz des nativen Proteins von der Denaturierungsmittelkonzentration zur Verfügung. Deshalb wurde die mit Guanidiniumthiocyanat berechnete freie Stabilisierungsenthalpie durch Messungen mit dem schwächeren Denaturierungsmittel Harnstoff überprüft (Abb. 3.14 B).

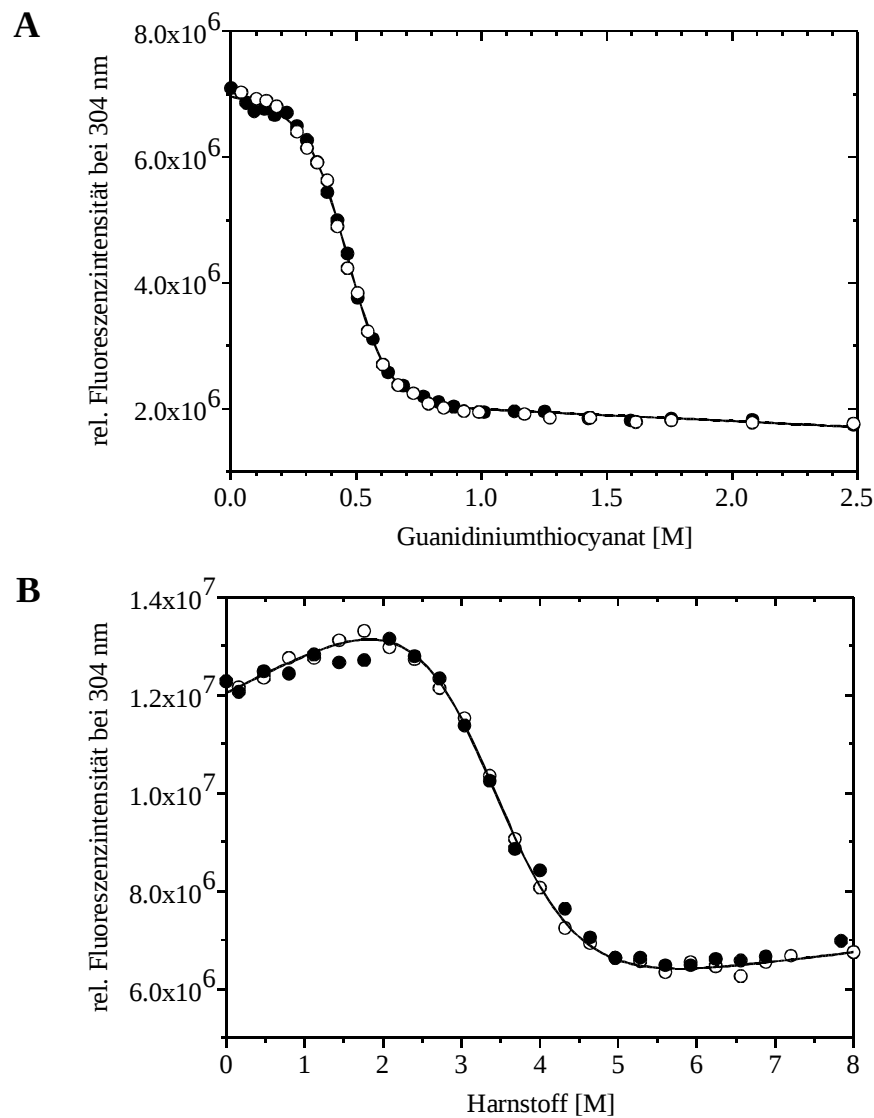


Abb. 3.14 Chemisch induzierte Entfaltungs- und Rückfaltungsübergänge mit A) Guanidiniumthiocyanat und B) Harnstoff, gemessen mit Fluoreszenzemissionsspektroskopie. Für die Messungen der Entfaltungsübergänge (●) wurde die native RNP-Domäne, für die Rückfaltungsübergänge (○) die denaturierte RNP-Domäne in Pufferlösungen mit unterschiedlichen Denaturierungsmittelkonzentrationen verdünnt. Nach 16 h Inkubation bei 20°C wurden die Proben in einem Fluoreszenzspektrometer vermessen. Die Denaturierungsmittelkonzentration wurde refraktometrisch bestimmt. Die Proteinkonzentration bei den Übergangsmessungen mit Guanidiniumthiocyanat betrug 35 µg/ml, mit Harnstoff 50 µg/ml. Die Auswertung erfolgte nach Pufferkorrektur der einzelnen Fluoreszenzspektren bei 304 nm (Anregungswellenlänge: 277 nm).

Hierbei waren ausreichend Messpunkte vorhanden, um alle Parameter aus Gl. 2.4 sicher bestimmen zu können. Die freie Stabilisierungsenthalpie wurde zu $\Delta G(H_2O) = 15.1 \pm 0.8$ kJ/mol bestimmt. Dies steht in guter Übereinstimmung mit dem bestimmten Wert aus dem Übergang mit Guanidiniumthiocyanat. Die Kooperativität wurde zu $m = 4.5 \pm 0.3$ kJ/mol/M bestimmt. Der Übergangsmittelpunkt lag bei 3.3 M Harnstoff. Eine thermische Entfaltung verlief unter Aggregation.

3.2.3.5 Kristallisation einzelner Domänen zur Aufklärung der 3D-Struktur

Für eine Aufklärung der 3D-Struktur von PABPN1 mittels röntgenographischen Untersuchungen an Proteinkristallen, wurden Kristallisationsversuche mit den einzelnen isolierten Domänen durchgeführt. Die Kristallisation erfolgte nach der Hängetroppmethode. Um erste Bedingungen für ein Kristallwachstum zu ermitteln, wurden die Pufferbedingungen aus den in Tab 2.14 aufgelisteten Screens der Firma Hampton Research verwendet. Die Proteinproben wurden vor Kristallisation gegen Wasser dialysiert und die Konzentration auf 8 mg/ml eingestellt. Um eine Oxidation der Cysteine von α -RNP und RNP auszuschließen, wurde nach 21 Tagen die Anzahl freier Cysteine bestimmt. RNP und α -RNP besitzen jeweils zwei freie Cysteine, die durch einen Ellmans-Test nachgewiesen werden konnten (Ellman, 1959).

Bei der RNP-Domäne konnten zwei verschiedene Kristallformen beobachtet werden. Unter den Bedingungen 100 mM HEPES, 20 % (w/v) PEG 6000, pH 7.0 und 100 mM Tris, 20 % (w/v) PEG 6000, pH 8.0 des Grid Screen PEG 6000TM wurden nach 4-7 Tagen Kristalle beobachtet. Da die Kristalle klein und verwachsen waren, wurden die Kristallisationsbedingungen verfeinert. Hierzu wurden zunächst der pH-Wert und die Fällungsmittelkonzentration variiert. Eine weitere Optimierung wurde im Rahmen eines Forschungsgruppenpraktikums von Grit Lodderstedt durchgeführt. Die optimierten Bedingungen, unter denen größere Einkristalle erhalten wurden, sind in Tab. 3.1 aufgelistet (Abb. 3.15). Die Kristalle wurden röntgenographisch von Prof. Dr. M. Stubbs untersucht. Sie besaßen eine monokline Raumgruppe und beugten bis 2.1 Å, wobei ein vollständiger Datensatz bis 2.6 Å aufgenommen wurde.

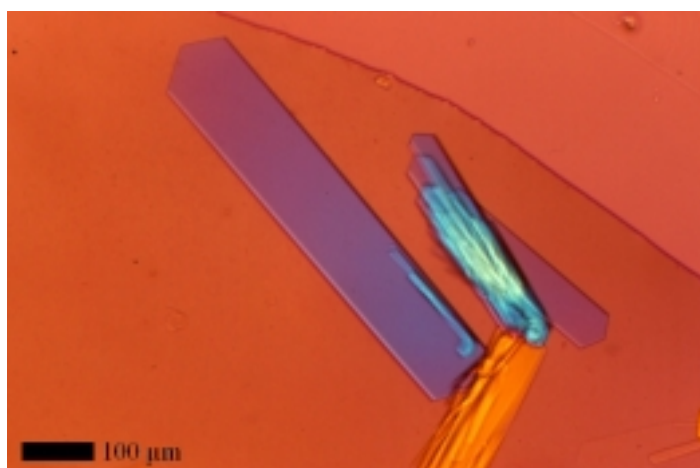
Eine weitere Kristallform wurde nach ca. 90 Tagen in 100 mM NaAc, 100 mM CdCl₂ und 30 % PEG 400, pH 4.6 des Crystal ScreensTM II beobachtet (Abb. 3.15 B). Die Kristalle lagen zwar einzeln vor, waren jedoch sehr klein. Röntgenographische Untersuchungen

ergaben, dass es sich hierbei um einen Kristallzwilling handelte, welcher für eine Strukturaufklärung ungeeignet ist. Eine Auswertung erfolgte deshalb nur mit dem Datensatz der monoklinen Kristallform. Für die Zuordnung der Elektronendichte der röntgenographischen Daten wurde versucht, mit dem Programm MOLREP anhand bekannter Strukturen ähnlicher RNP-Domänen die Phasenbestimmung durchzuführen. Obwohl diese Domänen alle eine sehr ähnliche Faltung besitzen, konnten die Phasen bisher nicht bestimmt werden. Deshalb sollen nun weitere Kristallisationsansätze unter Verwendung von Schweratomderivaten durchgeführt werden.

Tab. 3.1 Optimierte Bedingungen für die Kristallisation der RNP- Domäne

Bedingung	optimale Werte
Puffer zur Dialyse vor Kristallisation	5 mM Tris pH 8.0
eingesetzte Proteinkonzentration	6-8 mg/ml
Tropfengröße	4-10 μ l Proteinlösung + 10 μ l Kristallisationspuffer
Kristallisationspuffer	100 mM Tris
pH-Wert	8.0
Fällungsmittel	PEG 6000
Fällungsmittelkonzentration	16-20 % (w/v)
Temperatur	20°C

A)



B)

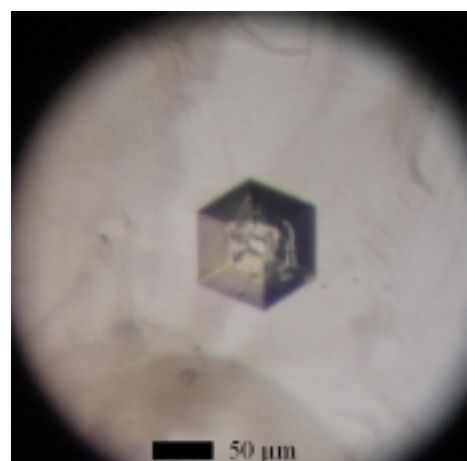


Abb. 3.15 A) Kristalle der RNP-Domäne unter optimierten Bedingungen. Der Kristallisationstropfen enthielt 10 μ l Proteinlösung (730 μ M RNP in 5 mM Tris, pH 8.0) und 10 μ l Kristallisationspuffer (100 mM Tris, 18 %, PEG 6000, pH 8.0) und wurden bei 20°C inkubiert. **B) Kristalle der RNP-Domäne aus dem Crystal Screen™ II.** Der Kristallisationstropfen enthielt 2 μ l Proteinlösung (730 μ M RNP in H_2O) und 2 μ l Kristallisationspuffer (100 mM NaAc, 100 mM $CdCl_2$, 30 % PEG 400, pH 4.6) und wurde ebenfalls bei 20°C inkubiert.

3.3 Untersuchungen zum Einfluss der Alaninexpansion und Alanindeletion auf PABPN1

Als genetische Ursache für OPMD wurden GCG-Expansionen am 5'-Ende des *PABPN1*-Gens identifiziert. Über den molekularen Zusammenhang zwischen der daraus resultierenden verlängerten Alaninsequenz am N-Terminus von PABPN1 und den beobachteten nukleären Aggregaten in Muskelgewebszellen von Patienten gab es bislang keine Erkenntnisse. In dieser Arbeit wurden daher Mutanten mit der längsten bekannten Alaninexpansion (PABPN1-(+7)Ala) und eine nicht natürliche Mutante mit deletierter Alaninsequenz (PABPN1-ΔAla) detailliert *in vitro* untersucht.

3.3.1 Expression und Reinigung von PABPN1-(+7)Ala und PABPN1-ΔAla

Eine Überexpression von PABPN1-(+7)Ala mit dem Expressionsplasmid pET11a/PABPN1-(+7)Ala konnte durch Analyse mittels SDS-PAGE nicht detektiert werden. Als Ursache wurde die Ausbildung eines sehr stabilen *Hairpin Loops* innerhalb der ersten 25 Nukleotide der kodierenden Sequenz vermutet. Durch eine ortsgerichtete Mutagenese wurde diese Sequenz so verändert, dass die Bildung des *Hairpin Loops* unterdrückt wurde, ohne die kodierte Aminosäuresequenz zu verändern. Mit dem erhaltenen Expressionsplasmid pET11a/PABPN1-(+7)AlaQC konnte nun eine Überexpression mittels SDS-PAGE-Gel nachgewiesen werden (Abb. 3.16).

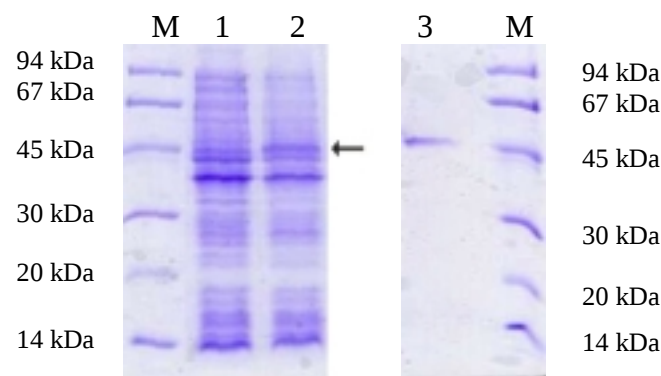


Abb. 3.16 SDS-PAGE zur Kontrolle der Expression und Reinheit von PABPN1-(+7)Ala. Bahn 1: Gesamtzellfraktion vor Induktion, Bahn 2: Gesamtzellfraktion nach dreistündiger Induktion, Bahn 3: gereinigtes PABPN1-(+7)Ala nach Gelfiltration, M = Molekularmassenstandard.

Die Reinigung von PABPN1-(+7)Ala erfolgte analog zu PABPN1, wobei aus 6 l Kulturmedium 1-2 mg gereinigtes PABPN1-(+7)Ala erhalten wurden. PABPN1-ΔAla wurde unter Verwendung des Plasmids pET11a/PABPN1-ΔAla überexprimiert und ebenfalls nach der Vorschrift von PABPN1 gereinigt. Die Ausbeute aus 6 l Kulturmedium betrug 3–4 mg. Bei Analyse der gereinigten Proteinpräparation mittels SDS-PAGE wurden keine Verunreinigungen festgestellt (Abb. 3.16 und Abb. 3.17). Die Identifizierung der Proteine erfolgte durch N-terminale Sequenzierung. Aufgrund der höheren elektrophoretischen Mobilität der Alaninexpandierten Mutante im SDS-PAGE im Vergleich zum Wildtyp und der Deletionsmutante wurde PABPN1-(+7)Ala zusätzlich mittels Massenspektrometrie untersucht. Die experimentell bestimmte Masse von 33135,8 Da ist in sehr guter Übereinstimmung mit der theoretischen Masse von 33132,6 Da. Ein vorzeitiger Kettenabbruch bei der Proteinsynthese kann somit ausgeschlossen werden.

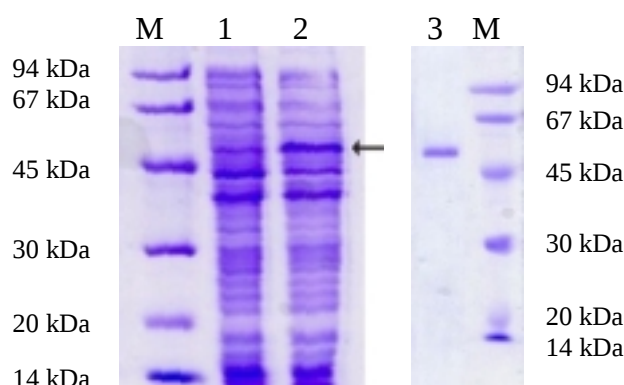


Abb. 3.17 SDS-PAGE zur Kontrolle der Expression und Reinheit von PABPN1-ΔAla. Bahn 1: Gesamtzellfraktion vor Induktion, Bahn 2: Gesamtzellfraktion nach dreistündiger Induktion, Bahn 3: gereinigtes PABPN1-ΔAla nach Gelfiltration, M = Molekularmassenstandard.

3.3.2 Untersuchungen zur Struktur und Stabilität von PABPN1-(+7)Ala und PABPN1-ΔAla

Zunächst wurden Fern-UV-CD-Spektren von PABPN1-(+7)Ala und PABPN1-ΔAla aufgenommen und mit dem von PABPN1 verglichen (Abb. 3.18 A). Weder die Mutante mit der Alaninexpansion noch die Mutante mit der Deletion der N-terminalen Alanine zeigte dabei eine markante Änderung des CD-Spektrums. Vielmehr besaßen alle drei Proteine ähnliche CD-Spektren. Das lässt darauf schließen, dass durch die N-terminalen Mutationen keine signifikanten Strukturänderungen im Protein induziert werden.

Die Stabilität der Mutanten gegenüber Guanidiniumthiocyanat wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie vermessen. Die Auswertung der Spektren erfolgte durch die

Auftragung der Emissionsmaxima gegen die Guanidiniumthiocyanatkonzentration. Die Emissionsmaxima der Proteine in nativem und denaturiertem Zustand entsprachen dem von PABPN1. Analog zum Wildtyp-Protein verschiebt sich das Emissionsmaximum bei geringer Guanidiniumthiocyanatkonzentration zu niedrigeren Wellenlängen (Abb. 3.18 B). Lichtstreuungsmessungen ergaben, dass die Mutanten ähnlich wie der Wildtyp bereits bei geringer Guanidiniumthiocyanatkonzentration aggregierten. Bei höheren Denaturierungsmittelkonzentrationen lösen sich die Aggregate wieder auf, wobei sich die Emissionsmaxima zu höheren Wellenlängen verschieben.

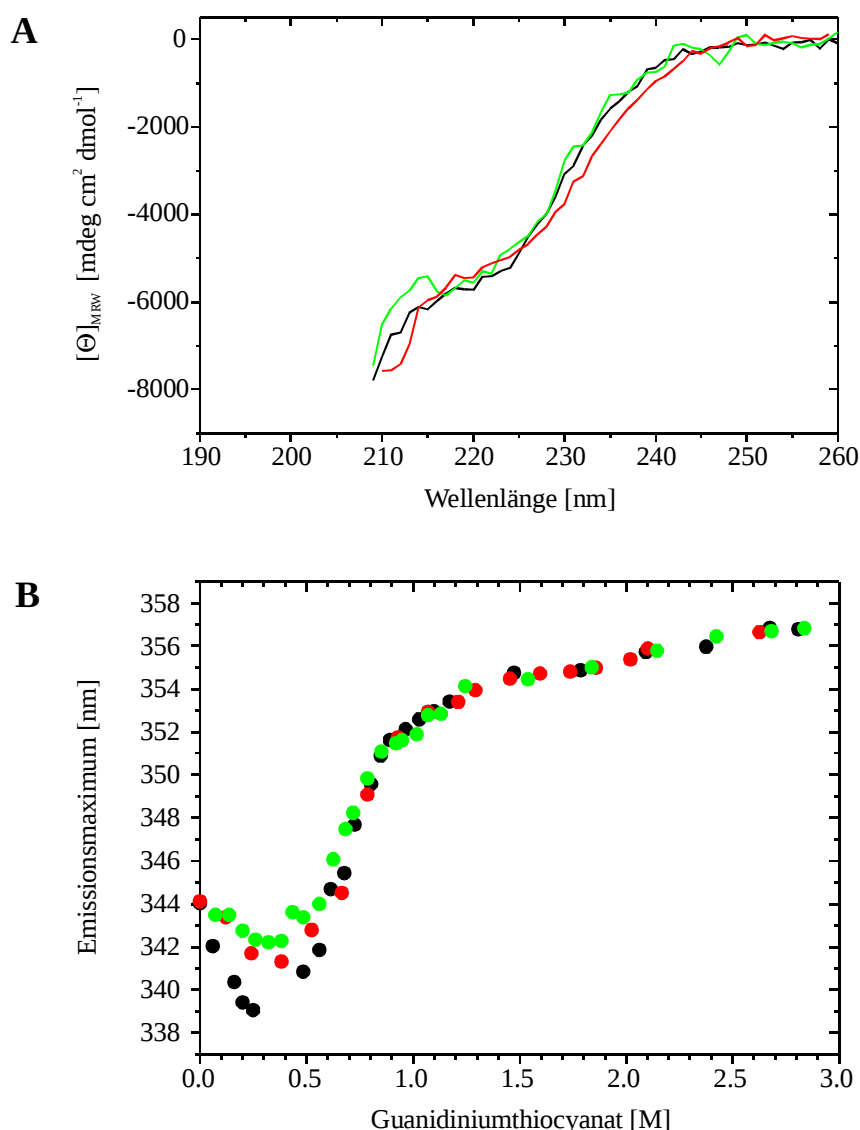


Abb. 3.18 A) Fern-UV-CD-Spektren von PABPN1 (—), PABPN1-(+7)Ala (—) und PABPN1-ΔAla (—). Die Spektren wurden in 50 mM MOPS, 1.5 M KCl, pH 6.5 in 1 mm Küvetten bei 20°C aufgenommen und pufferkorrigiert. Die Proteinkonzentrationen betrugen 9 μM PABPN1, 10 μM PABPN1-(+7)Ala und 8 μM PABPN1-ΔAla. **B) Denaturierungsübergänge von PABPN1 (●), PABPN1-(+7)Ala (●) und PABPN1-ΔAla (●).** Dargestellt sind die Emissionsmaxima in Abhängigkeit von der Guanidiniumthiocyanatkonzentration. Alle Fluoreszenzspektren wurden in einer 1 cm Küvette bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm und einer Proteinkonzentration von 1 μM aufgenommen.

Untersuchungen des Aggregationsverhaltens der Mutanten anhand von Lichtstreuungsmessungen, in Abwesenheit von Denaturierungsmitteln, ergaben wie bei PABPN1 eine Aggregatbildung nach drei bis vier Tagen. Eine Analyse der gebildeten Aggregate auf die Anwesenheit von amyloiden Strukturen wurde mit dem Farbstoff Kongorot durchgeführt. Eine gelblich-grüne Doppelbrechung unter linear polarisiertem Licht, wie sie nach Bindung von Kongorot an solche Strukturen führt, konnte weder bei den Aggregaten des Wildtyp-Proteins noch bei den Mutanten beobachtet werden.

3.4 Untersuchungen zum Einfluss der Alaninexpansion und Alanindeletion auf die N-terminale Domäne von PABPN1

PABPN1 und die Alaninexpansions- bzw. Alanindeletionsmutante neigten *in vitro* stark zur unspezifischen Aggregation. Selbst unter den stabilisierenden Hochsalzbedingungen konnten die Proteine nicht für längere Zeit in Lösung gehalten werden. Um dennoch eine Fibrillenbildung in Abhängigkeit von den Alaninresten am N-Terminus von PABPN1 analysieren zu können, wurden im Folgenden Experimente mit der N-terminalen Domäne von PABPN1 (Reste 1-125) durchgeführt. Dieser experimentelle Ansatz schien gerechtfertigt, da die einzige molekulare Änderung in den OPMD verursachenden Varianten sich auf eine Verlängerung des N-Terminus durch zusätzliche Alaninreste beschränkt. In Analogie zur Alaninexpansionsmutante (PABPN1-(+7)Ala) und Alanindeletionsmutante (PABPN1-ΔAla) wurde N-(+7)Ala bzw. N-ΔAla kloniert, exprimiert und gereinigt.

3.4.1 Expression und Reinigung von N-(+7)Ala und N-ΔAla

Für die Überexpression der N-terminalen Domänen wurden die Expressionsplasmide pET15b/N-(+7)Ala und pET15b/N-ΔAla verwendet. Die Gesamtzellextrakte vor und nach dreistündiger Expression sind in Abb. 3.19 dargestellt. Zur Reinigung der Proteine wurde nach der gleichen Reinigungsvorschrift wie für N-WT verfahren, wobei aus 6 l Kulturmedium Ausbeuten von 3-5 mg für N-(+7)Ala und 6-10 mg für N-ΔAla erreicht wurden. Die Herstellung größerer Proteinmengen erfolgte durch Fermentationen nach dem Fed-Batch Verfahren. Aus einer Fermentation mit 8 l Kulturmedium konnten hierbei 80-90 mg N-WT und 50-60 mg N-(+7)Ala isoliert werden.

N-(+7)Ala und N-ΔAla verhielten sich bezüglich ihrer Löslichkeit, insbesondere bei hohen Konzentration und erhöhter Temperatur, ähnlich wie N-WT. Die Überprüfung der Reinheit der Proteinpräparationen erfolgte mittels SDS-PAGE. Außer einer Bande im erwarteten Molekulargewicht wurden keine weiteren Banden im Gel beobachtet (Abb. 3.19). Die Identifizierung der gereinigten Proteine erfolgte durch die Massenbestimmung mittels ESI und MALDI (Anhang).

