Einfluss der Polypeptidumgebung auf die Fibrillenbildung eines amyloidogenen Peptides

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Anja Buttstedt

geb. am 06.01.1983 in Sebnitz

Gutachter:

- 1. Prof. Dr. E. Schwarz
- 2. PD Dr. R. Golbik
- 3. Prof. Dr. F. X. Schmid

Promotionsgesuch eingereicht am:07.06.2011Tag der öffentlichen Verteidigung:09.11.2011

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Zum Begriff "amyloid"	1
1.2 Proteinmissfaltungen	1
1.3 Amyloide fibrilläre Strukturen.	3
1.3.1 Entstehung amyloider Strukturen	3
1.3.2 Eigenschaften und Struktur amyloider Fibrillen	5
1.3.3 Funktionelle amyloide Strukturen	9
1.3.4 Fibrillierung <i>in vitro</i> und artifizielle Fibrillen	10
1.4 Poly-alanin-abhängige Proteinmissfaltungen	11
1.4.1 Untersuchungen zur poly-alanin-induzierten Fibrillenbildung am