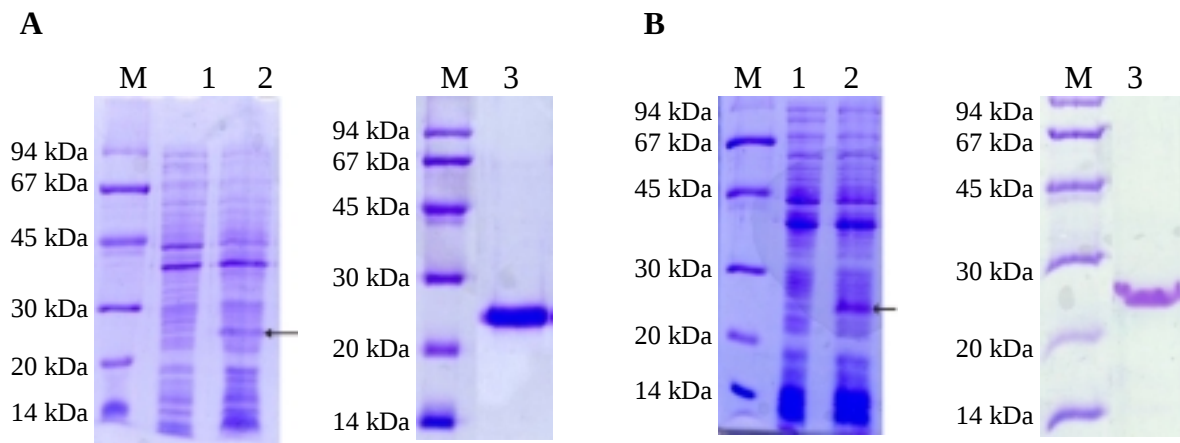


Abb. 3.19 SDS-PAGE zur Kontrolle der Expression und Reinheit von A) N-(+7)Ala und B) N-ΔAla. Bahn 1: Gesamtzellfraktion vor Induktion, Bahn 2: Gesamtzellfraktion nach dreistündiger Induktion, Bahn 3: vereinigte Fraktionen nach Gelfiltration, M = Molekularmassenstandard.

3.4.2 Strukturelle Charakterisierung von N-(+7)Ala und N-ΔAla

Zunächst wurden die CD-Spektren von N-(+7)Ala und N-ΔAla von 190-260 nm aufgenommen und mit dem von N-WT verglichen (Abb. 3.20). Während das Spektrum von N-ΔAla bis auf geringe Unterschiede in der Signalintensität zwischen 210-230 nm und beim Hauptminimum bei 198 nm dem Spektrum von N-WT sehr ähnelte, wies das Spektrum von N-(+7)Ala deutliche Unterschiede auf. Es wurde eine deutliche Zunahme des CD-Signals im Bereich zwischen 210-230 nm und eine Verschiebung des Hauptminimums von 198 nm nach 202 nm beobachtet. Diese Änderungen deuten auf einen erhöhten Anteil an Sekundärstrukturelementen hin. Für eine bessere Interpretation der Signaländerung bei N-(+7)Ala wurde das Differenzspektrum zu N-WT nach Gl. 2.8 berechnet. Dieses besitzt zwei Minima bei ca. 223 und 207 nm und ein Maximum bei 194 nm. Extrema in diesen Bereichen sind charakteristisch für eine dominante α -helikale Struktur. Untersuchungen hinsichtlich der Stabilität ergaben, wie auch bei N-WT beobachtet, weder für N-(+7)Ala noch für N-ΔAla kooperative Übergänge.

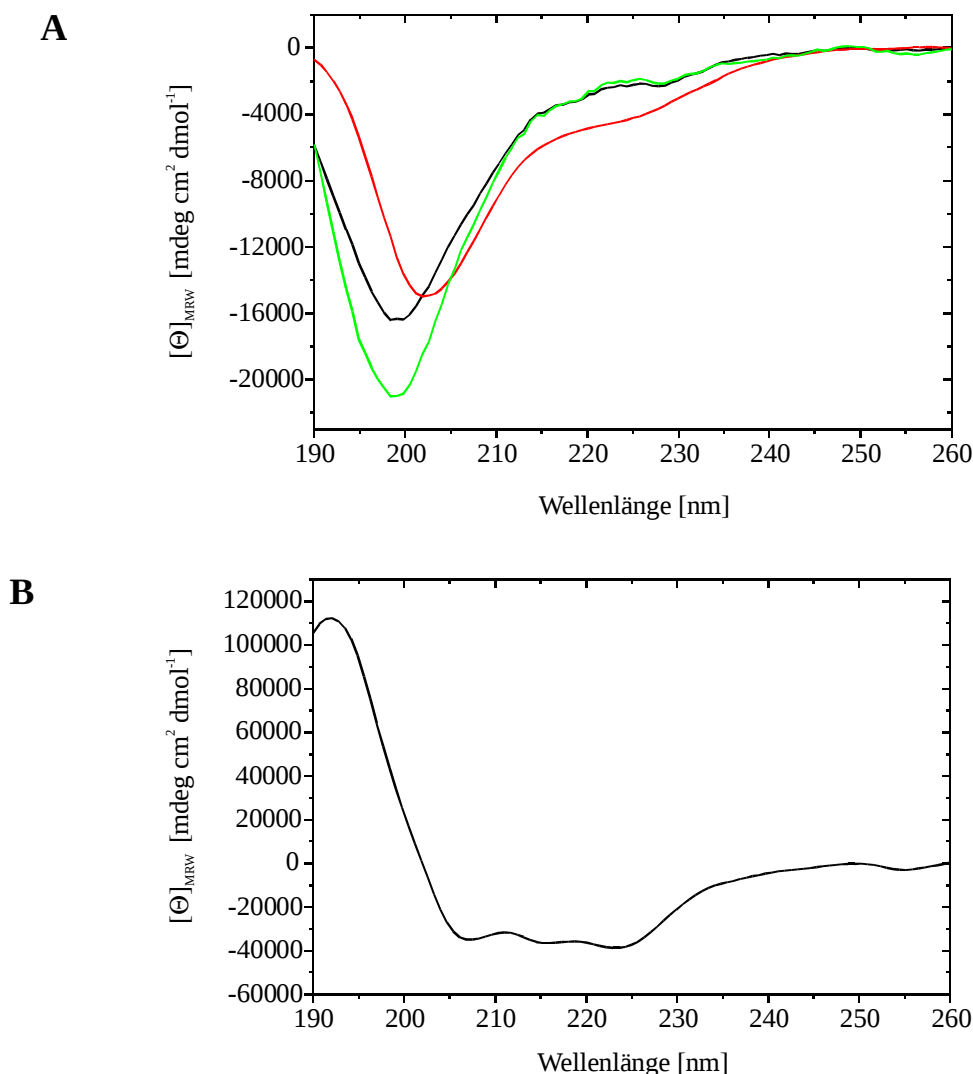


Abb. 3.20 A) Fern-UV-CD-Spektrum von N-WT (—), N-(+7)Ala (—) und N-ΔAla (—). Die Spektren wurden in 5 mM MOPS pH 6.5 in 0.1 mm Küvetten bei 20°C aufgenommen und pufferkorrigiert. Die Proteinkonzentrationen betrugen 77 μ M N-WT, 88 μ M N-(+7)Ala und 75 μ M N-ΔAla. **B) Differenzspektrum von N-(+7)Ala und N-WT.** Die Berechnung des Spektrums erfolgte nach Gl. 2.8 unter Verwendung der Aminosäurezahldifferenz von $\Delta N_A = 7$.

3.4.3 Untersuchung zur Fibrillenbildung der N-terminalen Domänen

Da die N-terminalen Domänen auch bei erhöhter Temperatur eine äußerst gute Löslichkeit aufwiesen, wurden für die ersten Versuche, eine Fibrillenbildung zu induzieren, relativ extreme Bedingungen gewählt. Die N-terminalen Domänen wurden bei einer Proteinkonzentration von 2.2 mM in 5 mM KH_2PO_4 , 150 mM NaCl, 0.1 % (w/v) NaN_3 pH 7.4 bei 60°C inkubiert. Als Kontrolle wurde die RNP-Domäne unter den gleichen Bedingungen mitgeführt. Der Ansatz mit der RNP-Domäne wies schon nach einem Tag eine deutlich erkennbare Trübung auf, wogegen die Ansätze mit den N-terminalen Domänen während des gesamten Experiments klar blieben. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die einzelnen

Ansätze durch Fluoreszenzmessungen mit ThT auf eine Fibrillenbildung getestet. ThT ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher häufig zur Detektion von Fibrillen *in vitro* verwendet wird (Conway *et al.*, 2000; Khurana *et al.*, 2001; Souillac *et al.*, 2002). Bindet der Farbstoff an fibrilläre Strukturen, so erhöht sich bei einer Anregungswellenlänge von 450 nm dessen Fluoreszenzemissionsintensität bei 482 nm (LeVine, III, 1993). Diese Methode ermöglicht eine schnelle Detektion von Fibrillen. Im Vergleich zum Nachweis der Fibrillenbildung mit Kongorot werden hierbei deutlich geringere Proteinmengen benötigt. Für die Messungen wurden den Ansätzen zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen, mit ThT versetzt und die Fluoreszenzspektren von ThT gemessen (Abb. 3.21).

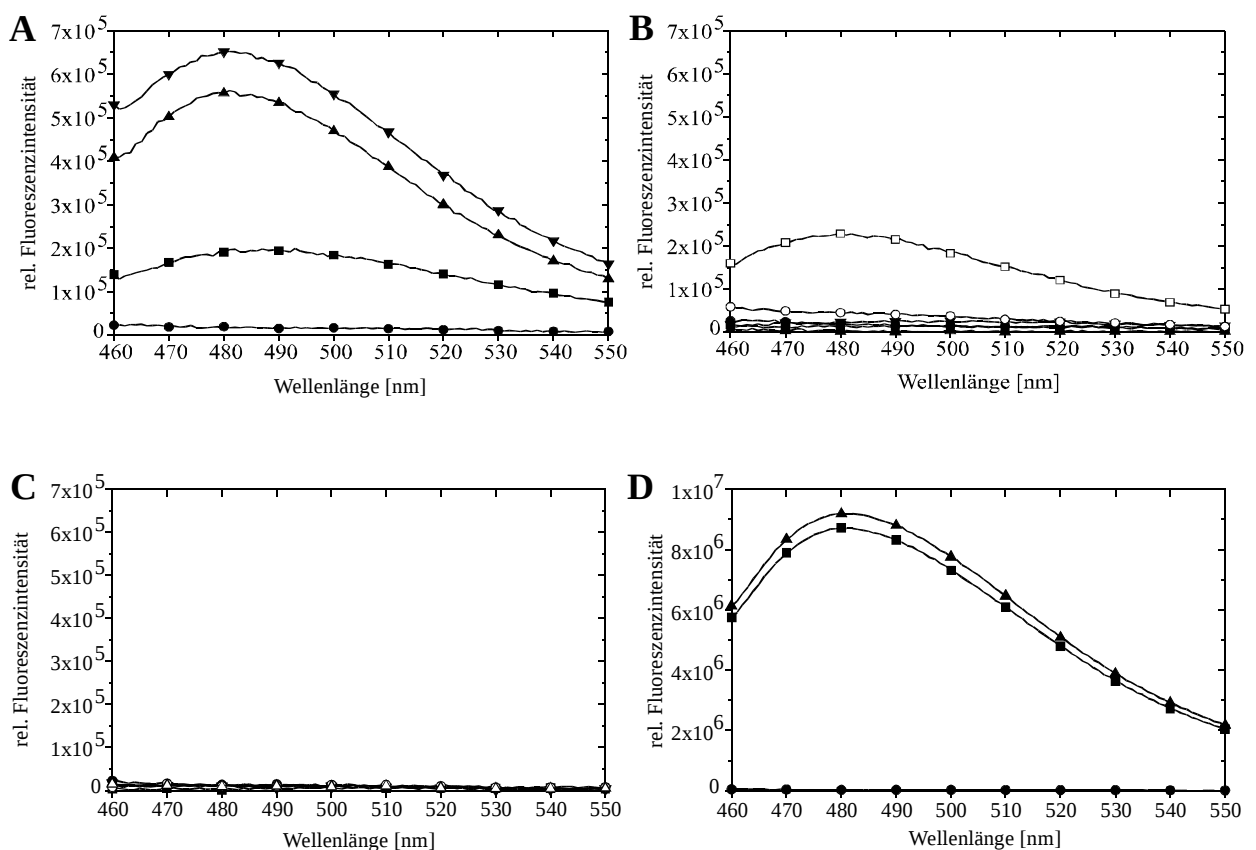


Abb. 3.21 Fluoreszenzemissions-Spektren von ThT nach verschiedenen Inkubationszeiten von A) N-(+7)Ala B) N-WT C) N- Δ Ala D) RNP. Ansätze mit einer Proteinkonzentration von 2.2 mM in 5 mM KH_2PO_4 , 150 mM NaCl, 0.1 % (w/v) NaN_3 pH 7.4 wurden bei 60°C inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten die Bindung von ThT gemessen. Die Fluoreszenzspektren wurden bei einer Proteinkonzentration von 10 μM wie in Kap. 2.2.13 beschrieben aufgenommen und pufferkorrigiert. Die Spektren entsprechen folgenden Inkubationszeiten: $\bullet$ = 0 Tage, $\blacksquare$ = 1 Tag, $\blacktriangle$ = 2 Tage, $\blacktriangledown$ = 3 Tage, $\circ$ = 7 Tage, $\square$ = 11 Tage, Δ = 30 Tage.

Bei N-(+7)Ala wurde schon nach einem Tag eine Zunahme der Fluoreszenzintensität beobachtet, welche innerhalb der folgenden Tage weiter anstieg. Bei N-WT wurde erst nach einer Inkubationszeit von elf Tagen eine erhöhte Fluoreszenz gemessen. Dagegen wurde bei N- Δ Ala selbst nach 30 Tagen kein Anstieg der Fluoreszenz beobachtet. Ein proteolytischer

Abbau von N- Δ Ala wurde durch Analyse mittels SDS-PAGE ausgeschlossen. Auffällig war der sehr starke Anstieg des Fluoreszenzsignals bei der als Kontrolle dienenden RNP-Domäne. Hier wurde schon nach einem Tag eine Signalintensität gemessen, welche über ein Zehnfaches höher lag als bei Messungen mit N-(+7)Ala nach drei Tagen Inkubationszeit.

Zum optischen Nachweis fibrillärer Strukturen wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Hierfür wurde nach einem beobachteten Fluoreszenzanstieg dem Ansatz eine Probe entnommen und wie in Kapitel 2.2.19 beschrieben präpariert. Repräsentative Ausschnitte der elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind in Abb. 3.22 dargestellt.

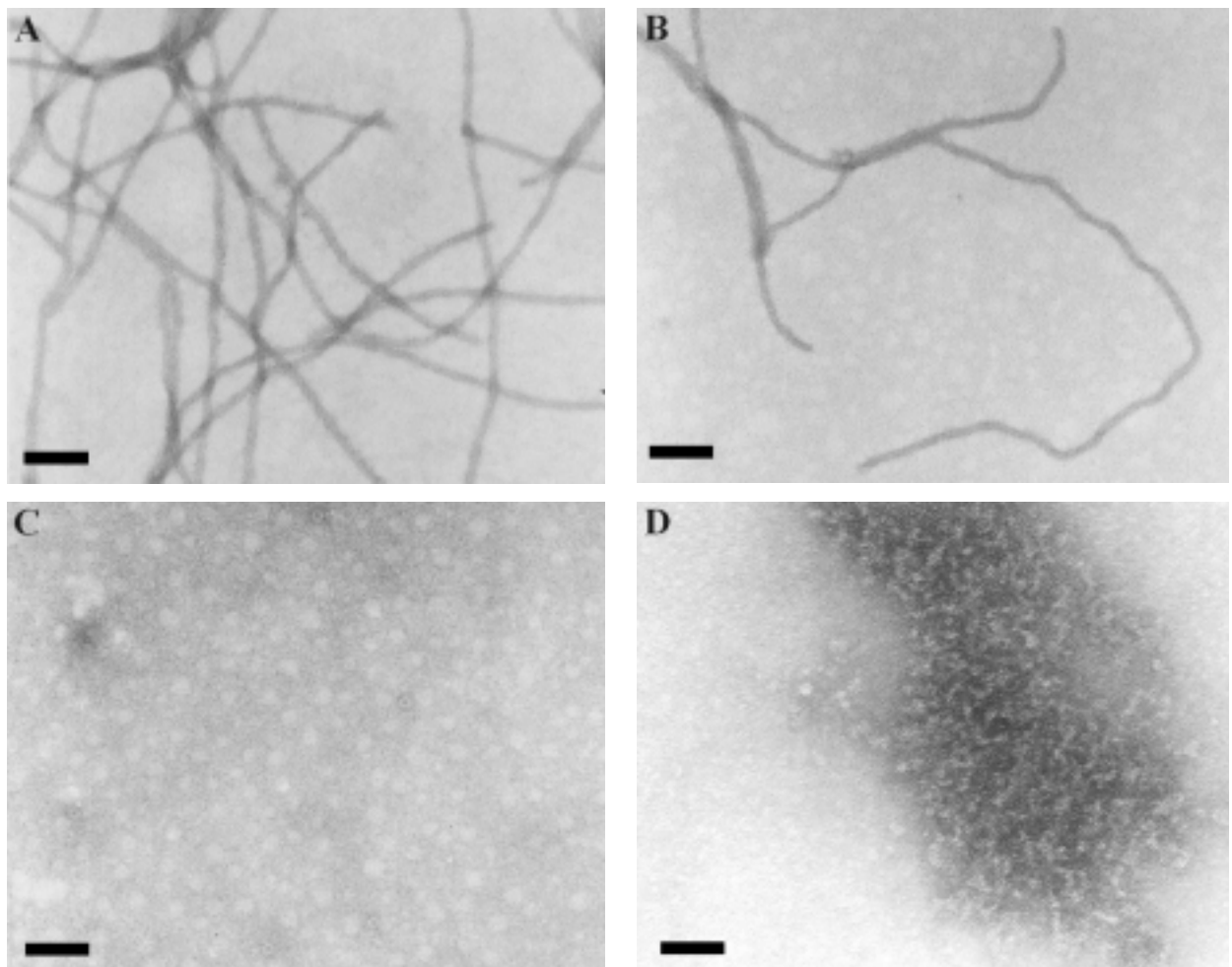


Abb. 3.22 Elektronenmikroskopische Aufnahmen nach Inkubation bei 60°C von A) N-(+7)Ala nach 3 Tagen, B) N-WT nach 11 Tagen, C) N- Δ Ala nach 30 Tagen, D) RNP nach 3 Tagen. Die Aufnahmen erfolgten nach Kontrastierung mit Uranylacetat bei einer 85000-fachen Vergrößerung bei einer Kathodenspannung von 80 kV. Die Proteinkonzentration betrug jeweils 2.2 mM. Der Balken entspricht einer Länge von 90 nm.

Sowohl bei N-(+7)Ala als auch bei N-WT wurden unverzweigte fibrilläre Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 10–14 nm beobachtet. Die Fibrillen sind stark miteinander verwunden und bis zu 1 μ M lang. Bei den elektronenmikroskopischen Aufnahmen der RNP-Domäne konnten nur unspezifische Aggregate, jedoch keine fibrillären Strukturen beobachtet

werden. Die erhöhte ThT-Fluoreszenz in Anwesenheit der RNP-Domäne ist somit auf die Bindung des Farbstoffs an unspezifische Aggregate der RNP-Domäne zurückzuführen. Bei N- Δ Ala konnten selbst nach einer Inkubationszeit von 30 Tagen weder Fibrillen noch unspezifische Aggregate mit dem Elektronenmikroskop beobachtet werden.

Nachdem bei 60°C eine Fibrillenbildung nachgewiesen werden konnte, sollte im Folgenden bei 37°C, einer Temperatur, die physiologischen Bedingungen entspricht, die Fibrillenbildung untersucht werden. Proteinkonzentration und Pufferzusammensetzungen blieben zunächst unverändert. Bis zum Auftreten einer erhöhten ThT-Fluoreszenz waren bei 37°C längere Inkubationszeiten als bei 60°C vonnöten. Mit N-(+7)Ala wurde nach sieben Tagen und bei N-WT erst nach fünf Wochen ein Anstieg der ThT-Fluoreszenz beobachtet.

3.4.4 Einfluss des His-tags auf die Fibrillenbildung von N-(+7)Ala

3.4.4.1 Bromcyanspaltung von N-(+7)Ala

Bei den Experimenten zur Fibrillenbildung enthielten alle verwendeten N-terminalen Domänen der PABPN1-Varianten am N-Terminus einen His-tag, da ohne den tag keine Expression erfolgte. Um auszuschließen, dass die beobachtete Fibrillenbildung durch diesen His-tag hervorgerufen wird, wurde die Fibrillenbildung von N-(+7)Ala mit abgespaltenem His-tag untersucht. Die im Expressionskonstrukt enthaltene Thrombinspaltstelle zwischen His-tag und N-Terminus konnte nicht genutzt werden, da innerhalb der N-terminalen Domäne eine Spaltstelle für Thrombin existiert. Deshalb wurde eine chemische Spaltung mit Bromcyan durchgeführt. Bromcyan spaltet Peptidbindungen C-terminal von Methionin. Da die N-terminale Domäne außer dem Startmethionin keine weiteren Methionine besitzt, stellte die Bromcyanspaltung eine geeignete Methode dar, den His-tag abzuspalten. Nach der Bromcyan-Spaltung wurde der Reaktionsansatz über eine Ni-NTA-Säule gereinigt. Das gewünschte Produkt wurde im Durchlauf erhalten. Wie erwartet, besaß die N-terminale Domäne nach Abspaltung des His-tags eine etwas höhere elektrophoretische Mobilität in der SDS-PAGE (Abb. 3.23). Die Masse des Spaltproduktes wurde mittels Massenspektrometrie mit 12524.3 Da bestimmt, was in guter Übereinstimmung mit der berechneten Masse von 12523.5 Da steht.

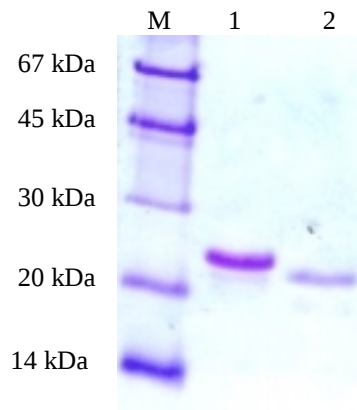
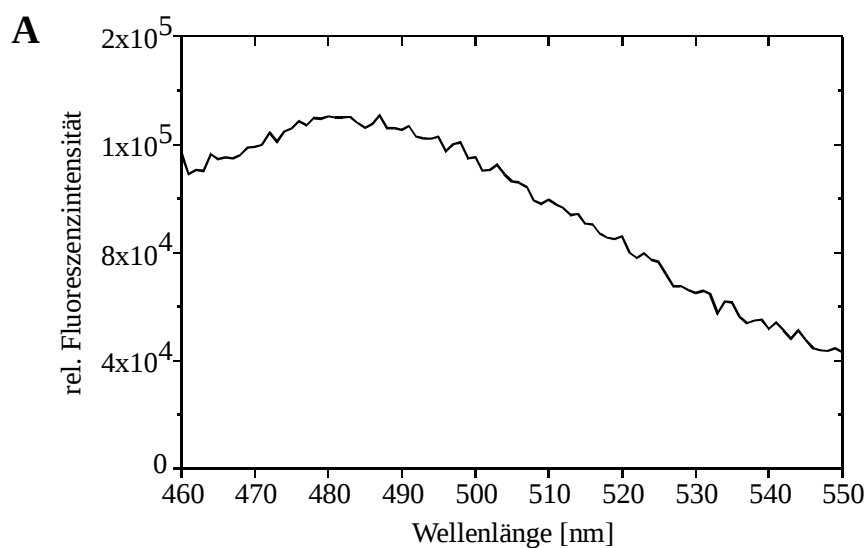


Abb. 3.23 SDS-PAGE von N-(+7)Ala vor und nach der Bromcyanspaltung. Bahn 1: N-(+7)Ala vor der Bromcyanspaltung, Bahn 2: N-(+7)Ala nach der Bromcyanspaltung, M = Molekularmassenstandard

3.4.4.2 Fibrillenbildung von N-(+7)Ala ohne His-tag

Für die Untersuchung der Fibrillenbildung wurde N-(+7)Ala mit abgespaltenem His-tag bei einer Proteinkonzentration von 1.5 mM in 5 mM KH_2PO_4 , 150 mM NaCl, 0.1 % (w/v) NaN_3 pH 7.4 für zwei Wochen bei 37°C inkubiert und anschließend die Bindung von ThT gemessen (Abb. 3.24 A). Wie bei N-(+7)Ala besitzt das Fluoreszenzspektrum nach der Fibrillenbildung eine erhöhte Fluoreszenz im Bereich von 480 nm. Außerdem konnte anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen gezeigt werden, dass sich Fibrillen von N-(+7)Ala ohne His-tag morphologisch nicht von den bisher beobachteten Fibrillen von N-(+7)Ala unterschieden (Abb. 3.24 B). Eine Beeinflussung der Fibrillenbildung der N-terminalen Domänen durch den His-tag konnte somit ausgeschlossen werden. Für die weiteren Experimente wurde deshalb auf eine Abspaltung des His-tags verzichtet.



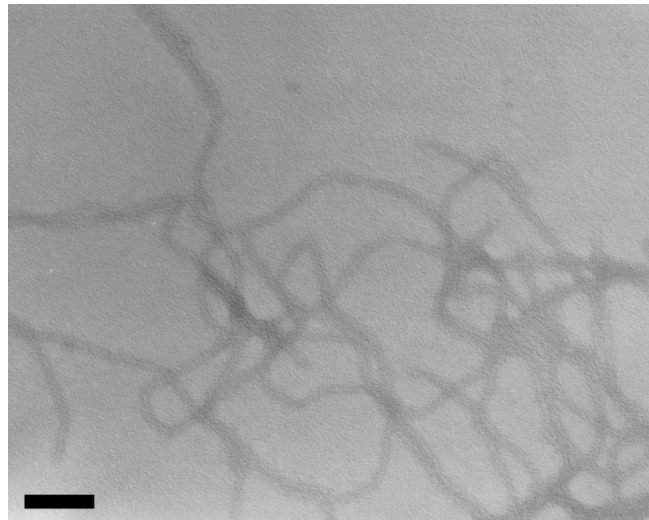
B

Abb. 3.24 Nachweis der Fibrillenbildung von N-(+7) nach Abspaltung des His-tags. N-(+7)Ala wurde bei einer Proteinkonzentration von 1.5 mM in 5 mM KH_2PO_4 , 150 mM NaCl, 0.1 % (w/v) NaN_3 pH 7.4 zwei Wochen bei 37°C inkubiert. **A) ThT-Fluoreszenz.** Für den Nachweis von Fibrillen wurde die Fluoreszenzmessung wie in Kap. 2.2.13 beschrieben bei einer Proteinkonzentration von 10 μM durchgeführt. **B) Elektronenmikroskopische Aufnahme.** Die Aufnahme erfolgte nach Kontrastierung mit Uranylacetat bei einer 85000-fachen Vergrößerung und einer Kathodenspannung von 80 kV. Der Balken entspricht einer Länge von 90 nm.

3.4.5 Charakterisierung der Fibrillen der N-terminalen Domäne

3.4.5.1 Bindung von Kongorot an Fibrillen der N-terminalen Domäne N-(+7)Ala

Eine klassische Methode zum Nachweis bzw. zur Detektion von amyloiden Strukturen ist die Bindung von Kongorot. Schon 1922 zeigte Benhold die Bindung von Kongorot an Aggregate in Gewebeschnitten und beobachtete eine charakteristische gelb-grüne Doppelbrechung unter linear polarisiertem Licht (Benhold, 1922). Bis heute dient diese Methode als diagnostischer Nachweis von amyloiden Strukturen.

Für den Nachweis einer amyloiden Struktur bei fibrilliertem N-(+7)Ala wurde eine 2 mM Proteinlösung in 5 mM KH_2PO_4 , 150 mM NaCl, 0.1 % (w/v) NaN_3 pH 7.4 acht Wochen bei 37°C inkubiert und anschließend die Bindung von Kongorot nach der Methode von Schlumpberger *et al.* getestet (Schlumpberger *et al.*, 2000). Um eine gute Bindung von Kongorot an die Fibrillen zu erreichen, wurde die Inkubationszeit von 1.5 h auf 16 h ausgedehnt. Die mit Kongorot angefärbte Probe wurde unter einem Umkehrmikroskop sowohl im Hellfeldmodus als auch unter linear polarisiertem Licht untersucht (Abb. 3.25). Die mit Kongorot angefärbten Bereiche der Probe besitzen unter linear polarisiertem Licht die charakteristische gelb-grüne Doppelbrechung. Somit ist davon auszugehen, dass die Fibrillen von N-(+7)Ala eine typisch amyloide Struktur besitzen.

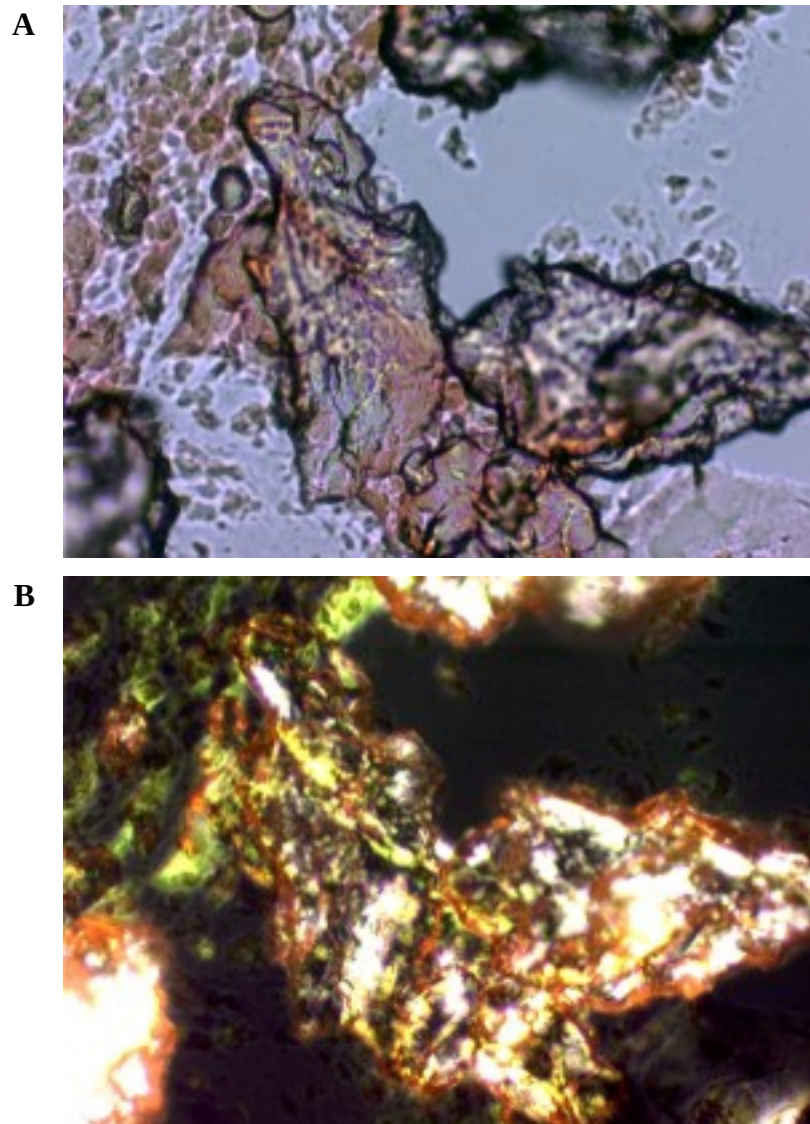


Abb. 3.25 Aufnahmen von fibrilliertem N-(+7)Ala nach Anfärbung mit Kongorot (400fache Vergrößerung)
A) im Hellfeldmodus und B) unter linear polarisiertem Licht. N-(+7)Ala wurde bei einer Proteinkonzentration von 2 mM in 5 mM KH_2PO_4 , 150 mM NaCl, 0.1 % (w/v) NaN_3 pH 7.4 acht Wochen bei 37°C inkubiert und wie in Kap. 2.2.21 beschrieben mit Kongorot angefärbt. Die Aufnahme im Hellfeld erfolgte mit einem NCB11 Filter bei einer Belichtungszeit von 1/500 s. Die Belichtungszeit mit linear polarisiertem Licht betrug 1/8 s.

3.4.5.2 Untersuchung der Fibrillen von N-(+7)Ala und N-WT mittels FT-IR-Spektroskopie

Neben der CD-Spektroskopie stellt die FT-IR-Spektroskopie eine weitere Methode zur Bestimmung von Sekundärstrukturelementen in Proteinen dar (Byler & Susi, 1986). Bei der FT-IR-Spektroskopie werden im Wellenzahlenbereich von $1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ die Schwingungen der Amid I-Bande gemessen. Anhand der Absorption der Amid I-Bande, die im Wesentlichen die Carbonyl-Streckschwingung der Peptidbindung repräsentiert, können Sekundärstruktur-

elemente bestimmt werden. Die starke Absorption von H_2O in diesem Wellenzahlenbereich machte es erforderlich, die Messungen in D_2O durchzuführen.

Lösungen von N-(+7)Ala bzw. N-WT wurden zunächst gegen Wasser dialysiert und anschließend lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in D_2O aufgenommen, die Proteinkonzentration auf 2 mM eingestellt und ein FT-IR-Spektrum aufgenommen. Nach einer Inkubationszeit von vier bzw. sechs Wochen bei 37°C , in der sich die Fibrillen bildeten, wurden die Ansätze von N-(+7)Ala bzw. N-WT erneut vermessen. Die FT-IR-Spektren vor und nach Inkubation sind in Abb. 3.26 dargestellt.

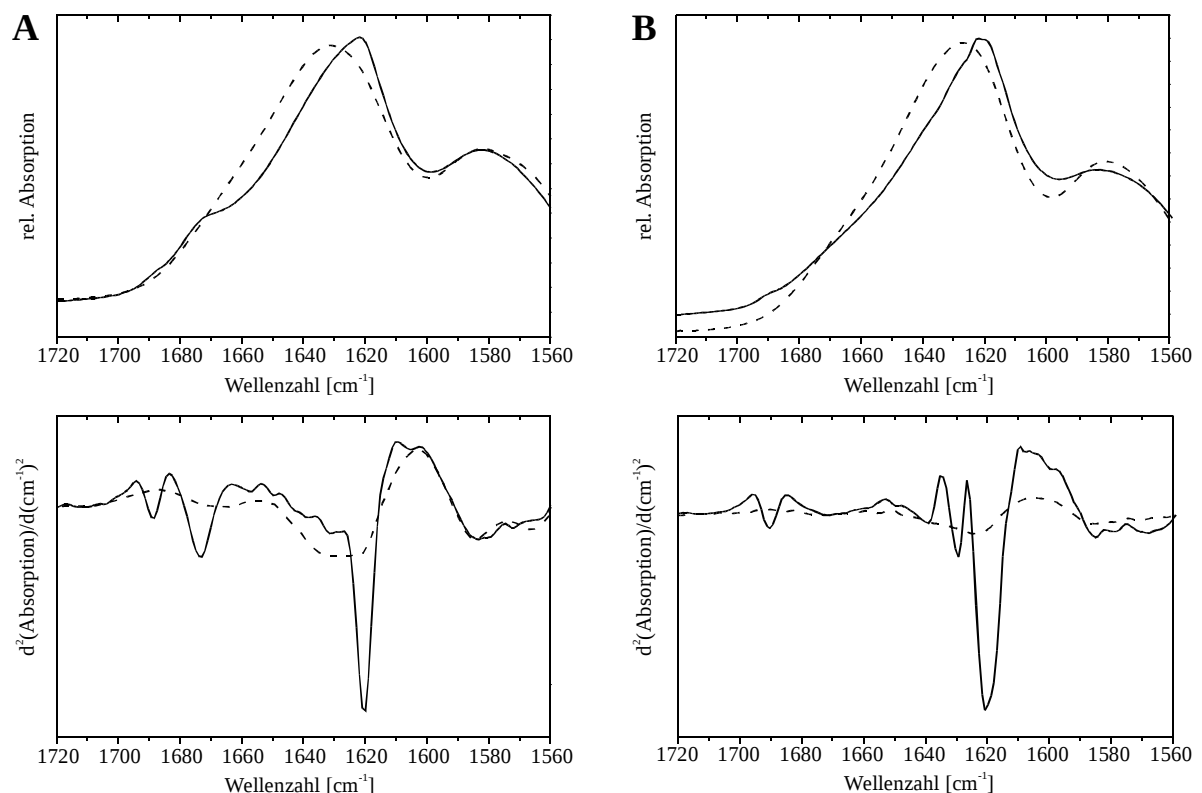


Abb. 3.26 FT-IR-Spektren und deren zweite Ableitung von löslichem und fibrilliertem A) N-(+7)Ala und B) N-WT. Nach Dialyse gegen Wasser wurden die N-terminalen Domänen lyophilisiert und in D_2O aufgenommen. Die Proben wurden auf eine Proteinkonzentration von 2 mM eingestellt und FT-IR-Spektren vor (---) und nach einer Inkubation von vier bzw. sechs Wochen (—) aufgenommen.

Um kleinere Banden bzw. Schultern im Spektrum deutlicher erkennbar zu machen, wurde zusätzlich jeweils die zweite Ableitung der Spektren berechnet. Das Spektrum von N-(+7)Ala vor Beginn der Fibrillenbildung bei 37°C besitzt eine breite Bande bei 1632 cm^{-1} . Bei N-WT ist diese um 2 cm^{-1} zu kürzeren Wellenzahlen verschoben. Diese Banden entsprechen einer Überlagerung von unstrukturiertem und teilweise α -helikalen Bereichen, sowie den Schwingungsbanden von Prolinresten, die mit 13.8 % bzw. 13.2 % in der N-terminalen Domäne einen relativ hohen Anteil ausmachen (Goormaghtigh *et al.*, 1994). Die Bande bei

1580 cm^{-1} kann den Schwingungen der Carboxylgruppen der sauren Aminosäurereste zugeordnet werden. Nach Inkubation bei 37°C zeigen die FT-IR-Spektren der N-terminalen Domänen eine deutliche Veränderung der Absorption der Amid I-Bande. Die Bande bei 1632 cm^{-1} ist nach 1620 cm^{-1} verschoben, wobei zusätzlich eine Verringerung der Bandenbreite auftritt. Weiterhin wurden zwei Schultern bei 1674 cm^{-1} und 1689 cm^{-1} beobachtet. Absorptionen zwischen 1690-1680 cm^{-1} und 1613-1625 cm^{-1} lassen auf eine antiparallele β -Struktur schließen (Krimm & Bandekar, 1986). Die Bande bei 1674 cm^{-1} weist auf einen β -turn hin, welcher durch ein intramolekulares, antiparalleles β -Faltblatt erklärt werden kann. Auch bei N-WT wurden die charakteristischen Banden einer antiparallelen β -Struktur bei 1621 cm^{-1} und 1690 cm^{-1} beobachtet. Die zusätzliche Schulter bei 1630 cm^{-1} ist sehr wahrscheinlich auf Reste von löslichem Protein in der Probe zurückzuführen. Eine Bande für einen β -turn konnte bei N-WT nicht eindeutig identifiziert werden. Somit konnte sowohl bei Fibrillen von N-(+7)Ala als auch bei Fibrillen von N-WT eine für amyloide Proteine typische β -Struktur nachgewiesen werden.

3.4.5.3 Ermittlung der Sekundärstrukturanteile mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie

Die in der FT-IR-Spektroskopie ermittelten Strukturelemente wurden auch in einem Fern-UV-CD-Spektrum von fibrilliertem N-(+7)Ala beobachtet (Abb. 3.27).

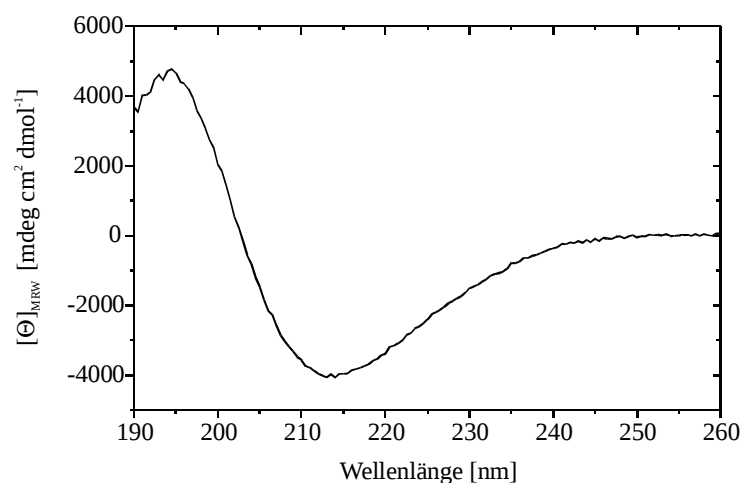


Abb. 3.27 Fern-UV-CD-Spektrum von Fibrillen aus N-(+7)Ala. 1.5 mM N-(+7)Ala wurden in 5 mM KH_2PO_4 , 150 mM NaCl, 0.1 % (w/v) NaN_3 pH 7.4 für 6 Wochen bei 37°C inkubiert und das CD-Spektrum nach 1:10 Verdünnung mit 5 mM KH_2PO_4 , 150 mM NaCl, pH 7.4 in einer 0.102 mm Küvette aufgenommen. Das Spektrum wurde mit 5 mM KH_2PO_4 , 150 mM NaCl, 0.01 % (w/v) NaN_3 pH 7.4 pufferkorrigiert.

Die Fibrillen wurden aus einem Ansatz mit 1.5 mM N-(+7)Ala in 5 mM KH_2PO_4 , 150 mM NaCl, 0.1 % (w/v) NaN_3 pH 7.4 nach einer Inkubation von sechs Wochen bei 37°C erhalten. Der Ansatz wurde 1:10 mit 5 mM KH_2PO_4 , 150 mM NaCl pH 7.4 verdünnt und anschließend ein CD-Spektrum im Wellenlängenbereich von 195-260 nm aufgenommen. Das Spektrum besitzt ein Minimum bei 216 nm und ein Maximum bei 197 nm, typische Merkmale eines Proteins mit hohem Anteil an β -Struktur.

3.4.5.4 Röntgenbeugung von Filamenten aus N-(+7)Ala

Für eine Untersuchung der Fibrillen von N-(+7)Ala durch Röntgenbeugung wurden diese mehrmals mit Wasser gewaschen, in das Ende einer Kapillare überführt, an der Luft getrocknet und röntgenographisch vermessen (Abb. 3.28).

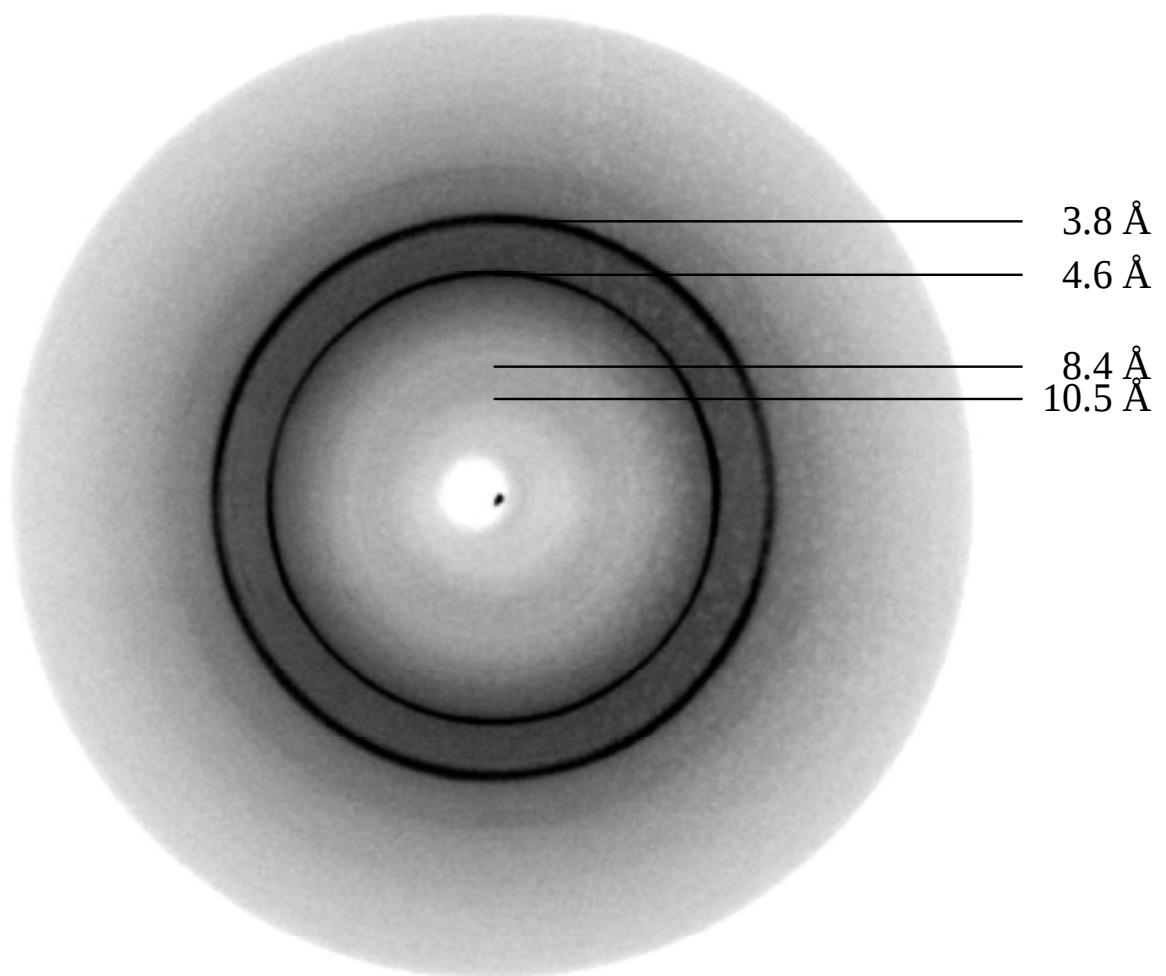


Abb. 3.28 Röntgenbeugungsmuster von Fibrillen aus N-(+7)Ala. Für die Röntgenbeugungsmessungen wurden Fibrillen von N-(+7)Ala mit Wasser gewaschen, in eine Kapillare überführt, an Luft getrocknet und anschließend an einer Imageplate röntgenographisch vermessen. Die Aufnahme des Beugungsmusters wurde freundlicherweise von Michael Claus (Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg) durchgeführt.

Bei Röntgenbeugungsexperimenten mit amyloiden Filamenten entdeckten Bonar und Eanes Reflexe im Bereich von 4.6-4.8 Å und bei ca. 10 Å, die mit einer periodischen Anordnung von Strukturelementen innerhalb der Fibrillen erklärt wurden (Bonar *et al.*, 1967; Eanes & Glenner, 1968). Die Reflexe entsprechen einer β -cross Struktur, bei der die Polypeptidketten ein intermolekulares β -Faltblatt ausbilden, welches parallel zur Fibrillenachse verläuft. Die einzelnen β -Stränge sind dabei senkrecht zur Achse orientiert (vgl. Abb. 1.4) (Pauling & Corey, 1951). Diese charakteristische Struktur wurde bisher bei allen Filamenten aus amyloiden Proteinen beobachtet.

Für Fibrillen aus N-(+7)Ala wurden zwei intensive Reflexe bei 4.6 und 3.8 Å und ein Bereich mit leicht erhöhter Intensität bei 8.4-10.5 Å detektiert. Der Reflex bei 4.6 Å, welcher bei allen bisher untersuchten amyloiden Fibrillen beobachtet wurde, wird durch den Abstand der β -Stränge des Faltblatts bestimmt. Der Reflex bei 3.8 Å konnte bisher nicht direkt einer bestimmten Struktur zugeordnet werden, jedoch wurden Reflexe im Bereich von 3.3 – 3.9 Å auch bei Fibrillen von Transthyretin-, Lysozym-, Apolipoprotein-Mutanten und einem Peptid des *Islet Amyloid Polypeptids* (IAPP) beobachtet (Sunde *et al.*, 1997). Die Autoren interpretierten diese Reflexe durch die Unterschiede in Anzahl, Anordnung bzw. Durchmesser der Protofilamente in den Fibrillen. Weitere Reflexe im Bereich zwischen 8.8 – 12.6 Å mit einer deutlich geringeren Intensität werden den Abständen der β -Faltblätter in den amyloiden Fibrillen zugeordnet.

3.4.5.5 Resistenz der Fibrillen gegenüber chemischen Reagenzien und Proteinase K

Die Stabilität der Fibrillen wurde sowohl mit chemischen Substanzen wie Guanidiniumhydrochlorid und SDS als auch mit dem Enzym Proteinase K getestet. Weder in 6 M Guanidiniumhydrochlorid bei pH 2 noch in 2 % SDS konnten die Fibrillen nach dreitägiger Inkubation bei 60°C aufgelöst werden. Auch nach einer dreitägigen Behandlung mit Proteinase K wurden noch Fibrillen unter dem Elektronenmikroskop beobachtet (Abb. 3.29). Die Fibrillen der N-terminalen Domäne weisen also eine sehr hohe Stabilität gegenüber chemischen Reagenzien und starken Proteasen wie Proteinase K auf.

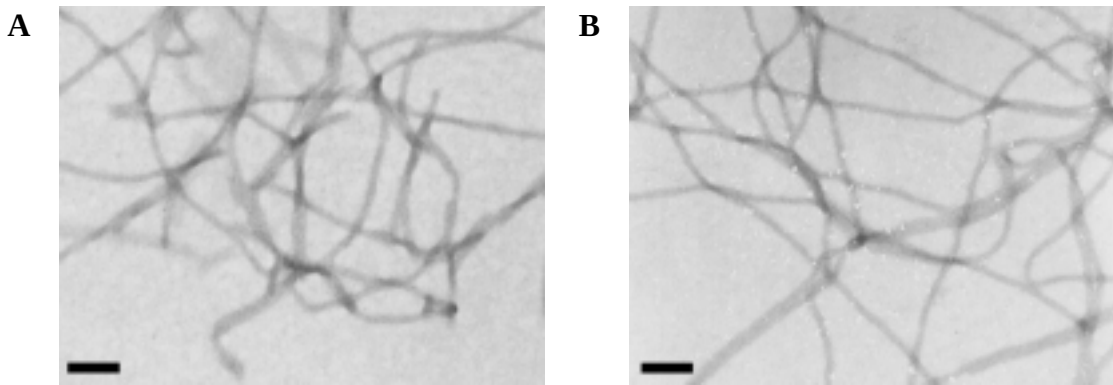


Abb. 3.29 Elektronenmikroskopische Aufnahme von Fibrillen A) vor, B) nach Behandlung mit 1 mg/ml Proteinase K. Fibrillen von N-(+7)Ala wurden mit 1 mg/ml Proteinase K in 5 mM KH_2PO_4 , 150 mM NaCl pH 7.4 versetzt und drei Tage bei 20°C inkubiert. Es wurde sowohl vor, als auch nach der Behandlung eine elektronenmikroskopische Aufnahme bei einer 85000-fachen Vergrößerung und einer Kathodenspannung von 80 kV angefertigt. Der Balken entspricht einer Länge von 90 nm.

3.4.6 Kinetische Untersuchungen zur Fibrillenbildung

3.4.6.1 Nachweis von Fibrillen der N-terminalen Domäne mit ANS

Um ein ausreichendes Fluoreszenzsignal zum Nachweis der Fibrillen der N-terminalen Domäne mit ThT zu erhalten, waren Proteinkonzentrationen von ca. 10 μM notwendig. Für eine kinetische Analyse der Fibrillenbildung wurde deshalb nach einer empfindlicheren Methode gesucht. Als günstig erwies sich hierbei der Fluoreszenzfarbstoff ANS. Dieser wird gewöhnlich zur Untersuchung des *molten globule state* bei der Proteinfaltung verwendet. Bindet ANS an hydrophobe Oberflächenabschnitte von Proteinmolekülen, so verschiebt sich das Fluoreszenzmaximum zu niedrigeren Wellenlängen unter gleichzeitiger Zunahme der Fluoreszenzintensität (Engelhard & Evans, 1995; Semisotnov *et al.*, 1991).

Unter der Annahme, dass auch in Fibrillen hydrophobe Bereiche für ANS zugänglich sind, wurde die Bindung von ANS an N-(+7)Ala untersucht. Vor und nach der Fibrillenbildung nach sechs Wochen bei 37°C wurden ANS-Fluoreszenzspektren zwischen 400-600 nm verglichen (Abb. 3.30 A). Das Spektrum mit N-(+7)Ala vor der Fibrillenbildung besitzt ein Emissionsmaximum bei 520 nm. Bei Messungen mit fibrilliertem N-(+7)Ala ist das Emissionsmaximums nach 480 nm verschoben. Außerdem wurde ein starker Anstieg der Fluoreszenzintensität beobachtet. Die Anwesenheit von Fibrillen wurde durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt.

Zum Vergleich der Nachweisempfindlichkeit wurden parallel Fibrillen mit ThT vermessen (Abb. 3.30 B). Bei Verwendung von ANS wurde nach der Fibrillenbildung eine fast zehnfach höhere Fluoreszenzintensität des Emissionsmaximums beobachtet als mit ThT.

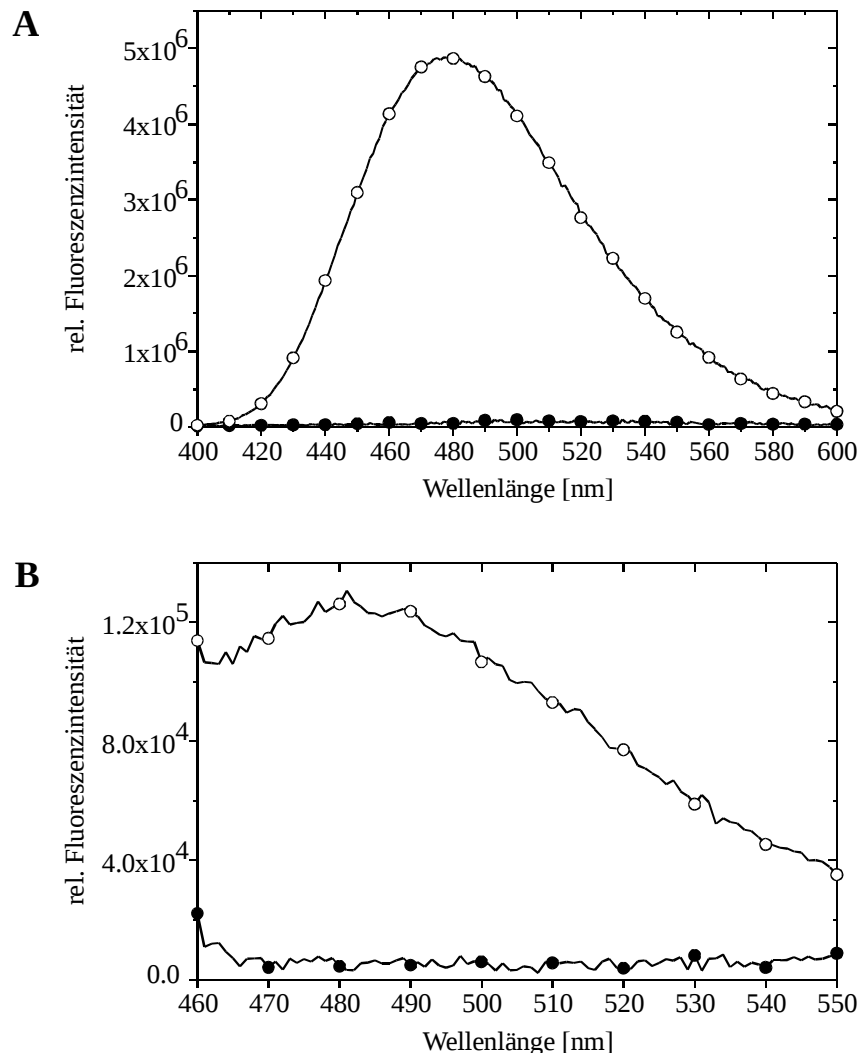


Abb. 3.30 Fluoreszenzspektren von A) ANS und B) ThT mit löslichem und fibrilliertem N-(+7)Ala. Ein Ansatz mit 2.2 mM N-(+7)Ala in 5 mM KH_2PO_4 , 150 mM NaCl, 0.1 % (w/v) NaN_3 pH 7.4 wurde zu Beginn (●) und nach Inkubation von sechs Wochen bei 37°C (○) auf die Bindung von ThT und ANS getestet. Die Fluoreszenzspektren wurden wie in Kap. 2.2.13 beschrieben bei einer Proteinkonzentration von 5 μM aufgenommen und pufferkorrigiert.

In einem weiteren Experiment wurde die ANS-Fluoreszenz in Abhängigkeit von der zugegeben Menge an Fibrillen untersucht (Abb. 3.31). Es wurde eine lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität über einen Konzentrations-Bereich von 0-35 μM festgestellt.

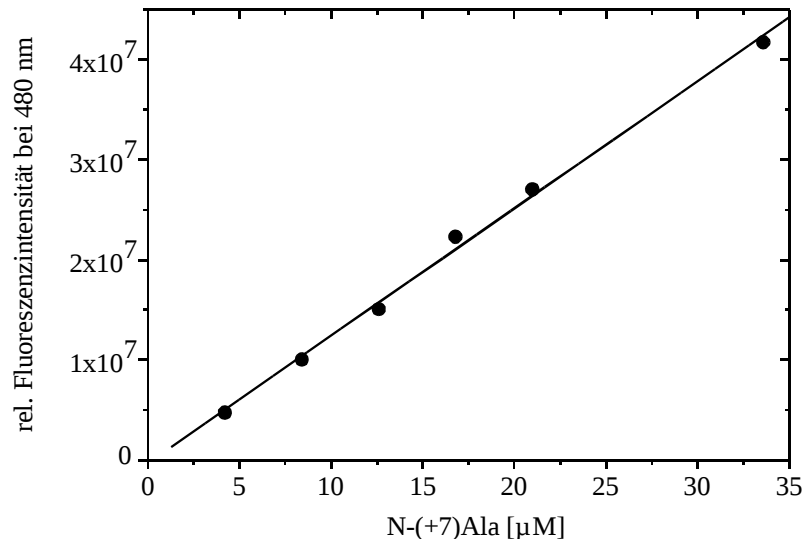


Abb. 3.31 ANS-Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Konzentration an fibrilliertem N-(+7)Ala Ein Ansatz mit N-(+7)Ala wurde bei einer Proteinkonzentration von 2.2 mM in 5 mM KH_2PO_4 , 150 mM NaCl, 0.1 % (w/v) NaN_3 pH 7.4 sechs Wochen bei 37°C inkubiert und anschließend unterschiedliche Proteinkonzentrationen auf die Bindung von ANS untersucht. Die Fluoreszenzspektren wurden wie in Kap. 2.2.13 beschrieben aufgenommen und die pufferkorrigierten Werte bei 480 nm gegen die eingesetzte Proteinkonzentration aufgetragen.

3.4.6.2 Konzentrationsabhängigkeit der Fibrillenbildung

Um einen Einfluss der Proteinkonzentration auf die Kinetik der Fibrillenbildung zu untersuchen, wurden unterschiedliche Proteinkonzentrationen von N-(+7)Ala und N-WT bei 37°C inkubiert. Die Fibrillenbildung wurde durch Bindung von ANS anhand Fluoreszenzspektroskopie verfolgt und durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt. Abb. 3.32 zeigt die Kinetik der Fibrillenbildung von N-(+7)Ala und N-WT bei verschiedenen Proteinkonzentrationen. Wie schon in Kap. 3.4.3 beobachtet, erfolgte eine Fibrillenbildung erst nach längerer Inkubation. Der Zeitraum, in dem noch keine Fibrillen nachweisbar waren, wird hier als *lagphase* bezeichnet. N-(+7)Ala weist im Vergleich zu N-WT eine deutlich kürzere *lagphase* auf. Bei einer Proteinkonzentration von jeweils 1.1 mM wurde eine Fibrillenbildung bei N-(+7)Ala schon nach acht Tagen, bei N-WT hingegen erst nach ca. 35 Tagen beobachtet. Sowohl bei N-(+7)Ala als auch bei N-WT führte eine Verringerung der Proteinkonzentration zu einer Verlängerung der *lagphase*.

Die Kinetiken der Fibrillenbildung konnte durch einen sigmoiden Kurvenverlauf beschrieben werden, wie er häufig bei der Fibrillenbildung *in vitro* beobachtet wird (Kim *et al.*, 2002; Nielsen *et al.*, 2001; Souillac *et al.*, 2002).

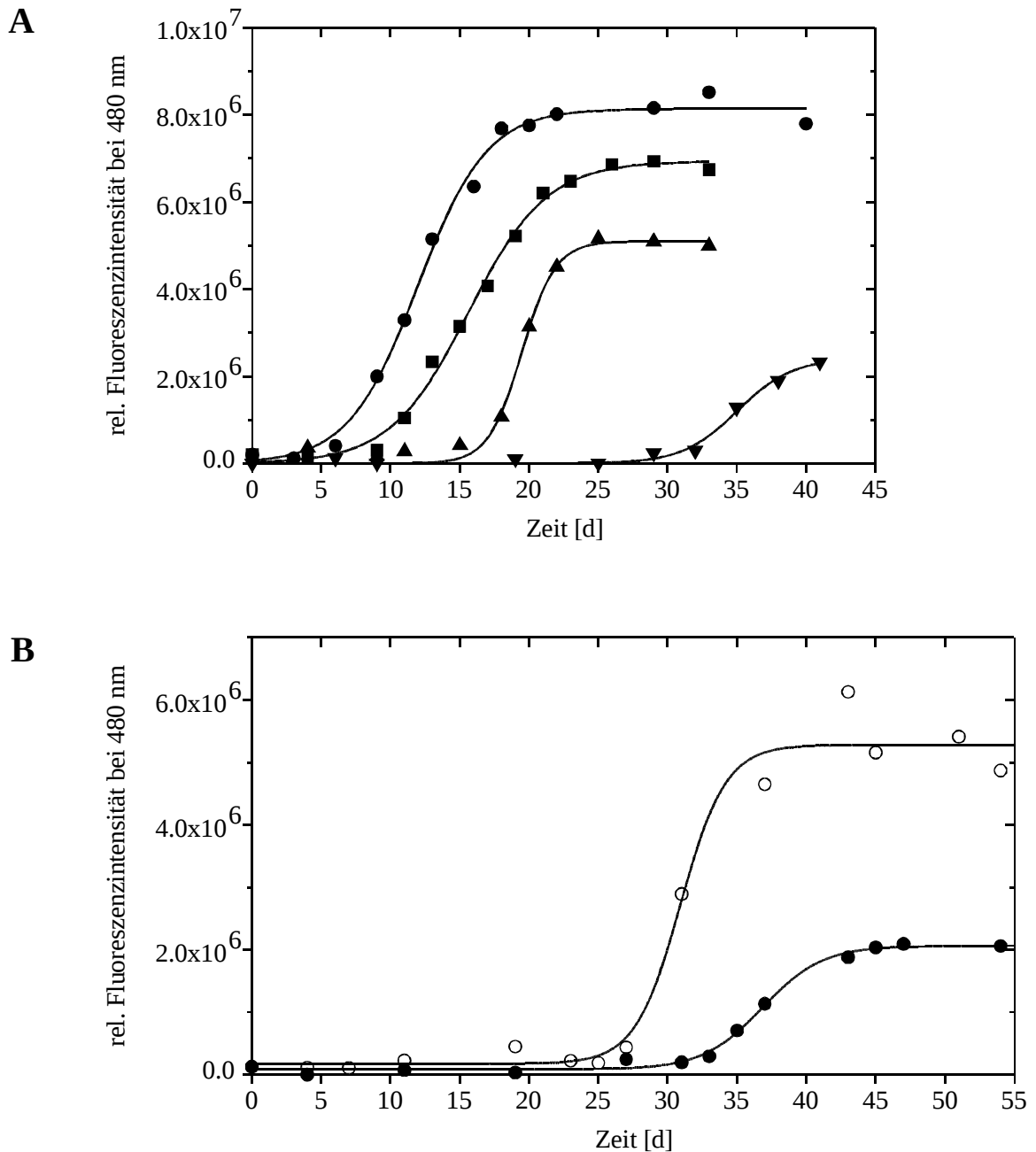


Abb. 3.32 A) Kinetik der Fibrillenbildung von A) N-(+7)Ala und B) N-WT. Unterschiedliche Konzentrationen der Proteine wurden in 5 mM KH_2PO_4 , 150 mM NaCl, 0.1 % (w/v) NaN_3 pH 7.4 bei 37°C inkubiert und eine Fibrillenbildung durch ANS-Fluoreszenz bei 480 nm detektiert. Die Proteinkonzentrationen betrugen: $\circ$ = 2.2 mM, $\bullet$ = 1.1 mM, $\blacksquare$ = 0.55 mM, $\blacktriangle$ = 0.275 mM und $\blacktriangledown$ = 0.11 mM. Die Fluoreszenzmessungen erfolgten in 1 cm Küvetten mit den Einstellungen wie in Kap. 2.2.13 beschrieben bei einer Proteinkonzentration von 5 μM . Die Linien entsprechen einer sigmoiden Kurvenanpassung mit dem Programm Microcal Origin.

3.4.7 Induktion der Fibrillierung durch die Zugabe von *seeds*

Als Modell für die Fibrillenbildung des A β -Peptids wurde von Harper und Lansbury ein nukleationsabhängiges Ereignis vorgeschlagen, wobei innerhalb der *lagphase* zunächst ein Nukleationskeim gebildet werden muss (Harper & Lansbury, Jr., 1997). Durch die Zugabe von

geeigneten *seeds* sollte sich die *lagphase* verkürzen lassen (Jarrett *et al.*, 1993). Eine derartige Reduktion der *lagphase* wurde schon z.B. bei kinetischen Untersuchungen der Fibrillierung des A β -Peptids beobachtet (Esler *et al.*, 1996). Das Fibrillenwachstum zeigte den Verlauf einer Reaktion erster Ordnung. Im Folgenden sollte überprüft werden, ob sich auch die Fibrillierung von N-(+7)Ala diesem Modell entsprechend verhält.

3.4.7.1 Induzierte Fibrillierung von N-(+7)Ala

Für eine Induktion der Fibrillierung wurden Fibrillen von N-(+7)Ala mit Ultraschall behandelt und als *seeds* verwendet. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass hierdurch die Fibrillen in sehr kleine Bruchstücke fragmentiert wurden (Abb. 3.33).

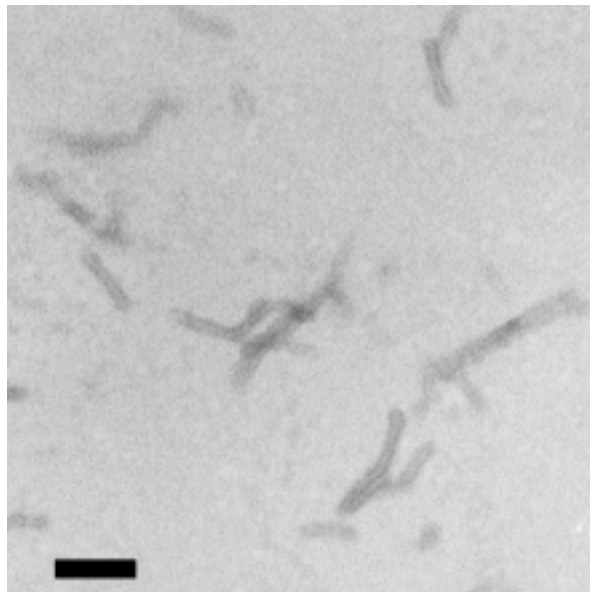


Abb. 3.33 Elektronenmikroskopische Aufnahme von ultraschallbehandelten Fibrillen. Eine Lösung von 2.2 mM N-(+7)Ala in 5 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, 0.1 % (w/v) NaN₃ pH 7.4 wurde sechs Wochen bei 37°C inkubiert und anschließend wie in 2.2.20 beschrieben mit Ultraschall behandelt. Die Aufnahme erfolgte bei einer 85000-fachen Vergrößerung und einer Kathodenspannung von 80 kV. Der Balken entspricht einer Länge von 90 nm.

Für kinetische Untersuchungen zur Induktion der Fibrillierung von N-(+7)Ala wurde eine Proteinkonzentration von 0.55 mM gewählt. Bei dieser Proteinkonzentration betrug die *lagphase* bis zur messbaren Fibrillenbildung mindestens zehn Tage (vgl. Abb. 3.32 A). Für die Induktion der Fibrillierung wurde die Proteinlösung mit 1 % (w/v) der fragmentierten Fibrillen versetzt und das Fibrillenwachstum bei 37°C mittels ANS-Fluoreszenz verfolgt (Abb. 3.34).

Tatsächlich konnte ein Anstieg der Fluoreszenz bereits nach einem Tag beobachtet werden. Außerdem konnte das Fibrillenwachstum einer Reaktion erster Ordnung angepasst

werden (rote Kurve), wobei die Kinetik der ersten vier Tage besser durch eine lineare Funktion (blaue Gerade) beschrieben wird. Eine anfänglich lineares Zunahme der Fibrillen wurde bereits früher bei Induktion der Fibrillierung des A β -Peptids beschrieben (Lomakin *et al.*, 1996). Noch deutlicher ließ sich das anfänglich lineare Fibrillenwachstum bei 20°C beobachten. Im Folgenden werden die Steigungen der linearen Funktionen, welche das lineare Wachstum der Fibrillen beschreiben, als initiale Wachstumsraten bezeichnet.

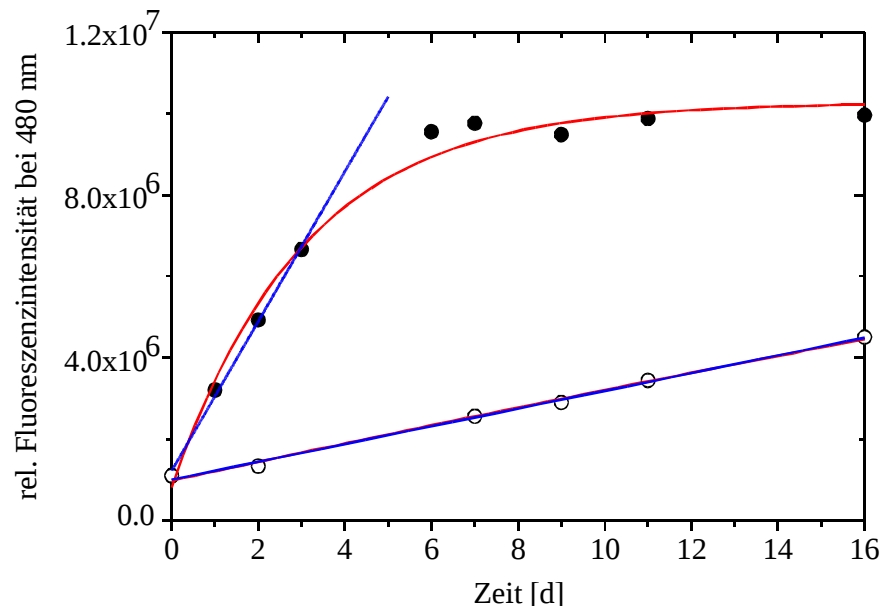


Abb. 3.34 Fibrillenwachstum von N-(+7)Ala nach Zugabe von seeds. Eine Proteinlösung von 0.55 mM N-(+7)Ala in 5 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, 0.1 % (w/v) NaN₃ pH 7.4 wurde mit 1 % (w/v) fragmentierten Fibrillen versetzt und bei 37°C (●) und 20°C (○) inkubiert. Für die Messungen wurden jeweils 4 μ l des Inkubationsansatzes mit 800 μ l ANS-Lösung vermischt, wie in Kap. 2.2.13 beschrieben vermessen und die Spektren pufferkorrigiert. Die Fluoreszenzintensitäten bei 480 nm wurden gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Die blauen Geraden wurden durch lineare Regression, die roten Kurven durch Anpassung einer Reaktion erster Ordnung mit dem Programm Microcal Origin berechnet.

3.4.7.2 Einfluss der seed-Konzentration auf das Fibrillenwachstum mit N-(+7)Ala

In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss der Menge an zugegebenen *seeds* auf das Fibrillenwachstum mit N-(+7)Ala untersucht. Hierzu wurden Proteinlösungen von 0.55 mM N-(+7)Ala mit 0.2 % bzw. 0.1 % (w/v) *seeds* versetzt und anschließend das Wachstum der Fibrillen bei 37°C gemessen (Abb. 3.35). Die Kinetiken konnten, wie schon in Kap 3.4.7.1 erwähnt, durch eine Funktion für eine Reaktion erster Ordnung beschrieben werden, wobei sich die initialen Wachstumsraten wieder annähernd linear verhielten. In dem Ansatz mit einer *seed*-Konzentration von 0.2 % (w/v) war die initiale Wachstumsrate 2.3 mal höher als in dem Ansatz mit einer *seed*-Konzentration von 0.1 % (w/v). Normiert man auf die Anzahl der Keime pro Ansatz, so erhält man annähernd gleiche Wachstumsgeschwindigkeiten

mit einem Verhältnis von 1.15 : 1. Die Geschwindigkeit des Fibrillenwachstums ist demnach unabhängig von der eingesetzten *seed*-Konzentration.

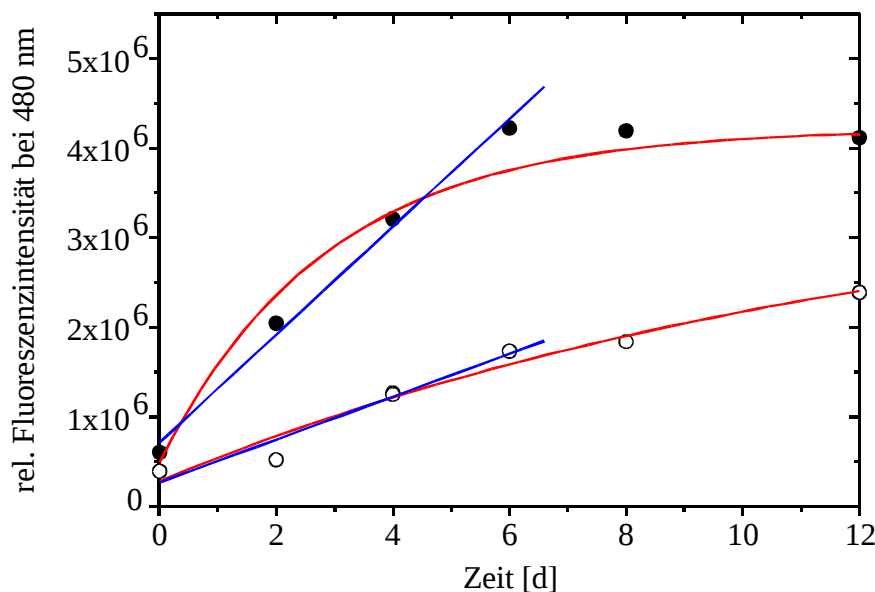


Abb. 3.35 Fibrillenwachstum von N-(+7)Ala nach Zugabe von 0.1 % und 0.2 % (w/v) Wachstumskeimen. Proteinlösungen von 0.55 mM N(+7)Ala in 5 mM KH₂PO₄, 150 mM NaCl, 0.1 % (w/v) NaN₃ pH 7.4 wurden mit 0.2 % (●) bzw. 0.1 % (○) (w/v) ultraschallbehandelten Fibrillen versetzt und bei 37°C inkubiert. Für die Fluoreszenzmessungen wurden jeweils 4 µl des Inkubationsansatzes mit 800 µl ANS-Lösung vermischt, wie in Kap. 2.2.13 beschrieben, vermessen und pufferkorrigiert. Die Fluoreszenzintensitäten bei 480 nm wurden gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Die blauen Geraden wurden durch lineare Regression, die roten Kurven durch Anpassung einer Reaktion erster Ordnung mit dem Programm Microcal Origin berechnet.

3.4.7.3 Einfluss der Proteinkonzentration auf das Fibrillenwachstum

Zur Untersuchung des Einflusses der Proteinkonzentration auf das Fibrillenwachstum, wurden verschiedene Proteinkonzentrationen von N-(+7)Ala mit jeweils 0.1 % (w/v) ultraschallbehandelten Fibrillen versetzt und das Wachstum der Fibrillen mittels ANS-Fluoreszenz verfolgt. Abb. 3.36 A zeigt die gemessenen Fluoreszenzintensitäten während der initialen Wachstumsphasen. Hierbei konnte eine deutliche Zunahme des Fibrillenwachstums mit steigender Proteinkonzentration beobachtet werden. Die Berechnung der initialen Wachstumsraten erfolgte mittels linearer Regression, die dabei bestimmten Steigungen wurden gegen die jeweilige Proteinkonzentration aufgetragen (Abb. 3.36 B). Hierbei konnte eine lineare Abhängigkeit der initialen Wachstumsrate von der Proteinkonzentration bestimmt werden. Der Schnittpunkt mit der Abszisse bei $10 \pm 8 \mu\text{M}$ entspricht der minimalen Proteinkonzentration, die für ein Fibrillenwachstum benötigt wird.

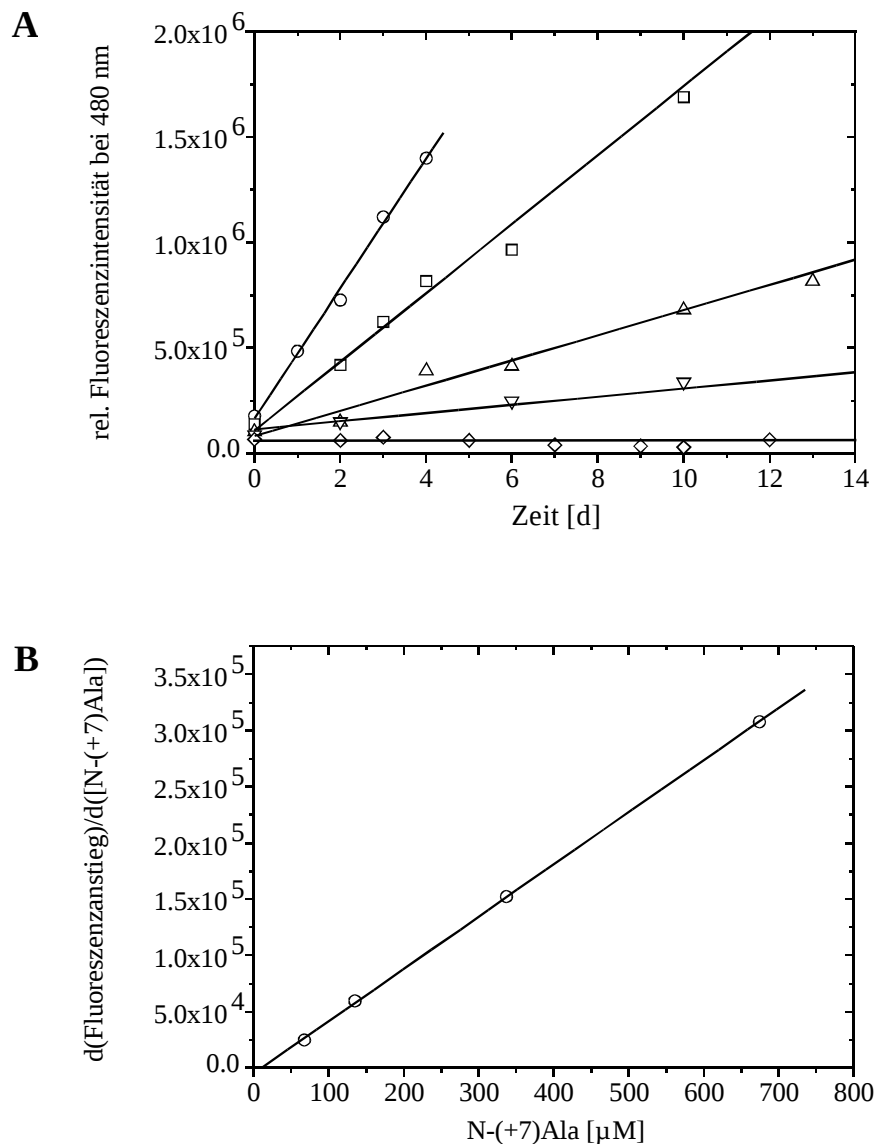


Abb. 3.36 A) Fibrillenwachstum bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen. Verschiedene Proteinkonzentrationen ($\circ$ = 680 μ M, $\square$ = 340 μ M, $\triangle$ = 140 μ M, ∇ = 70 μ M, $\diamond$ = 0 μ M) wurden mit 0.1 % (w/v) *seeds* aus N-(+7)Ala-Fibrillen versetzt und bei 37°C inkubiert. Das Fibrillenwachstum wurde durch ANS-Fluoreszenz bei 480 nm detektiert. Für die Fluoreszenzmessungen wurden 4 μ l des Reaktionsansatzes mit 800 μ l ANS-Lösung versetzt und, wie in Kap. 2.2.13 beschrieben, vermessen. Die initialen Wachstumsraten wurden durch lineare Regression bestimmt. **B) Konzentrationsabhängigkeit des Fibrillenwachstums.** Die mittels linearer Regression ermittelten Steigungen aus A) wurden gegen die eingesetzte Proteinkonzentration aufgetragen. Nach linearer Regression wurde der Schnittpunkt mit der Abszisse zu $10 \pm 8 \mu$ M bestimmt.

3.4.7.4 Vergleich der initialen Wachstumsraten von N-WT, N-(+7)Ala und N-ΔAla

Wood und Mitarbeiter, die eine Fibrillierung von α -Synuclein untersuchten, gelang es, mit *seeds* aus zwei α -Synuclein-Mutanten, die einen frühen Ausbruch der Parkinson-Krankheit verursachen, eine Fibrillierung des Wildtyp-Proteins zu induzieren (Wood *et al.*, 1999). Um eine Fibrillierung der N-terminalen Domäne von PABPN1 mit der Wildtyp-Sequenz und der Deletionsmutante mit *seeds* aus fibrilliertem N-(+7)Ala zu untersuchen, wurden 0.55 mM

N-(+7)Ala bzw. N-WT und 1.1 mM N- Δ Ala jeweils mit 0.1 % (w/v) ultraschallbehandelten Fibrillen von N-(+7)Ala versetzt und anschließend das Fibrillenwachstum analysiert (Abb. 3.37).

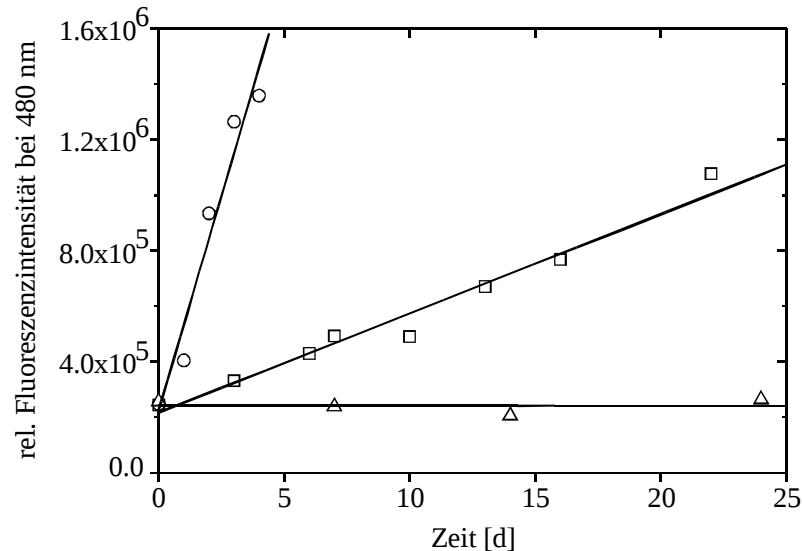


Abb. 3.37 Fibrillenwachstum von N-(+7)Ala, N-WT und N- Δ Ala nach Zugabe von seeds aus Fibrillen von N-(+7)Ala. Ansätze mit 0.55 mM N-(+7)Ala (○), 0.55 mM N-WT (□) und 1.1 mM N- Δ Ala (Δ) in 5 mM KH_2PO_4 , 150 mM NaCl, 0.1 % (w/v) NaN_3 pH 7.4 wurden mit 0.1 % (w/v) seeds aus Fibrillen von N-(+7)Ala bei 37°C inkubiert. Das Wachstum der Fibrillen wurde durch ANS-Fluoreszenz bei 480 nm gemessen. Für die Fluoreszenzmessungen wurden jeweils 4 μl des Reaktionsansatzes mit 800 μl ANS-Lösung vermischt, wie in Kap. 2.2.13 beschrieben vermessen und die Spektren pufferkorrigiert. Die Geraden wurden durch lineare Regression mit dem Programm Microcal Origin berechnet.

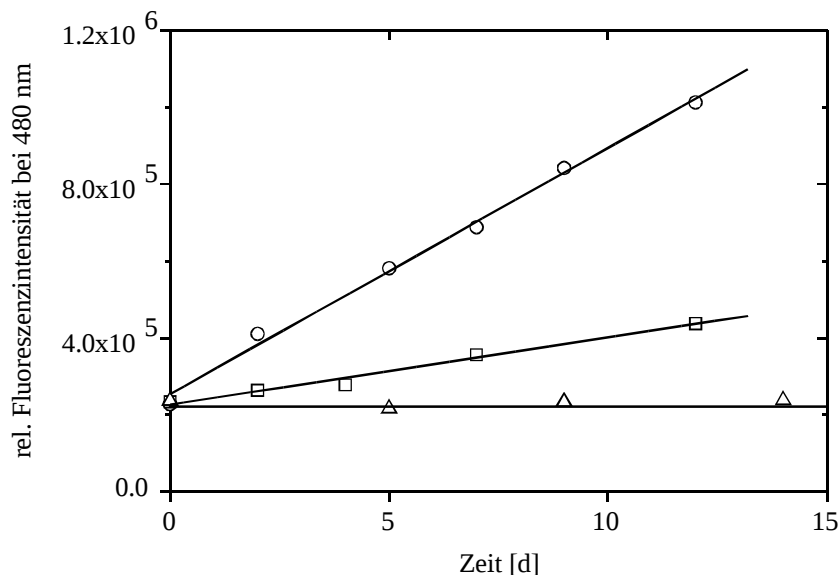


Abb. 3.38 Fibrillenwachstum von N-(+7)Ala, N-WT und N- Δ Ala nach Zugabe von seeds aus Fibrillen von N-WT. Ansätze mit 0.3 mM N-(+7)Ala (○), 0.3 mM N-WT (□) und 1.1 mM N- Δ Ala (Δ) in 5 mM KH_2PO_4 , 150 mM NaCl, 0.1 % (w/v) NaN_3 pH 7.4 wurden mit 0.1 % (w/v) seeds aus Fibrillen von N-WT bei 37°C inkubiert. Das Wachstum der Fibrillen wurde durch ANS-Fluoreszenz bei 480 nm gemessen. Für die Fluoreszenzmessungen wurden jeweils 4 μl des Reaktionsansatzes mit 800 μl ANS-Lösung vermischt, wie in Kap. 2.2.13 beschrieben vermessen und die Spektren pufferkorrigiert. Die Geraden wurden durch lineare Regression mit dem Programm Microcal Origin berechnet.

Auf diese Weise konnte bei N-WT eine Fibrillierung ohne vorherige *lagphase* induziert werden. Die initiale Wachstumsrate bei N-(+7)Ala war jedoch fast neunmal höher als bei N-WT. In dem Ansatz mit N-ΔAla wurde selbst bei einer Proteinkonzentration von 1.1 mM kein Fibrillenwachstum detektiert.

In einem analogen Experiment wurde das Fibrillenwachstum unter Verwendung von *seeds* aus fragmentierten Fibrillen von N-WT untersucht (Abb. 3.38). Erneut wurde bei N-(+7)Ala und N-WT eine Induktion der Fibrillierung beobachtet. Die initiale Wachstumsrate der Fibrillen war bei N-(+7)Ala in diesem Fall nur ca. 3.5 mal größer als bei N-WT. Bei N-ΔAla wurde erneut kein Fibrillenwachstum beobachtet.

3.4.8 Unterdrückung der Fibrillierung durch Trifluorethanol

Die bisherigen Untersuchungen zeigten, dass für die Fibrillierung der N-terminalen Domäne von PABPN1 die N-terminalen Alaninreste notwendig sind. Durch die Alaninexpansion in N-(+7)Ala konnte sogar im Vergleich zum Wildtyp ein größeres Potential zur Fibrillierung beobachtet werden. Aus den Fern-UV-CD-Spektren wurde für die N-terminalen Alanine eine α -helikale Struktur abgeleitet. Bei der strukturellen Charakterisierung der gebildeten Fibrillen wurde jedoch eine β -Struktur nachgewiesen. Demnach muss für eine Fibrillierung die α -helikale Struktur zunächst aufgefaltet werden, damit eine Umlagerung zur β -Struktur erfolgen kann. α -Helices lassen sich in Anwesenheit von Trifluorethanol stabilisieren (Arunkumar *et al.*, 1997; Mukhopadhyay & Basak, 1998). Stabilisiert man die α -Helix von N-(+7)Ala z.B. durch die Zugabe von Trifluorethanol, so sollte die Fibrillierung unterdrückt bzw. deutlich verzögert werden.

Zunächst wurde der Einfluss von Trifluorethanol auf die Sekundärstruktur von löslichem N-(+7)Ala mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie untersucht (Abb. 3.39). Hierbei wurde eine Verschiebung des Hauptminimums von 208 nm in wässriger Umgebung auf 210 nm in ethanolischer Lösung beobachtet. Weiterhin wurde in 80 % Trifluorethanol eine höhere Signalamplitude im Bereich von 210-235 nm gemessen. Das berechnete Differenzspektrum in Abb. 3.39 B zeigt den typischen Kurvenverlauf eines α -helikalen Proteins. Durch die Zugabe von Trifluorethanol wurde demnach bei N-(+7)Ala der α -helikale Strukturanteil verstärkt. Zur Untersuchung der Wirkung von Trifluorethanol auf die Fibrillierung von N-(+7)Ala, wurden 280 μ M N-(+7)Ala in 5 mM KH_2PO_4 , 0.1 % NaN_3 , (w/v), 80 % (v/v) Trifluorethanol pH 7.4 mit 0.1 % (w/v) fragmentierten Fibrillen aus N-(+7)Ala versetzt und das Fibrillenwachstum mittels ANS-Fluoreszenz gemessen (Abb. 3.40). Als Kontrolle diente ein weiterer Ansatz mit

140 μM N-(+7)Ala in 5 mM KH_2PO_4 , 0.1 % (w/v) NaN_3 pH 7.4 und mit 0.1 % (w/v) fragmentierten Fibrillen aus N-(+7)Ala. In Anwesenheit von Trifluorethanol wurde selbst nach 16 Tagen im Gegensatz zur Kontrolle keine Fibrillierung beobachtet. Somit konnte durch eine Stabilisierung der α -helikalen Struktur in N-(+7)Ala eine Fibrillierung unterdrückt werden.

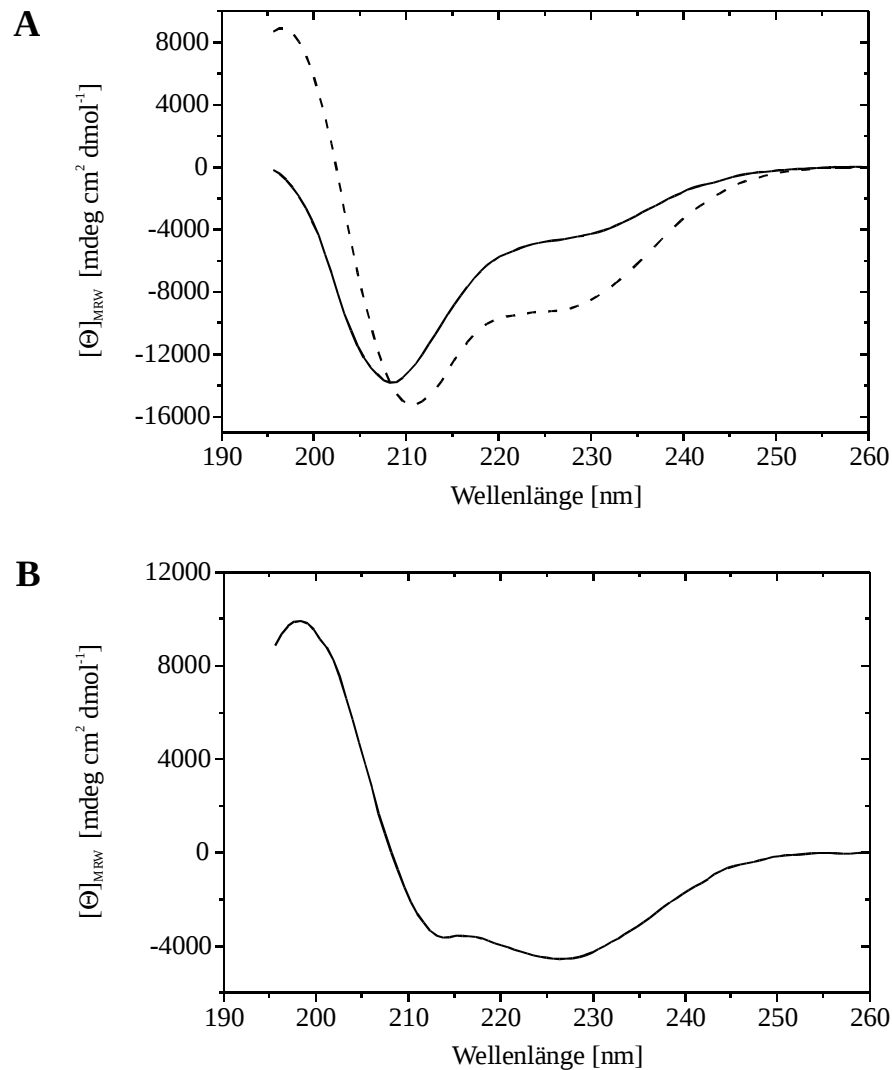


Abb. 3.39 A) Fern-UV-CD-Spektren von N-(+7)Ala in wässrigem Lösungsmittel und in 80 % Trifluorethanol. Die Spektren wurden in 5 mM MOPS pH 6.5 in einer 1 mm Küvette bei 37°C mit 0 % Trifluorethanol (—) bei einer Proteinkonzentration von 17 μM und mit 80 % Trifluorethanol (- - -) bei einer Proteinkonzentration von 14 μM aufgenommen. Beide Spektren wurden pufferkorrigiert. **B) Differenzspektrum von N-(+7)Ala in 80 % und 0 % Trifluorethanol.** Das Differenzspektrum wurde durch einfache Subtraktion der einzelnen Spektren berechnet.

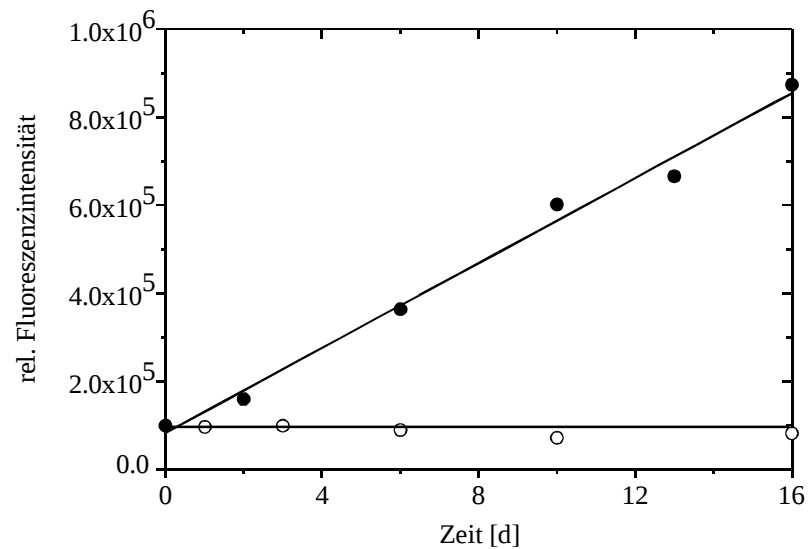


Abb. 3.40 A) Fibrillierung von N-(+7) mit seeds in wässrigem Lösungsmittel in 80 %Trifluorethanol. 280 μM N-(+7)Ala in 5 mM KH_2PO_4 , 0.1 % (w/v) NaN_3 , pH 7.4 mit 0 % (●) und 80 % (○) (v/v) Trifluorethanol wurden mit 0.1 % (w/v) seeds aus Fibrillen von N-(+7)Ala versetzt und bei 37°C inkubiert. Das Wachstum der Fibrillen wurde durch ANS-Fluoreszenz bei 480 nm detektiert. Die Fluoreszenzmessungen erfolgten in 1 cm Küvetten mit den Einstellungen wie in Kap. 2.2.13 beschrieben bei einer Proteinkonzentration von 3 μM . Die Geraden wurden durch lineare Regression mit dem Programm Microcal Origin berechnet.

4 Diskussion

In aktuellen Studien konnten Zusammenhänge zwischen Trinukleotidexpansionen, die zur Verlängerung einer natürlichen Polyalaninsequenz im betroffenen Genprodukt führen, und bestimmten Krankheiten festgestellt werden. Bei der Krankheit OPMD, deren pathologisches Kennzeichen filamentöse Aggregate im Zellkern von Muskelfaserzellen sind, wird die natürliche Polyalaninsequenz von zehn Resten in PABPN1 auf maximal 17 Reste verlängert. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer Verlängerung der Polyalaninsequenz auf die biophysikalischen Eigenschaften von PABPN1 anhand der Mutanten PABPN1-(+7)Ala, der längsten bekannten Alaninexpansion, und einer nicht natürlichen Deletionsmutante PABPN1- Δ Ala, mit deletierter Polyalaninsequenz im Vergleich mit dem Wildtyp-Protein untersucht. Weiterhin wurde untersucht, ob die Verlängerung der natürlichen Polyalaninsequenz einen Einfluss auf eine Fibrillierung der isolierten N-terminalen Domäne von PABPN1 besitzt.

4.1 Strukturelle Charakterisierung von PABPN1

Die rekombinante Expression von PABPN1 in *E. coli* konnte durch Verwendung des Expressionsplasmids pET11a/PABPN1 bei gleichzeitiger Expression der tRNA für die in *E. coli* seltenen Argininkodons optimiert werden. Erste Reinigungsversuche von PABPN1 zeigten eine starke Neigung des Proteins zur Bildung von Aggregaten. Eine Aggregation von PABPN1 *in vitro* wurde schon früher beschrieben (Nemeth *et al.*, 1995). Unter Verwendung eines MOPS-Puffers mit 1.5 M KCl konnte die Aggregation für ca. 3-4 Tage unterdrückt werden. Möglicherweise spielen Ladungseffekte bei der Aggregatbildung eine Rolle. Aufgrund des hohen Anteils saurer Aminosäuren im N-Terminus und basischer Aminosäuren im C-Terminus besitzen die beiden Termini von PABPN1 eine entgegengesetzte Ladung. Eine durch die zwitterionische Struktur von PABPN1 ladungsvermittelte Kopf-Schwanz-Polymerisierung könnte durch die hohe Ionenstärke zurückgedrängt werden. *In vivo* kompensiert wahrscheinlich die RNA durch ihr negativ geladenes Phosphatrückgrat den stark positiv geladenen C-Terminus von PABPN1. Auch in Zellkulturen wurde eine Aggregation von PABPN1 nach Überexpression beobachtet. Die Tatsache, dass in den Aggregaten keine RNA nachgewiesen werden konnte, spricht für einen löslichkeitsvermittelnden Effekt der RNA (Bao *et al.*, 2002). In weiteren Zellkulturexperimenten gelang es durch die Deletion der letzten sechs

Aminosäuren von PABPN1 die Aggregation zu unterdrücken (Fan *et al.*, 2001). In diesem Bereich sind drei aromatische Seitenketten lokalisiert, unter anderem auch der Tryptophanrest an Position 302. Dieser besitzt im Fluoreszenzemissions-Spektrum ein Maximum bei 344 nm. Dies lässt auf eine Lösungsmittelexposition des Aromaten schließen. Da für den C-Terminus keine Sekundärstrukturen vorhergesagt wurden, sind vermutlich auch die zwei anderen Aromaten an Position 303 und 306 lösungsmittel exponiert. Dieser lösungsmittel exponierte hydrophobe Bereich könnte eine weitere Ursache für die Aggregationsanfälligkeit von PABPN1 sein. Auch hier könnte *in vivo* die RNA durch Bindung an PABPN1 die Aggregation unterdrücken, indem die Basen der RNA mit den C-terminalen aromatischen Seitenketten in Wechselwirkung treten.

Bei der strukturellen Charakterisierung von PABPN1 wurde in der Fern-UV-CD-Spektroskopie das Spektrum einer gefalteten Polypeptidkette beobachtet. Die geringe Signalintensität im CD-Spektrum deutet jedoch auf einen sehr geringen Anteil an Sekundärstrukturelementen hin. Dies ist in Übereinstimmung mit Sekundärstrukturvorhersagen, die hauptsächlich im Bereich der Aminosäuresequenz des RRM α -Helices und β -Stränge prognostizieren, wogegen nur geringe Sekundärstrukturelemente im N-Terminus und keine Sekundärstrukturen im C-Terminus erwartet werden. Bei der limitierten Proteolyse konnten weder N-terminale noch C-terminale Bereiche von PABPN1 isoliert werden, lediglich die RNP-Domäne (Aminosäuren 161-263) und eine Domäne mit zusätzlich 35 N-terminalen Aminosäuren, der α -RNP-Domäne (Aminosäuren 126-263) wurden als stabile Produkte der limitierten Proteolyse identifiziert. Dies bestätigt die Vermutung, dass beide Termini weitgehend unstrukturiert vorliegen. Dass PABPN1 bei diesen Experimenten in seiner nativen Konformation vorlag, konnte durch einen funktionellen Assay, bei dem eine PABPN1-abhängige Polyadenylierung gemessen wird, bestätigt werden.

Eine weitere biophysikalische Charakterisierung des Gesamtlängenproteins wurde durch die hohe Salzkonzentration, die zur Unterdrückung der Aggregation notwendig war, erschwert. Daher wurden einzelne Domänen näher untersucht. Die Zuordnung der Domänen erfolgte mittels limitierter Proteolyse. Für eine biophysikalische Charakterisierung wurden daraufhin die N-terminale Domäne (N-WT), die α -RNP- und die RNP-Domäne kloniert. Bei keiner der drei isolierten Domänen wurde die extreme Aggregationsneigung des Gesamtlängenproteins beobachtet. Selbst bei Konzentrationen von 2 mM wurde keine Aggregatbildung detektiert.

Bei der Analyse von N-WT mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie wurde ein sehr geringer Anteil an Sekundärstrukturelementen gemessen. Außerdem konnte weder durch thermische noch durch chemische Denaturierung eine kooperative Entfaltung beobachtet werden. Dies

lässt vermuten, dass N-WT keine Tertiärkontakte besitzt. Die isolierte N-terminale Domäne liegt *in vitro* hauptsächlich als eine ungefaltete Polypeptidkette vor. In Zellkulturexperimenten wurde nach Expression der N-terminalen 145 Aminosäuren von PABPN1 eine erhöhte Transkription der myogenen Faktoren MyoD und Myogenin beobachtet (Kim *et al.*, 2001). Vermutlich faltet die N-terminale Domäne erst nach Wechselwirkung mit anderen Faktoren wie z.B. dem *Ski-interacting protein* zu einer Tertiärstruktur, die eine Regulation der Genexpression ermöglicht (Kim *et al.*, 2001).

Untersuchungen der RNP-Domäne von PABPN1 mittels Fern-UV-CD-Spektroskopie deuten auf die Anwesenheit von α - und β -Strukturen hin. Ähnliche CD-Spektren sind von isolierten RNA-Bindungsdomänen, deren Aminosäuresequenzen ein RRM enthalten, bekannt (Kurihara *et al.*, 1997; Lu & Hall, 1995; Manival *et al.*, 2001). Die typische Struktur eines viersträngigen antiparallelen β -Faltblatts mit zwei flankierenden α -Helices auf einer Seite wie sie in Abb. 1.2 dargestellt ist, liegt wahrscheinlich auch bei der isolierten RNP-Domäne von PABPN1 vor. Zur Lösung der dreidimensionalen Struktur der RNP-Domäne wurden geeignete Kristallisationsbedingungen ermittelt, unter denen röntgentaugliche Proteinkristalle erhalten wurden. Es konnte ein nativer Datensatz mit einer Auflösung von 2.6 Å aufgenommen werden, wobei eine Phasenbestimmung zur Ermittlung der Elektronendichte noch aussteht.

Das CD-Spektrum der α -RNP-Domäne besitzt im Vergleich zum Spektrum der RNP-Domäne eine zusätzliche α -helikale Struktur. Tatsächlich wird für 21 der 35 zusätzlichen Aminosäuren in α -RNP eine α -Helix prognostiziert. Die Aminosäuresequenz dieser Helix enthält eine repetitive Sequenz eines Heptapeptids, bei dem an Position 1 und 4 hydrophobe und an den restlichen Positionen überwiegend geladene Seitenketten lokalisiert sind. Diese Aminosäureabfolgen werden oft in *coiled-coil*-Domänen beobachtet, deren α -Helix eine unpolare Fläche ausbildet, die eine Dimerisierung bzw. höhere Oligomerisierung ermöglicht. Eine Homo-Oligomerisierung von α -RNP konnte aufgrund der Ergebnisse der analytischen Ultrazentrifugation ausgeschlossen werden. Die α -RNP-Domäne wurde ausschließlich als Monomer detektiert. Anhand von Gelfiltrationsläufen konnte zusätzlich ermittelt werden, dass α -RNP keine globulär gefaltete Einheit bildet. Die RNP-Domäne dagegen, verhielt sich sowohl bei der analytischen Ultrazentrifugation als auch bei der Gelfiltration als eine monomere globuläre Domäne. Somit bildet die isolierte RNP-Domäne (Aminosäuren 161-263) eine strukturelle Einheit. Neueste Untersuchungen schreiben dem N-terminalen Bereich vor der RNP-Domäne eine Funktion bei der Stimulierung der Poly(A)-Polymersase zu (Kerwitz, 2002). Die hydrophobe Fläche der prognostizierten α -Helix wird als potentieller Bereich für eine Wechselwirkung und Stimulierung der Poly(A)-Polymerase diskutiert.

Zur Charakterisierung der Wechselwirkung der RNP-Domäne mit RNA wurden Bindungsstudien mit immobilisierter ssRNA (A₁₅) mittels Oberflächenplasmonresonanz durchgeführt. Mit einem Wert von 1.1 μ M liegt die Dissoziationskonstante der RNP-Domäne von PABPN1 zwischen denen anderer isolierter RNA-bindender Domänen mit einem RRM, deren Dissoziationskonstanten im Bereich von 1 mM-50 nM liegen (Dember *et al.*, 1996; Park *et al.*, 2000). Verglichen mit dem Gesamtlängenprotein ist die Dissoziationskonstante jedoch um ca. 2000fach erhöht (Wahle *et al.*, 1993). Bei RNA-Bindungsstudien mit einer Deletionsmutante von PABPN1, deren N-terminalen 113 Aminosäuren fehlten, wurde eine ähnliche Affinität zur RNA beobachtet wie bei dem Wildtyp-Protein (Kerwitz, 2002). Für eine starke Bindung an die RNA scheint demnach hauptsächlich der C-Terminus von PABPN1 notwendig zu sein.

4.2 Einfluss der Polyalaninsequenz auf PABPN1

Wie bei dem Wildtyp-Protein wurde auch bei PABPN1-(+7)Ala und PABPN1- Δ Ala eine Aggregation detektiert, die durch Hochsalzbedingungen verzögert werden konnte. Eine für amyloide Aggregate charakteristische gelb-grüne Doppelbrechung von linear polarisiertem Licht nach Anfärbung mit Kongorot, wurde weder bei den Aggregaten von PABPN1-(+7)Ala noch bei dem Wildtyp-Protein oder der Deletionsmutante beobachtet. Demnach handelte es sich hierbei um eine ungeordnete Aggregatbildung. Messungen zur Stabilität mittels chemischer und thermischer induzierter Entfaltung verliefen wie beim Wildtyp bei beiden Mutanten irreversibel. Eine Verzögerung der Aggregation zu höheren Denaturierungsmittelkonzentrationen bzw. höheren Temperaturen wurde nicht beobachtet. Die Polyalaninsequenz scheint demnach nicht der Auslöser für die unspezifische Aggregation des Gesamtlängenproteins zu sein.

Aus Fern-UV-CD-Spektren ging hervor, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen PABPN1 und der Alaninexpansions- bzw. Deletionsmutante vorliegen. Die veränderte Alaninsequenz induziert demnach keine strukturelle Umfaltung oder Entfaltung von PABPN1. Dies steht im Einklang mit den vorherigen Beobachtungen, dass PABPN1 aus einzelnen strukturell und funktionell unabhängigen Domänen aufgebaut ist. So wird z. B. die Expressionsrate der myogenen Faktoren MyoD und Myogenin durch den isolierten N-terminalen Bereich von PABPN1 in gleicher Weise erhöht wie durch das Gesamtlängenprotein (Kim *et al.*, 2001). Außerdem wurde bei einer N-terminal deletierten Mutante eine dem

Wildtyp vergleichbare Aktivität bei der Polyadenylierung beobachtet (Kerwitz, 2002). Eine strukturelle Veränderung am N-Terminus hat demnach keine Auswirkung auf die Struktur und Funktion der RNP-Domäne oder den C-Terminus. Unter dieser Annahme, dass die einzelnen Domänen von PABPN1 strukturell und funktionell voneinander unabhängig sind, wurde für eine bessere Charakterisierung des Einflusses der Alaninsequenz auf PABPN1 nur die N-terminalen Domänen der Expansions- und Deletionsmutante im Vergleich zur N-terminalen Domäne des Wildtyps analysiert. Die N-terminalen Domänen neigten nicht zur unspezifischen Aggregation und boten zudem den Vorteil, dass die Untersuchungen nahezu unter physiologischen Bedingungen, also in Abwesenheit extrem hoher Salzkonzentrationen durchgeführt werden konnten.

In der Fern-UV-CD-Spektroskopie besaßen N-WT und N-ΔAla ein sehr ähnliches Spektrum. Dagegen zeigte die Mutante mit verlängerter Alaninsequenz einen deutlich höheren Anteil an α -helikaler Struktur. Während der N-Terminus von PABPN1 wahrscheinlich überwiegend unstrukturiert vorliegt, scheinen die sieben zusätzlichen Alanine am N-Terminus eine α -helikale Struktur zu induzieren. Eine stabilisierende Eigenschaft von Alaninresten auf α -Helices wurde bei einer Vielzahl von Peptiden beobachtet (Park *et al.*, 1993; Rohl *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1997). Je länger die Alaninsequenzen waren, desto größer war der α -helikale Anteil in den Peptiden (Miller *et al.*, 2001; Rohl *et al.*, 1999). Da weder bei der thermisch noch chemisch induzierten Entfaltung ein kooperativer Übergang beobachtet wurde, ist anzunehmen, dass keine tertiären Kontakte in der N-terminalen Domäne vorhanden sind, die durch eine Veränderung der Polyalaninsequenz stabilisiert bzw. destabilisiert werden.

4.3 Fibrillenbildung der N-terminalen Domänen

Die bei OPMD-Patienten beobachteten intranukleären Fibrillen in Muskelfaserzellen konnten mit Antikörpern gegen PABPN1 dekoriert werden (Calado *et al.*, 2000b). Ob die Fibrillenbildung auf die verlängerte Polyalaninsequenz von PABPN1 zurückzuführen ist, konnte bislang nicht bewiesen werden. Um den Einfluss der Polyalaninsequenz auf eine Fibrillenbildung zu untersuchen, wurden die N-terminalen Domänen N-(+7)Ala, N-WT und N-ΔAla unter einer physiologischen Salzkonzentration bei 37° inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten auf eine Fibrillenbildung untersucht. Tatsächlich wurde nach einer längeren Inkubationszeit mit N-(+7)Ala und N-WT eine Fibrillenbildung beobachtet. Der Zeitraum vor einer messbaren Fibrillenbildung, die *lagphase*, war jedoch bei N-WT mit 5 Wochen im

Vergleich zu N-(+7)Ala mit 1 Woche fünfmal so lang. Bei der Deletionsmutante wurden selbst bei einer sehr langen Inkubationszeit von 100 Tagen keine Fibrillen detektiert. Demnach ist es sehr wahrscheinlich, dass die Polyalaninsequenz der N-terminalen Domänen die Ursache der Fibrillenbildung ist. Außerdem wird das Potential zur Fibrillenbildung durch eine Expansion der Alaninsequenz drastisch erhöht. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass der Auslöser der Fibrillenbildung in den Muskelfaserzellen von OPMD-Patienten die Expansion der natürlichen Polyalaninsequenz von PABPN1 ist. Eine Fibrillenbildung von PABPN1 mit der natürlichen Polyalaninsequenz wurde *in vivo* jedoch noch nicht beobachtet. Gewöhnlich tritt OPMD erst im höheren Lebensalter von ca. 50-60 Jahren auf. Berücksichtigt man die *in vitro* deutlich längere *lagphase* der Fibrillenbildung von N-WT gegenüber N-(+7)Ala, so ist möglicherweise die Lebenserwartung des Menschen viel kürzer, als die *lagphase* der Fibrillenbildung von Wildtyp-PABPN1 im Organismus.

Die verwendeten Konzentrationen zur Untersuchung der Fibrillenbildung von N-(+7)Ala und N-WT im Bereich von 0.11–1.1 mM sind weitaus höher als man für eine zelluläre Konzentration erwarten würde. Jedoch liegen im Zellkern hohe lokale Konzentrationen von PABPN1 durch die Bindung von PABPN1 an Poly(A)-Schwänze vor. Die 21 nm-Partikel von Poly(A)-PABPN1-Komplexen, die vermutlich einen Einfluss auf die Längenkontrolle des Poly(A)-Schwanzes bei der Polyadenylierung besitzen, enthalten ca. 15-20 PABPN1-Moleküle (Keller *et al.*, 2000). Die PABPN1-Konzentration innerhalb dieser Partikel liegt somit bei ca. 5-7 mM. Da PABPN1 mit expandierter Alaninsequenz bei Filterbindungsexperimenten eine ähnliche Bindung an Poly(A) wie das Wildtyp-Protein zeigte und auch keine veränderte Längenverteilung der Poly(A)-Schwänze der mRNA in Muskelfaserzellen von OPMD-Patienten beobachtet wurde, können für PABPN1 mit expandierter Polyalaninsequenz ähnlich hohe lokale Proteinkonzentrationen in der Zelle erwartet werden wie für Wildtyp-PABPN1 (Calado *et al.*, 2000b). Es wäre sogar möglich, dass durch die verlängerte Polyalaninsequenz PABPN1 einem veränderten *turnover* unterliegt und das mutierte Protein akkumuliert und dadurch eine Fibrillierung begünstigt wird.

Die Kinetik der Fibrillenbildung von N(+7)Ala und N-WT konnte durch Funktionen, die eine sigmoide Kurve beschreiben, angenähert werden. Eine Kinetik mit sigmoiden Kurvenverlauf wurde von Harper und Lansbury durch einen stark vereinfachten nukleationsabhängigen Mechanismus erklärt (Harper & Lansbury, Jr., 1997). Hierbei wird zunächst in einer langsamen Nukleationsphase, die auch als *lagphase* bezeichnet wird, ein Nukleationskeim über mehrere Assoziationsschritte gebildet. Die Anlagerung weiterer Proteinmoleküle an diesen Nukleationskeim führt in einer vergleichsweise schnellen Reaktion

zur Fibrillenbildung. Sind die löslichen Proteinmoleküle verbraucht bzw. sinkt deren Konzentration unter einem bestimmten Wert, so erfolgt keine weitere Verlängerung der Fibrillen. Durch eine Induktion der Fibrillierung z. B. mit *seeds*, kann die *lagphase* unterdrückt bzw. reduziert werden. Bei den Prionen-Krankheiten wie Kuru, eine Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD), Rinderwahnsinn und Scrapie wird sogar vermutet, dass eine Induktion der Fibrillierung durch *seeds* aus fibrilliertem Prion-Protein die Übertragbarkeit dieser Krankheiten bedingt (Prusiner, 1998).

Für die Studien zur Induktion der Fibrillierung der N-terminalen Domänen wurden fragmentierte Fibrillen als *seeds* verwendet. Durch die Zugabe von *seeds* aus Fibrillen von N-(+7)Ala, wurde sowohl mit N-(+7)Ala als auch mit N-WT eine induzierte Fibrillierung, also eine drastische Reduktion der *lagphase* beobachtet. Auch mit *seeds* aus Fibrillen von N-WT wurde eine Fibrillierung von N-(+7)Ala und N-WT induziert. Das beobachtete Fibrillenwachstum bei der induzierten Fibrillierung war jedoch bei N-(+7)Ala um ein vielfaches größer als bei N-WT, unabhängig ob *seeds* aus Fibrillen von N-WT oder N-(+7)Ala verwendet wurden. Bei N-ΔAla konnte durch die Zugabe von *seeds* keine Fibrillierung induziert werden. Demnach erfolgt sowohl die Bildung von Nukleationskeimen, als auch das Fibrillenwachstum nur aufgrund der Polyalaninsequenz der N-terminalen Domänen. Zudem ist das Potential zur Fibrillierung bei der expandierten Alaninsequenz erheblich größer, als bei der Wildtyp-Sequenz. Die Mindestlänge der Alaninsequenz, die eine Fibrillierung der N-terminalen Domäne von PABPN1 hervorruft, ist bisher noch unbekannt. Bei Untersuchungen von Alaninpeptiden mit unterschiedlichen Polyalaninsequenzen wurde ab einer Länge von zehn Alaninresten eine Erhöhung des β-Strukturanteils und eine Fibrillierung der Peptide beobachtet (Blondelle *et al.*, 1997). Ob sich diese für Peptide beobachtete Mindestlänge der Polyalaninsequenz für eine Fibrillierung pauschal auf Proteine übertragen lässt, ist jedoch unklar. Selbst bei den polyalaninexpandierten Proteinen, die im Zusammenhang mit den in Tabelle 1.2 aufgelisteten Krankheiten stehen, kann keine kritische Länge der Polyalaninsequenz abgeleitet werden. Während bei PABPN1 schon bei einer Polyalaninsequenz mit 12-17 Resten das Krankheitsbild von OPMD beobachtet wurde, weist HOXA13 bereits in der Wildtyp-Sequenz 18 aufeinanderfolgende Alanine auf, deren Anzahl beim *hand-foot-genital-syndrom* auf 24-26 Alanine erhöht ist (Brais *et al.*, 1998; Utsch *et al.*, 2002). Bei dieser Argumentation ist jedoch zu berücksichtigen, dass außer bei OPMD bei keiner weiteren Krankheit, deren Ausbruch in Verbindung mit einer Alaninexpansion gebracht wird, bisher eine Diagnose auf Fibrillenbildung gestellt wurde.

4.4 Strukturelle Charakterisierung der Fibrillen aus N-(+7)Ala und N-WT

Die meisten der bisher untersuchten amyloiden Fibrillen besitzen eine sehr ähnliche Morphologie und denselben strukturellen Aufbau. Die Fibrillen von N-(+7)Ala und N-WT besaßen unter dem Elektronenmikroskop eine unverzweigte Struktur mit einem Durchmesser von ca. 10-12 nm. Dieser Wert liegt in dem Bereich von 6-13 nm, der bei den bisher untersuchten Fibrillen aus Patientengeweben verschiedener Erkrankungen gemessen wurde (Tab. 4.1). Ein direkter Größenvergleich mit den hier *in vitro* gebildeten Fibrillen und denen aus Muskelfaserzellen von OPMD-Patienten lässt sich jedoch nicht anstellen, da in dieser Arbeit nur die N-terminalen Domänen zur Fibrillierung verwendet wurden. Außerdem könnten zusätzliche Moleküle wie mRNA oder andere nukleäre Proteine eine Auswirkung auf die Morphologie der Fibrillen in den Muskelfaserzellen haben. Fibrillen von Huntingtin-Fragmenten mit gleicher Polyglutaminsequenz aber unterschiedlicher Proteingesamtlänge unterschieden sich ebenfalls unter dem Elektronenmikroskop in ihrem Durchmesser (Scherzinger *et al.*, 1997). Auch bei der Fibrillierung eines Peptids des A β -Peptids wurde eine deutlich veränderte Morphologie der Fibrillen beobachtet, wenn zusätzlich weitere Proteine dem Aggregationsansatz zugefügt wurden (Konno, 2001).

Tab. 4.1 Durchmesser der Fibrillen aus unterschiedlichen krankheitsrelevanten Proteinen.

Protein	Krankheit	Fibrillen- durchmesser	Referenz
A β -Peptid	Alzheimer Krankheit	9 nm	Kirschner <i>et al.</i> , 1987
Ataxin 3	SCA 3 (MJD)	10 nm	Bevivino & Loll, 2001
α -Synuclein	Parkinson-Krankheit	12 nm	Narhi <i>et al.</i> , 1999
Leichte Ketten der Immunglobuline	Light Chain Amyloidosis	8 nm	Khurana <i>et al.</i> , 2001
PABPN1	OPMD	8.5 nm	Tome & Fardeau., 1980
Prion Protein	Prionen-Krankheiten	8-10 nm	Inouye & Kirschner, 1997
Transthyretin	SSA und FAP	130 nm	Serpell <i>et al.</i> , 1995

FAP = Familial Amyloid Polyneuropathy, MJD = Machado-Joseph Disease, SCA = Spinocerebellar Ataxia, SSA = Senile Systemic Amyloidosis

Die Fibrillen von N-(+7)Ala zeigten nach Anfärbung mit Kongorot eine gelb-grüne Doppelbrechung unter linear polarisiertem Licht, wie sie charakteristisch für amyloide Strukturen ist. Weiterhin besaßen die Fibrillen die für eine antiparallele β -Struktur typischen

spektroskopischen Eigenschaften. Das Röntgenbeugungsmuster wies die charakteristischen Reflexe einer β -cross Struktur auf, die bei einer Reihe von amyloiden Fibrillen beobachtet wurde (Sunde & Blake, 1998). Ein intensiver Reflex bei 4.6 Å ist typisch für β -Faltblätter und kann dem Abstand der einzelnen β -Stränge zugeordnet werden. Dieser Abstand ist bei den meisten β -Faltblättern einheitlich, da die Wechselwirkung der β -Stränge durch das Peptidrückgrat bestimmt wird. Die Wechselwirkung zwischen übereinandergelagerter β -Faltblättern hängt dagegen von der Größe der einzelnen Seitenketten ab, die aus beiden Richtungen der β -Faltblätter herausragen. Bei bisher untersuchten amyloiden Fibrillen wurden diese Abstände bei der Röntgenbeugung im Bereich von 8-12 Å gemessen. Die Reflexe sind oftmals breit und weisen eine sehr geringe Intensität auf (Fraser *et al.*, 1994; Serpell *et al.*, 2000; Sunde *et al.*, 1997). Bestimmend für die Reflexintensität ist die Anzahl der Schichten von β -Faltblättern. Je mehr β -Faltblätter übereinandergelagert sind, desto intensiver und schärfer erscheint der resultierende Reflex. Der Bereich von 8.4-10.5 Å mit einer diffusen und sehr schwachen Reflexintensität bei fibrilliertem N-(+7)Ala lässt demnach auf eine geringe Anzahl von übereinandergelagerten β -Faltblättern schließen.

Die Bildung von unlöslichen amyloiden Fibrillen mit einer β -Struktur aus löslichen Monomeren, die unstrukturiert bzw. teilweise α -helikal strukturiert sind, ist zunächst überraschend. Jedoch liegen die meisten löslichen monomeren Einheiten der amyloiden Fibrillen nicht in einer β -Form vor. So ist das Prion-Protein in seiner nativen Konformation zum größten Teil α -helikal strukturiert, und α -Synuclein liegt überwiegend unstrukturiert vor (Conway *et al.*, 2000; Knaus *et al.*, 2001).

Die Mechanismen, die zu einer strukturellen Umwandlung bei der Fibrillierung führen sind noch weitgehend unbekannt. Es wird jedoch vermutet, dass eine Fibrillierung im Allgemeinen über ein Intermediat verläuft, welches teilweise gefaltet als *molten globule* bzw. in einer nativ-ähnlichen Struktur vorliegt (Rochet & Lansbury, Jr., 2000). Über die genauen Strukturen dieser Intermediate gibt es bislang kaum Informationen. Globuläre Proteine müssen demnach vor einer Fibrillierung teilweise entfaltet werden. Durch die Verwendung von organischen Lösungsmitteln, chemischen Denaturierungsmitteln, pH-Wert-Änderungen oder hohen Temperaturen wurden *in vitro* Bedingungen erzeugt, die zu einer Fibrillierung verschiedener Proteine führten (Chiti *et al.*, 1999; Khurana *et al.*, 2001; Lai *et al.*, 1996; Souillac *et al.*, 2002). *In vivo* können beispielsweise Mutationen, lokale pH-Wert-Änderungen oder oxidativer Stress Ursachen für eine Entfaltung der nativen Struktur sein. Bei der isolierten N-terminalen Domäne von PABPN1 müssen für eine Fibrillierung wahrscheinlich keine Tertiärkontakte aufgebrochen werden. Es muss lediglich eine α - β -Umfaltung der

Polyalaninsequenz erfolgen. Eine solche strukturelle Umfaltung wurde schon bei Polyalaninpeptiden beobachtet, bei denen sich aus anfänglich α -helikalen Monomeren β -Faltblatt-Komplexe bildeten (Blondelle *et al.*, 1997; Perez-Paya *et al.*, 1996). Interessanterweise konnte bei N-(+7)Ala in Anwesenheit von Trifluorethanol die Fibrillierung unterdrückt werden. Durch die Zugabe von Trifluorethanol wurden α -helikale Strukturen von N-(+7)Ala stabilisiert, was eine Umfaltung in eine β -Struktur verhinderte oder zumindest deutlich verzögerte und so einer Fibrillierung entgegen wirkte.

Anhand der kinetischen und strukturellen Informationen kann ein stark vereinfachtes Modell für eine Fibrillierung von N-(+7)Ala bzw. N-WT aufgestellt werden (Abb. 4.1). Die N-terminale Domäne liegt als Monomer in einem strukturellen Gleichgewicht von unstrukturierten und teilweise α -helikalen Molekülformen vor. Die Bildung eines Nukleationskeims erfolgt durch die Assoziation mehrerer Monomere und einer Umfaltung zu einer β -Struktur, die sowohl aus inter- als auch aus intramolekularen β -Faltblättern bestehen kann. Ist einmal ein Nukleationskeim gebildet, so kann die Reaktion durch die Anlagerung weiterer Proteinmoleküle zu einem Fibrillenwachstum führen. Ob eine Oligomerisierung über die α -helikale oder unstrukturierte Molekülform erfolgt und zu welchem Zeitpunkt die Ausbildung einer β -Struktur erfolgt, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht. Auch die Anzahl der Moleküle, die für die Bildung eines Nukleationskeims notwendig sind, ist noch unklar. Modellrechnungen zur Stabilität von β -Faltblatt-Strukturen aus oligomeren Alaninpeptiden mit acht Alaninresten zeigten, dass die β -Faltblätter ab einem Oktamer eine sehr hohe Stabilität besaßen (Ma & Nussinov, 2002). Experimentell wurde dies bislang jedoch nicht bestätigt.

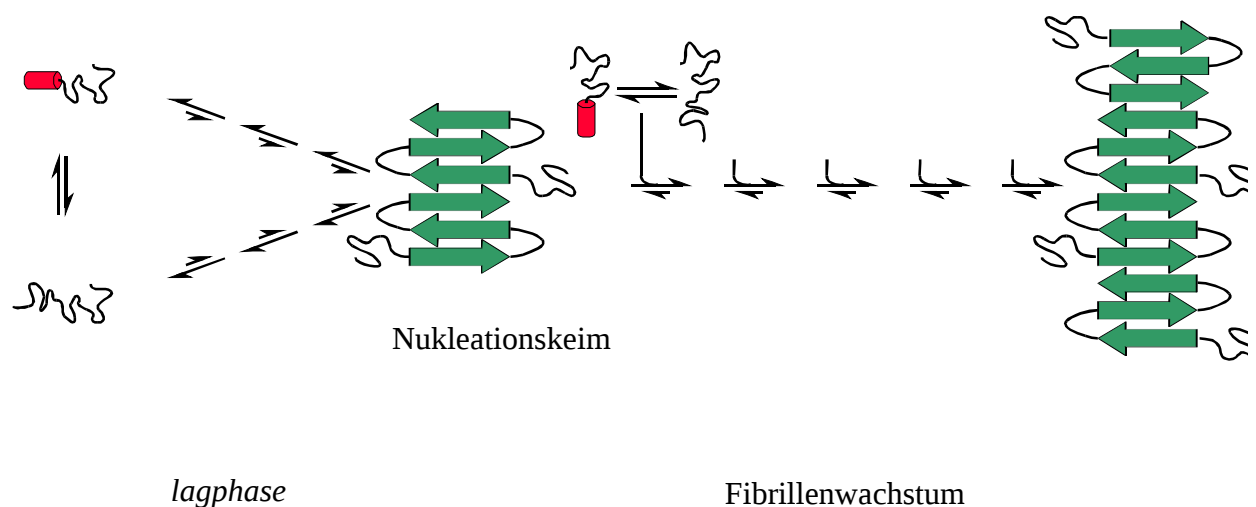


Abb. 4.1 Modell zur Fibrillenbildung der N-terminalen Domäne von PABPN1. α -helikale Strukturen sind als rote Zylinder, β -Stränge als grüne Pfeile dargestellt. Siehe Text für Erläuterungen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine Expansion der Polyalaninsequenz das Potential der Fibrillierung der N-terminalen Domäne drastisch erhöht. Die Funktion des N-Terminus von PABPN1, die Stimulierung muskelspezifischer Gene, wird durch die restlichen Aminosäuren von PABPN1 nicht beeinflusst. Außerdem wird die Funktion von PABPN1 bei der Polyadenylierung durch eine N-terminale Deletion nicht beeinträchtigt. Demnach bildet der N-Terminus von PABPN1 eine unabhängige funktionelle Einheit und vermutlich wird auch die Fibrillierung von PABPN1 nicht von den restlichen Domänen beeinflusst. Die bei OPMD-Patienten beobachteten intranukleären Fibrillen in den Muskelfaserzellen kann somit sehr wahrscheinlich auf die Expansion der Polyalaninsequenz von PABPN1 zurückgeführt werden. Bisher konnte jedoch nicht geklärt werden, ob die Fibrillen selbst als toxische Substanz wirken oder ob durch die Ko-Aggregation anderer Moleküle im Zellkern spezifische Zellfunktionen gestört werden.

Eine Fibrillierung *in vitro* wurde bereits bei vielen Proteine beschrieben, deren Fibrillenbildung *in vivo* bisher noch nicht entdeckt wurde (Fandrich *et al.*, 2001; Guijarro *et al.*, 1998; Hamada & Dobson, 2002; Pertinhez *et al.*, 2001; Srisailam *et al.*, 2002; Zerovnik *et al.*, 2002). Ob durch eine erhöhte Lebenserwartung eine Fibrillierung dieser Proteine im Organismus auftritt und dadurch weitere Zivilisationskrankheiten wie die Alzheimer-, Creutzfeldt-Jakob- und die Parkinson-Krankheit verursacht werden, ist noch ungewiss.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der N-terminalen Polyalaninsequenz des Poly(A)-Bindungsproteins 1 (PABPN1) auf die Bildung amyloider Fibrillen untersucht. Hintergrund der Arbeit waren intranukleäre fibrilläre Aggregate in Muskelfaserzellen, die bei OPMD-Patienten gefunden worden waren. Bei dieser genetisch bedingten Erkrankung ist die natürliche Polyalaninsequenz von PABPN1 durch eine Trinukleotidexpansion im kodierenden Gen um bis zu sieben Alaninreste verlängert. Der Zusammenhang zwischen der verlängerten Alaninsequenz und den fibrillären Aggregaten war bisher noch nicht untersucht worden. Für die Studien dieser Arbeit wurde das Wildtyp-Protein PABPN1, welches N-terminal eine natürliche Polyalaninsequenz aus zehn Alaninresten besitzt sowie eine um sieben Alanine verlängerte und eine Mutante mit deletierter Alaninsequenz verwendet.

Die Untersuchungen ergaben, dass die Alaninexpansion bzw. Deletion keine gravierenden strukturellen Veränderungen bewirkte. Auch ein Einfluss der Polyalaninsequenz auf die Stabilität wurde nicht beobachtet. Der Wildtyp und die zwei Mutanten besaßen *in vitro* eine starke Aggregationstendenz, die nur unter Hochsalzbedingungen verzögert werden konnte. Diese Aggregate besaßen jedoch keine geordnete Struktur, wie sie für amyloide Fibrillen typisch sind. Durch die Verwendung der isolierten N-terminalen Domänen konnten Untersuchungen unter physiologischen Salzkonzentrationen durchgeführt werden. Während N-WT und N- Δ Ala annähernd die gleichen CD-Spektren aufwiesen, wurde im CD-Spektrum von N-(+7)Ala eine deutliche Zunahme an α -helikaler Struktur detektiert. Hinweise auf eine Tertiärstruktur der N-terminalen Domäne wurden nicht erhalten.

In dieser Arbeit konnte erstmals *in vitro* eine Fibrillenbildung der N-terminalen Domäne von PABPN1 beobachtet werden. Die Fibrillierung erfolgte jedoch nur bei N-(+7)Ala und N-WT, während von der Deletionsmutante N- Δ Ala keine Fibrillen ausgebildet wurden. Die Fibrillen besaßen nach der Bindung von Kongorot eine gelb-grüne Doppelbrechung unter linear polarisiertem Licht, wie sie charakteristisch für die Kongorot gefärbten Proteinaggregate aus dem Gewebe von Alzheimer- und Parkinsonpatienten ist. Bei der Röntgenbeugung zeigten die Fibrillen aus N-(+7)Ala ein Reflexmuster, welches typisch für eine β -cross Struktur ist. Weitere strukturelle Analysen lassen auf einen Aufbau der Fibrillen aus sowohl inter- als auch intramolekularen antiparallelen β -Faltblättern schließen.

Die Kinetik der Fibrillenbildung zeigte einen sigmoiden Kurvenverlauf, der durch einen nukleationsabhängigen Mechanismus erklärt werden kann. In einer *lagphase* müssen sich

zuerst geeignete Nukleationskeime bilden. Durch die Anlagerung weiterer Proteinmoleküle kann der Prozess in ein Fibrillenwachstum übergehen. Im Vergleich zum Wildtyp erfolgte die Fibrillierung von N-(+7)Ala mit deutlich kürzerer *lagphase*. Die Dauer der *lagphase* war abhängig von der Temperatur und der Proteinkonzentration. Durch die Zugabe von Wachstumskeimen in Form von ultraschallbehandelten Fibrillen, konnte eine Fibrillierung von N-(+7)Ala und N-WT induziert werden, wobei die *lagphase* deutlich verkürzt wurde. Eine Induktion der Fibrillierung von N-WT gelang auch mit Wachstumskeimen, die aus fibrilliertem N-(+7)Ala präpariert wurden. Das Fibrillenwachstum von N-WT war jedoch deutlich langsamer als das von N-(+7)Ala, unabhängig ob Wachstumskeime von Fibrillen aus N-WT oder N-(+7)Ala verwendet wurden. Durch die Zugabe von Trifluorethanol, das stabilisierend auf α -helikale Strukturen wirkt, konnte die Fibrillierung unterdrückt werden. Mit der Mutante N- Δ Ala, in der die Polyalaninsequenz deletiert wurde, konnte unter keiner der getesteten Bedingungen eine Fibrillierung detektiert werden. In weiteren Experimenten wäre zu ermitteln, ab welcher Länge der Polyalaninsequenz eine Fibrillenbildung erfolgen kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutlich, dass die Expansion der natürlichen Polyalaninsequenz das Potential von PABPN1 zur Fibrillenbildung erhöht und in direktem Zusammenhang mit dem Auftreten der intranukleären Fibrillen in Muskelfaserzellen von OPMD-Patienten steht. Ob diese Fibrillen jedoch als toxische Substanz wirken, oder ob durch den Einschluss von anderen regulatorischen Moleküle im Zellkern in die fibrillären Aggregate die Zellfunktionen gestört werden, ist noch unklar.

Für weitere Entwicklungen von Medikamenten für verbesserte Therapie- und Heilungsmöglichkeiten von amyloid bedingten Erkrankungen ist es von großem Interesse zu wissen, ob für die Bildung von Nukleationskeimen eine Oligomerisierung der Monomere oder die Umfaltung zur β -Struktur der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Weiterhin stehen noch Experimente aus, die den Einfluss des Proteinkontexts auf die Fibrillierung untersuchen. Ein geeignetes System für solche Analysen wäre z. B. eine Fusion der Polyalaninsequenz mit dem bovinen pankreatischen Trypsininhibitor (BPTI), dessen Stabilität gezielt durch reduzierende Agenzien verändert werden kann.

Abgesehen von dem pathologischen Potential der amyloiden Fibrillen wäre eine Nutzung der Fibrillen durch Optimierung der Aminosäuresequenz und Fibrillierungsbedingungen als neue Biomaterialien analog dem Ziel zur Nutzung von synthetischen Spinnenseide denkbar, deren physikalische und chemische Eigenschaften die bisher verwendeten Materialien weit übertreffen. Zuvor muss jedoch ausgeschlossen werden, dass von den verwendeten Fibrillen eine Infektionsgefahr ausgeht.

6 Literaturverzeichnis

- Amack, J. D., Paguio, A. P., and Mahadevan, M. S. Cis and trans effects of the myotonic dystrophy (DM) mutation in a cell culture model. *Hum.Mol.Genet.* **8**, 1975-1984 (1999).
- Arunkumar, A. I., Kumar, T. K., and Yu, C. Specificity of helix-induction by 2,2,2-trifluoroethanol in polypeptides. *Int.J.Biol.Macromol.* **21**, 223-230 (1997).
- Bagni, C. and Lapeyre, B. Gar1p binds to the small nucleolar RNAs snR10 and snR30 in vitro through a nontypical RNA binding element. *J.Biol.Chem.* **273**, 10868-10873 (1998).
- Bao, Y. P., Cook, L. J., O'Donovan, D., Uyama, E., and Rubinsztein, D. C. Mammalian, yeast, bacterial, and chemical chaperones reduce aggregate formation and death in a cell model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *J.Biol.Chem.* **277**, 12263-12269 (2002).
- Benhold, H. Specific staining of amyloid by Congo red. *Muenchen.Med.Wochenschr.* 1537-1538 (1922).
- Bevivino, A. E. and Loll, P. J. An expanded glutamine repeat destabilizes native ataxin-3 structure and mediates formation of parallel beta -fibrils. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 11955-11960 (2001).
- Bienvenu, T., Poirier, K., Friocourt, G., Bahi, N., Beaumont, D., Fauchereau, F., Ben Jeema, L., Zemni, R., Vinet, M. C., Francis, F., Couvert, P., Gomot, M., Moraine, C., Van Bokhoven, H., Kalscheuer, V., Frints, S., Gecz, J., Ohzaki, K., Chaabouni, H., Fryns, J. P., Desportes, V., Beldjord, C., and Chelly, J. ARX, a novel Prd-class-homeobox gene highly expressed in the telencephalon, is mutated in X-linked mental retardation. *Hum.Mol.Genet.* **11**, 981-991 (2002).
- Blondelle, S. E., Forood, B., Houghten, R. A., and Perez-Paya, E. Polyalanine-based peptides as models for self-associated beta-pleated-sheet complexes. *Biochemistry* **36**, 8393-8400 (1997).
- Bonar, L., Cohen, A. S., and Skinner, M. Characterization of the amyloid fibril as a cross- β Protein. *Proc.Soc.Expt.Biol.Med.* **131**, 1373-1375 (1967).
- Bouvet, P., Diaz, J. J., Kindbeiter, K., Madjar, J. J., and Amalric, F. Nucleolin interacts with several ribosomal proteins through its RGG domain. *J.Biol.Chem.* **273**, 19025-19029 (1998).
- Brais, B., Bouchard, J. P., Xie, Y. G., Rochefort, D. L., Chretien, N., Tomé, F. M., Lafreniere, R. G., Rommens, J. M., Uyama, E., Nohira, O., Blumen, S., Korczyn, A. D., Heutink, P., Mathieu, J., Duranceau, A., Codere, F., Fardeau, M., Rouleau, G. A., and Korczyn, A. D. Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nat.Genet.* **18**, 164-167 (1998).

- Brinkmann, U., Mattes, R. E., and Buckel, P. High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the *dnaY* gene product. *Gene* **85**, 109-114 (1989).
- Brook, J. D., McCurrach, M. E., Harley, H. G., Buckler, A. J., Church, D., Aburatani, H., Hunter, K., Stanton, V. P., Thirion, J. P., Hudson, T., and . Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* **68**, 799-808 (1992).
- Buchner, J. and Rudolph, R. Renaturation, purification and characterization of recombinant Fab-fragments produced in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N.Y.)* **9**, 157-162 (1991).
- Burke, M. J. and Rougvie, M. A. Cross- protein structures. I. Insulin fibrils. *Biochemistry* **11**, 2435-2439 (1972).
- Burstein, E. A., Vedenkina, N. S., and Ivkova, M. N. Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules. *Photochem.Photobiol.* **18**, 263-279 (1973).
- Byler, D. M. and Susi, H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers* **25**, 469-487 (1986).
- Calado, A., Kutay, U., Kuhn, U., Wahle, E., and Carmo-Fonseca, M. Deciphering the cellular pathway for transport of poly(A)-binding protein II. *RNA*. **6**, 245-256 (2000a).
- Calado, A., Tomé, F. M., Brais, B., Rouleau, G. A., Kuhn, U., Wahle, E., and Carmo-Fonseca, M. Nuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy consist of poly(A) binding protein 2 aggregates which sequester poly(A) RNA. *Hum.Mol.Genet.* **9**, 2321-2328 (2000b).
- Cancel, G., Durr, A., Didierjean, O., Imbert, G., Burk, K., Lezin, A., Belal, S., Benomar, A., Abada-Bendib, M., Vial, C., Guimaraes, J., Chneiweiss, H., Stevanin, G., Yvert, G., Abbas, N., Saudou, F., Lebre, A. S., Yahyaoui, M., Hentati, F., Vernant, J. C., Klockgether, T., Mandel, J. L., Agid, Y., and Brice, A. Molecular and clinical correlations in spinocerebellar ataxia 2: a study of 32 families. *Hum.Mol.Genet.* **6**, 709-715 (1997).
- Chen, Z., Li, Y., and Krug, R. M. Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *EMBO J.* **18**, 2273-2283 (1999).
- Chiti, F., Webster, P., Taddei, N., Clark, A., Stefani, M., Ramponi, G., and Dobson, C. M. Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 3590-3594 (1999).
- Conway, K. A., Harper, J. D., and Lansbury, P. T., Jr. Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. *Biochemistry* **39**, 2552-2563 (2000).
- Crisponi, L., Deiana, M., Loi, A., Chiappe, F., Uda, M., Amati, P., Bisceglia, L., Zelante, L., Nagaraja, R., Porcu, S., Ristaldi, M. S., Marzella, R., Rocchi, M., Nicolino, M., Lienhardt-Roussie, A., Nivelon, A., Verloes, A., Schlessinger, D., Gasparini, P., Bonneau, D., Cao, A., and Pilia, G. The putative forkhead transcription factor FOXL2

- is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat.Genet.* **27**, 159-166 (2001).
- Cummings, C. J. and Zoghbi, H. Y. Fourteen and counting: unraveling trinucleotide repeat diseases. *Hum.Mol.Genet.* **9**, 909-916 (2000).
- Dember, L. M., Kim, N. D., Liu, K. Q., and Anderson, P. Individual RNA recognition motifs of TIA-1 and TIAR have different RNA binding specificities. *J.Biol.Chem.* **271**, 2783-2788 (1996).
- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K. O., Davies, S. W., Bates, G. P., Vonsattel, J. P., and Aronin, N. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* **277**, 1990-1993 (1997).
- Eanes, E. D. and Glenner, G. G. X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *J.Histochem.Cytochem* **16**, 673-677 (1968).
- Ellman, G. L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch.Biochem.Biophys.* **82**, 70-77 (1959).
- Engelhard, M. and Evans, P. A. Kinetics of interaction of partially folded proteins with a hydrophobic dye: evidence that molten globule character is maximal in early folding intermediates. *Protein Sci.* **4**, 1553-1562 (1995).
- Esler, W. P., Stimson, E. R., Ghilardi, J. R., Vinters, H. V., Lee, J. P., Mantyh, P. W., and Maggio, J. E. In vitro growth of Alzheimer's disease beta-amyloid plaques displays first-order kinetics. *Biochemistry* **35**, 749-757 (1996).
- Fan, X., Dion, P., Laganier, J., Brais, B., and Rouleau, G. A. Oligomerization of polyalanine expanded PABPN1 facilitates nuclear protein aggregation that is associated with cell death. *Hum.Mol.Genet.* **10**, 2341-2351 (2001).
- Fandrich, M. and Dobson, C. M. The behaviour of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation. *EMBO J.* **21**, 5682-5690 (2002).
- Fandrich, M., Fletcher, M. A., and Dobson, C. M. Amyloid fibrils from muscle myoglobin. *Nature* **410**, 165-166 (2001).
- Fraser, P. E., McLachlan, D. R., Surewicz, W. K., Mizzen, C. A., Snow, A. D., Nguyen, J. T., and Kirschner, D. A. Conformation and fibrillogenesis of Alzheimer A beta peptides with selected substitution of charged residues. *J.Mol.Biol.* **244**, 64-73 (1994).
- Galant, R. and Carroll, S. B. Evolution of a transcriptional repression domain in an insect Hox protein. *Nature* **415**, 910-913 (2002).
- Geddes, A. J., Parker, K. D., Atkins, E. D., and Beighton, E. "Cross-beta" conformation in proteins. *J.Mol.Biol.* **32**, 343-358 (1968).
- Gill, S. C. and von Hippel, P. H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal.Biochem.* **182**, 319-326 (1989).

- Goormaghtigh, E., Cabiaux, V., and Ruyschaert, J.-M. Physicochemical Methods in the Study of Biomembranes. *Subcellular Biochemistry* 405-450 (ed Hilderson and Ralston) Plenum Press, New York(1994).
- Guijarro, J. I., Sunde, M., Jones, J. A., Campbell, I. D., and Dobson, C. M. Amyloid fibril formation by an SH3 domain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 4224-4228 (1998).
- Gusella, J. F. and MacDonald, M. E. Molecular genetics: unmasking polyglutamine triggers in neurodegenerative disease. *Nat.Rev.Neurosci.* **1**, 109-115 (2000).
- Hamada, D. and Dobson, C. M. A kinetic study of beta-lactoglobulin amyloid fibril formation promoted by urea. *Protein Sci.* **11**, 2417-2426 (2002).
- Han, K. and Manley, J. L. Functional domains of the Drosophila Engrailed protein. *EMBO J.* **12**, 2723-2733 (1993).
- Harding, S. E. Hydrodynamic properties of proteins. In: *Protein Structure: A Practical Approach* (ed T. Creighton) IRL Press, Oxford. 219-251(1997).
- Harper, J. D. and Lansbury, P. T., Jr. Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu.Rev.Biochem.* **66**, 385-407 (1997).
- Hill, M. E., Creed, G. A., McMullan, T. F., Tyers, A. G., Hilton-Jones, D., Robinson, D. O., and Hammans, S. R. Oculopharyngeal muscular dystrophy: phenotypic and genotypic studies in a UK population. *Brain* **124**, 522-526 (2001).
- Holmes, S. E., O'Hearn, E., Rosenblatt, A., Callahan, C., Hwang, H. S., Ingersoll-Ashworth, R. G., Fleisher, A., Stevanin, G., Brice, A., Potter, N. T., Ross, C. A., and Margolis, R. L. A repeat expansion in the gene encoding junctophilin-3 is associated with Huntington disease-like 2. *Nat.Genet.* **29**, 377-378 (2001).
- Ikeda, H., Yamaguchi, M., Sugai, S., Aze, Y., Narumiya, S., and Kakizuka, A. Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo. *Nat.Genet.* **13**, 196-202 (1996).
- Inouye, H. and Kirschner, D. A. X-ray diffraction analysis of scrapie prion: intermediate and folded structures in a peptide containing two putative alpha-helices. *J.Mol.Biol.* **268**, 375-389 (1997).
- Jarrett, J. T., Berger, E. P., and Lansbury, P. T., Jr. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* **32**, 4693-4697 (1993).
- Keller, R. W., Kuhn, U., Aragon, M., Bornikova, L., Wahle, E., and Bear, D. G. The nuclear poly(A) binding protein, PABP2, forms an oligomeric particle covering the length of the poly(A) tail. *J.Mol.Biol.* **297**, 569-583 (2000).
- Kelly, J. W. Alternative conformations of amyloidogenic proteins govern their behavior. *Curr.Opin.Struct.Biol.* **6**, 11-17 (1996).

- Kerwitz, Y. Die Stimulierung der Polyadenylierung durch das nukleäre Poly(A)-Bindungsprotein 1. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (2002).
- Khurana, R., Gillespie, J. R., Talapatra, A., Minert, L. J., Ionescu-Zanetti, C., Millett, I., and Fink, A. L. Partially folded intermediates as critical precursors of light chain amyloid fibrils and amorphous aggregates. *Biochemistry* **40**, 3525-3535 (2001).
- Kim, S., Merrill, B. M., Rajpurohit, R., Kumar, A., Stone, K. L., Papov, V. V., Schneiders, J. M., Szer, W., Wilson, S. H., Paik, W. K., and Williams, K. R. Identification of N(G)-methylarginine residues in human heterogeneous RNP protein A1: Phe/Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Gly-Gly/Phe is a preferred recognition motif. *Biochemistry* **36**, 5185-5192 (1997).
- Kim, Y. J., Noguchi, S., Hayashi, Y. K., Tsukahara, T., Shimizu, T., and Arahata, K. The product of an oculopharyngeal muscular dystrophy gene, poly(A)-binding protein 2, interacts with SKIP and stimulates muscle-specific gene expression. *Hum.Mol.Genet.* **10**, 1129-1139 (2001).
- Kim, Y. S., Randolph, T. W., Stevens, F. J., and Carpenter, J. F. Kinetics and energetics of assembly, nucleation, and growth of aggregates and fibrils for an amyloidogenic protein. Insights into transition states from pressure, temperature, and co-solute studies. *J.Biol.Chem.* **277**, 27240-27246 (2002).
- Kirschner, D. A., Inouye, H., Duffy, L. K., Sinclair, A., Lind, M., and Selkoe, D. J. Synthetic peptide homologous to beta protein from Alzheimer disease forms amyloid-like fibrils in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84**, 6953-6957 (1987).
- Knaus, K. J., Morillas, M., Swietnicki, W., Malone, M., Surewicz, W. K., and Yee, V. C. Crystal structure of the human prion protein reveals a mechanism for oligomerization. *Nat.Struct.Biol.* **8**, 770-774 (2001).
- Konno, T. Amyloid-induced aggregation and precipitation of soluble proteins: an electrostatic contribution of the Alzheimer's beta(25-35) amyloid fibril. *Biochemistry* **40**, 2148-2154 (2001).
- Krause, S., Fakan, S., Weis, K., and Wahle, E. Immunodetection of poly(A) binding protein II in the cell nucleus. *Exp.Cell Res.* **214**, 75-82 (1994).
- Krimm, S. and Bandekar, J. Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Adv.Protein Chem.* **38**, 181-364 (1986).
- Kurihara, Y., Nagata, T., Imai, T., Hiwatashi, A., Horiuchi, M., Sakakibara, S., Katahira, M., Okano, H., and Uesugi, S. Structural properties and RNA-binding activities of two RNA recognition motifs of a mouse neural RNA-binding protein, mouse-Musashi-1. *Gene* **186**, 21-27 (1997).
- Lai, Z., Colon, W., and Kelly, J. W. The acid-mediated denaturation pathway of transthyretin yields a conformational intermediate that can self-assemble into amyloid. *Biochemistry* **35**, 6470-6482 (1996).

- LeVine, H., III Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.* **2**, 404-410 (1993).
- Lieberman, A. P., Trojanowski, J. Q., Leonard, D. G., Chen, K. L., Barnett, J. L., Leverenz, J. B., Bird, T. D., Robitaille, Y., Malandrini, A., and Fischbeck, K. H. Ataxin 1 and ataxin 3 in neuronal intranuclear inclusion disease. *Ann.Neurol.* **46**, 271-273 (1999).
- Lomakin, A., Chung, D. S., Benedek, G. B., Kirschner, D. A., and Teplow, D. B. On the nucleation and growth of amyloid beta-protein fibrils: detection of nuclei and quantitation of rate constants. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 1125-1129 (1996).
- Lu, J. and Hall, K. B. An RBD that does not bind RNA: NMR secondary structure determination and biochemical properties of the C-terminal RNA binding domain from the human U1A protein. *J.Mol.Biol.* **247**, 739-752 (1995).
- Lupas, A. Prediction and analysis of coiled-coil structures. *Methods Enzymol.* **266**, 513-525 (1996).
- Ma, B. and Nussinov, R. Molecular dynamics simulations of alanine rich beta-sheet oligomers: Insight into amyloid formation. *Protein Sci.* **11**, 2335-2350 (2002).
- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trotter, Y., Lehrach, H., Davies, S. W., and Bates, G. P. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* **87**, 493-506 (1996).
- Manival, X., Ghisolfi-Nieto, L., Joseph, G., Bouvet, P., and Erard, M. RNA-binding strategies common to cold-shock domain- and RNA recognition motif-containing proteins. *Nucleic Acids Res.* **29**, 2223-2233 (2001).
- Martin, G. and Keller, W. Mutational analysis of mammalian poly(A) polymerase identifies a region for primer binding and catalytic domain, homologous to the family X polymerases, and to other nucleotidyltransferases. *EMBO J.* **15**, 2593-2603 (1996).
- Matsuyama, Z., Kawakami, H., Maruyama, H., Izumi, Y., Komure, O., Udaka, F., Kameyama, M., Nishio, T., Kuroda, Y., Nishimura, M., and Nakamura, S. Molecular features of the CAG repeats of spinocerebellar ataxia 6 (SCA6). *Hum.Mol.Genet.* **6**, 1283-1287 (1997).
- McPherson, A. Current approaches to macromolecular crystallization. *Eur.J.Biochem.* **189**, 1-23 (1990).
- Mears, W. E. and Rice, S. A. The RGG box motif of the herpes simplex virus ICP27 protein mediates an RNA-binding activity and determines in vivo methylation. *J.Virol.* **70**, 7445-7453 (1996).
- Meyer, S., Urbanke, C., and Wahle, E. Equilibrium studies on the association of the nuclear poly(A) binding protein with poly(A) of different lengths. *Biochemistry* **41**, 6082-6089 (2002).

- Miller, J. S., Kennedy, R. J., and Kemp, D. S. Short, solubilized polyalanines are conformational chameleons: exceptionally helical if N- and C-capped with helix stabilizers, weakly to moderately helical if capped with rigid spacers. *Biochemistry* **40**, 305-309 (2001).
- Mitchell, P. and Tollervey, D. mRNA stability in eukaryotes. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **10**, 193-198 (2000).
- Mukhopadhyay, K. and Basak, S. Conformation induction in melanotropic peptides by trifluoroethanol: fluorescence and circular dichroism study. *Biophys.Chem.* **74**, 175-186 (1998).
- Nagai, K. RNA-protein complexes. *Curr.Opin.Struct.Biol.* **6**, 53-61 (1996).
- Nagai, K., Oubridge, C., Jessen, T. H., Li, J., and Evans, P. R. Crystal structure of the RNA-binding domain of the U1 small nuclear ribonucleoprotein A. *Nature* **348**, 515-520 (1990).
- Nakamoto, M., Nakano, S., Kawashima, S., Ihara, M., Nishimura, Y., Shinde, A., and Kakizuka, A. Unequal crossing-over in unique PABP2 mutations in Japanese patients: a possible cause of oculopharyngeal muscular dystrophy. *Arch.Neurol.* **59**, 474-477 (2002).
- Nakamura, K. [SCA17, a novel polyglutamine disease caused by the expansion of polyglutamine tracts in TATA-binding protein]. *Rinsho Shinkeigaku* **41**, 1123-1125 (2001).
- Nakielnny, S. and Dreyfuss, G. Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell* **99**, 677-690 (1999).
- Narhi, L., Wood, S. J., Steavenson, S., Jiang, Y., Wu, G. M., Anafi, D., Kaufman, S. A., Martin, F., Sitney, K., Denis, P., Louis, J. C., Wypych, J., Biere, A. L., and Citron, M. Both familial Parkinson's disease mutations accelerate alpha-synuclein aggregation. *J.Biol.Chem.* **274**, 9843-9846 (1999).
- Nemeth, A., Krause, S., Blank, D., Jenny, A., Jenö, P., Lustig, A., and Wahle, E. Isolation of genomic and cDNA clones encoding bovine poly(A) binding protein II. *Nucleic Acids Res.* **23**, 4034-4041 (1995).
- Nielsen, L., Khurana, R., Coats, A., Frokjaer, S., Brange, J., Vyas, S., Uversky, V. N., and Fink, A. L. Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: elucidation of the molecular mechanism. *Biochemistry* **40**, 6036-6046 (2001).
- Ordway, J. M., Tallaksen-Greene, S., Gutekunst, C. A., Bernstein, E. M., Cearley, J. A., Wiener, H. W., Dure, L. S., Lindsey, R., Hersch, S. M., Jope, R. S., Albin, R. L., and Detloff, P. J. Ectopically expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and a progressive late onset neurological phenotype in the mouse
1034. *Cell* **91**, 753-763 (1997).
- Pace, C. N. Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol.* **131**, 266-280 (1986).

- Pace, C. N. and Scholtz, M. J. Measuring the Conformational Stability of a Protein. In: *Protein Structure: A Practical Approach* (ed T. Creighton) pp 299-322. IRL Press, Oxford.(1997).
- Park, S., Myszka, D. G., Yu, M., Littler, S. J., and Laird-Offringa, I. A. HuD RNA recognition motifs play distinct roles in the formation of a stable complex with AU-rich RNA. *Mol.Cell Biol.* **20**, 4765-4772 (2000).
- Park, S. H., Shalongo, W., and Stellwagen, E. Residue helix parameters obtained from dichroic analysis of peptides of defined sequence. *Biochemistry* **32**, 7048-7053 (1993).
- Pauling, L. and Corey, R. Configuration of polypeptide chains with favoured orientation around single bonds: two new pleated sheets. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **37**, 729-739 (1951).
- Perez-Paya, E., Forood, B., Houghten, R. A., and Blondelle, S. E. Structural characterization and 5'-mononucleotide binding of polyalanine beta-sheet complexes. *J.Mol.Recognit.* **9**, 488-493 (1996).
- Pertinhez, T. A., Bouchard, M., Tomlinson, E. J., Wain, R., Ferguson, S. J., Dobson, C. M., and Smith, L. J. Amyloid fibril formation by a helical cytochrome. *FEBS Lett.* **495**, 184-186 (2001).
- Perutz, M. F., Johnson, T., Suzuki, M., and Finch, J. T. Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 5355-5358 (1994).
- Petkova, A. T., Ishii, Y., Balbach, J. J., Antzutkin, O. N., Leapman, R. D., Delaglio, F., and Tycko, R. A structural model for Alzheimer's beta -amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**, 16742-16747 (2002).
- Pimentel, M. M. Fragile X syndrome (review). *Int.J.Mol.Med.* **3**, 639-645 (1999).
- Prusiner, S. B. Prions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 13363-13383 (1998).
- Riess, O., Laccone, F. A., Gispert, S., Schols, L., Zuhlke, C., Vieira-Saecker, A. M., Herlt, S., Wessel, K., Epplen, J. T., Weber, B. H., Kreuz, F., Chahrokh-Zadeh, S., Meindl, A., Lunkes, A., Aguiar, J., Macek, M., Jr., Krebsova, A., Macek, M., Sr., Burk, K., Tinschert, S., Schreyer, I., Pulst, S. M., and Auburger, G. SCA2 trinucleotide expansion in German SCA patients. *Neurogenetics.* **1**, 59-64 (1997a).
- Riess, O., Schols, L., Bottger, H., Nolte, D., Vieira-Saecker, A. M., Schimming, C., Kreuz, F., Macek, M., Jr., Krebsova, A., Macek, M. S., Klockgether, T., Zuhlke, C., and Laccone, F. A. SCA6 is caused by moderate CAG expansion in the alpha1A-voltage-dependent calcium channel gene. *Hum.Mol.Genet.* **6**, 1289-1293 (1997b).
- Rivas, G., Stafford, W., and Minton, A. P. Characterization of heterologous protein-protein interactions using analytical ultracentrifugation. *Methods* **19**, 194-212 (1999).

- Rochet, J. C. and Lansbury, P. T., Jr. Amyloid fibrillogenesis: themes and variations. *Curr.Opin.Struct.Biol.* **10**, 60-68 (2000).
- Rohl, C. A., Chakrabartty, A., and Baldwin, R. L. Helix propagation and N-cap propensities of the amino acids measured in alanine-based peptides in 40 volume percent trifluoroethanol. *Protein Sci.* **5**, 2623-2637 (1996).
- Rohl, C. A., Fiori, W., and Baldwin, R. L. Alanine is helix-stabilizing in both template-nucleated and standard peptide helices. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 3682-3687 (1999).
- Ross, C. A. Intracellular neuronal inclusions: a common pathogenic mechanism for glutamine-repeat neurodegenerative diseases? *Neuron* **19**, 1147-1150 (1997).
- Rost, B. PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile-based neural networks. *Methods Enzymol.* **266**, 525-539 (1996).
- Sachs, A. B. and Varani, G. Eukaryotic translation initiation: there are (at least) two sides to every story. *Nat.Struct.Biol.* **7**, 356-361 (2000).
- Santoro, M. M. and Bolen, D. W. Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry* **27**, 8063-8068 (1988).
- Scacheri, P. C., Garcia, C., Hebert, R., and Hoffman, E. P. Unique PABP2 mutations in "Cajuns" suggest multiple founders of oculopharyngeal muscular dystrophy in populations with French ancestry. *Am.J.Med.Genet.* **86**, 477-481 (1999).
- Scherzinger, E., Lurz, R., Turmaine, M., Mangiarini, L., Hollenbach, B., Hasenbank, R., Bates, G. P., Davies, S. W., Lehrach, H., and Wanker, E. E. Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell* **90**, 549-558 (1997).
- Schlumpberger, M., Wille, H., Baldwin, M. A., Butler, D. A., Herskowitz, I., and Prusiner, S. B. The prion domain of yeast Ure2p induces autocatalytic formation of amyloid fibers by a recombinant fusion protein. *Protein Sci.* **9**, 440-451 (2000).
- Semisotnov, G. V., Rodionova, N. A., Razgulyaev, O. I., Uversky, V. N., Gripas', A. F., and Gilmanshin, R. I. Study of the "molten globule" intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe. *Biopolymers* **31**, 119-128 (1991).
- Serpell, L. C., Berriman, J., Jakes, R., Goedert, M., and Crowther, R. A. Fiber diffraction of synthetic alpha-synuclein filaments shows amyloid-like cross-beta conformation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 4897-4902 (2000).
- Serpell, L. C., Sunde, M., Fraser, P. E., Luther, P. K., Morris, E. P., Sangren, O., Lundgren, E., and Blake, C. C. Examination of the structure of the transthyretin amyloid fibril by image reconstruction from electron micrographs. *J.Mol.Biol.* **254**, 113-118 (1995).
- Simmons, A. H., Michal, C. A., and Jelinski, L. W. Molecular orientation and two-component nature of the crystalline fraction of spider dragline silk. *Science* **271**, 84-87 (1996).

- Smith, J. J., Rucknagel, K. P., Schierhorn, A., Tang, J., Nemeth, A., Linder, M., Herschman, H. R., and Wahle, E. Unusual sites of arginine methylation in Poly(A)-binding protein II and in vitro methylation by protein arginine methyltransferases PRMT1 and PRMT3. *J.Biol.Chem.* **274**, 13229-13234 (1999).
- Souillac, P. O., Uversky, V. N., Millett, I. S., Khurana, R., Doniach, S., and Fink, A. L. Effect of association state and conformational stability on the kinetics of immunoglobulin light chain amyloid fibril formation at physiological pH. *J.Biol.Chem.* **277**, 12657-12665 (2002).
- Srisailam, S., Wang, H. M., Kumar, T. K., Rajalingam, D., Sivaraja, V., Sheu, H. S., Chang, Y. C., and Yu, C. Amyloid-like fibril formation in an all beta-barrel protein involves the formation of partially structured intermediate(s). *J.Biol.Chem.* **277**, 19027-19036 (2002).
- Stromme, P., Mangelsdorf, M. E., Shaw, M. A., Lower, K. M., Lewis, S. M., Bruyere, H., Lutchera, V., Gedeon, A. K., Wallace, R. H., Scheffer, I. E., Turner, G., Partington, M., Frints, S. G., Fryns, J. P., Sutherland, G. R., Mulley, J. C., and Gecz, J. Mutations in the human ortholog of Aristaless cause X-linked mental retardation and epilepsy. *Nat.Genet.* **30**, 441-445 (2002).
- Sunde, M. and Blake, C. C. From the globular to the fibrous state: protein structure and structural conversion in amyloid formation. *Q.Rev.Biophys.* **31**, 1-39 (1998).
- Sunde, M., Serpell, L. C., Bartlam, M., Fraser, P. E., Pepys, M. B., and Blake, C. C. Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J.Mol.Biol.* **273**, 729-739 (1997).
- Takase, K., Nitta, K., and Sugai, S. Thermodynamics of the unfolding of alpha-lactalbumin by guanidine thiocyanate. *Biochim.Biophys.Acta* **371**, 352-359 (1974).
- Tome, F. M. and Fardeau, M. Nuclear inclusions in oculopharyngeal dystrophy. *Acta Neuropathol.(Berl)* **49**, 85-87 (1980).
- Tome, F. M. and Fardeau, M. Oculopharyngeal muscular dystrophy. In: *Myology*. (eds Engel, A.G. & Franzini-Amstrong, C.) pp1233-1245 Mc-Graw-Hill, N.Y.(1994).
- Utsch, B., Becker, K., Brock, D., Lentze, M. J., Bidlingmaier, F., and Ludwig, M. A novel stable polyalanine [poly(A)] expansion in the HOXA13 gene associated with hand-foot-genital syndrome: proper function of poly(A)-harbouring transcription factors depends on a critical repeat length? *Hum.Genet.* **110**, 488-494 (2002).
- Wahle, E. A novel poly(A)-binding protein acts as a specificity factor in the second phase of messenger RNA polyadenylation. *Cell* **66**, 759-768 (1991).
- Wahle, E., Lustig, A., Jeno, P., and Maurer, P. Mammalian poly(A)-binding protein II. Physical properties and binding to polynucleotides. *J.Biol.Chem.* **268**, 2937-2945 (1993).

- Wahle, E. and Ruegsegger, U. 3'-End processing of pre-mRNA in eukaryotes. *FEMS Microbiol.Rev.* **23**, 277-295 (1999).
- Waldmann, L. Spektroskopische Charakterisierung von Proteinen. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. (1998).
- Warren, S. T. Polyalanine expansion in synpolydactyly might result from unequal crossing-over of HOXD13. *Science* **275**, 408-409 (1997).
- Wells, R. D. Molecular basis of genetic instability of triplet repeats. *J.Biol.Chem.* **271**, 2875-2878 (1996).
- Wood, S. J., Wypych, J., Steavenson, S., Louis, J. C., Citron, M., and Biere, A. L. alpha-synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J.Biol.Chem.* **274**, 19509-19512 (1999).
- Yang, J., Spek, E. J., Gong, Y., Zhou, H., and Kallenbach, N. R. The role of context on alpha-helix stabilization: host-guest analysis in a mixed background peptide model. *Protein Sci.* **6**, 1264-1272 (1997).
- Zerovnik, E., Pompe-Novak, M., Skarabot, M., Ravnikar, M., Musevic, I., and Turk, V. Human stefin B readily forms amyloid fibrils in vitro. *Biochim.Biophys.Acta* **1594**, 1-5 (2002).

Anhang

Tab. A: Bestimme Molekularmassen der gereinigten Proteine bzw. Proteindomänen mittels Massenspektrometrie

Protein bzw. Proteindomäne	Methode	gemessene Masse [Da]	theoretische Masse		Abweichung [%]
			mit	ohne Startmeth	
N-WT	ESI	14192.1	14320.2	14189.2	0.02
RNP	ESI	11381.4	11510.9	11380.9	< 0.01
α -RNP	MALDI	15576.7	15576.6	15445.6	< 0.01
		15443.1			0.02
PABPN1-(+7)Ala	MALDI	33135,8	33132,6	33263.6	< 0.01
N-(+7)Ala	ESI	14686.6	14817.8	14686.8	< 0.01
N- Δ Ala	MALDI	13348.1	13481.3	13350.3	0.02

Lebenslauf

Zur Person

Name	Till Scheuermann
Geburtsdatum	12. April 1972
Geburtsort	Freiburg im Breisgau
Familienstand	ledig

Schule

9/78 – 6/82	Besuch der Hansjakob-Grundschule in Titisee-Neustadt.
9/82 – 7/88	Besuch des Kreisgymnasiums in Titisee–Neustadt.
8/88 – 7/89	Besuch der High School in Medford, Oregon, USA.
8/89-5/92	Besuch des Kreisgymnasiums in Titisee–Neustadt.
5/92	Abitur

Zivildienst

6/92 – 8/93	Arbeiterwohlfahrt, Titisee–Neustadt.
-------------	--------------------------------------

Studium

10/93 – 10/98	Studium der Chemie an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg. Diplomarbeit am Institut für organische Chemie und Biochemie bei Prof. Dr. G. E. Schulz.
10/98	Abschluß des Studiums als Diplom Chemiker
10/98 – 12/98	Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für organische Chemie und Biochemie bei Prof. Dr. G. E. Schulz.

Promotion

seit 12/98	Promotion an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg am Institut für Biotechnologie bei Prof. Dr. R. Rudolph.
------------	--

Publikationen

C. Mueller-Dieckmann, T. Scheuermann, K. Wursthorn, J. Schröder, F. Haag, G. E. Schulz and F. Koch-Nolte (2002) Expression, purification and preliminary X-ray analysis of rat ecto-ribosyltransferase 2 (ART2.2). *Acta Cryst.* D58, 1211-1213.

T. Scheuermann, W. Hübner, B. Schulz, E. Wahle, R. Rudolph and E. Schwarz. Trinucleotide expansions leading to an extended poly-L-alanine segment in the poly(A) binding protein PABPN1 cause fibril formation.(Manuskript eingereicht).

Y. Kerwitz, U. Kühn, T. Scheuermann, H. Lilie, E. Schwarz, E. Wahle. Stimulation of poly(A) polymerase through direct interaction with the nuclear poly(A) binding protein. (Manuskript eingereicht).

Präsentationen

- | | |
|--------|---|
| 2/2002 | 46 th Annual Meeting of the Biophysical Society in San Francisco.
Poster Präsentation. |
| 4/2002 | 15. Faltertage: "Self-Organization & Structure-Function Relation of Biomolecules" in Wittenberg. Vortrag. |
| 5/2002 | International Workshop on Structural Genomics and Protein-Ligand-Interaction in Koblenz. Vortrag. |

Till Scheuermann

Eidesstattliche Erklärung

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

Till Scheuermann

Halle, Juni 2003

Danksagung

Hiermit möchte ich allen herzlich danken, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben.

Herrn Prof. Rainer Rudolph danke ich für die Überlassung des spannenden Themas, sein großes Interesse und seinen unerschöpflichen Ideenreichtum. Frau Elisabeth Schwarz möchte ich für die Betreuung und das Interesse am Fortgang dieser Arbeit danken. Für die gute Zusammenarbeit und die Diskussionen möchte ich mich bei Herrn Prof. Wahle, Barbe Schulz und Uwe Kühn bedanken, die mir auch die Gene von PABPN1 zur Verfügung stellten. Die unermüdliche Diskussionsbereitschaft und die vielen Tips von Hauke Lilie halfen mir bei der Lösung vieler Problemstellungen. Vielen Dank Hauke.

Herrn Gerd Hause möchte ich recht herzlich für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen danken. Peter Rücknagel danke ich für die Proteinsequenzierung und Angelika Schierhorn für die Durchführung der Massenspektrometrie. Bei Gudrun Wildegger möchte ich für die Unterstützungen bei der Färbung der Fibrillen mit Kongorot bedanken. Herrn Wiegand Hübner und Frau Schaller danke ich herzlich für die Hilfe bei den FT-IR-Messungen. Danken möchte ich auch Herrn Gerd Hause für die Unterstützung bei der Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Großer Dank gilt auch den Kristallographen Prof. Milton Stubbs und Michael Claus für ihre Unterstützung bei den röntgenographischen Untersuchungen.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Biotechnologie möchte ich mich für das gute Arbeitsklima und die vielen gegenseitigen Hilfen bedanken.

Ganz besonderst möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken auf deren Hilfe und Unterstützung ich in allen Lebenslagen vertrauen konnte.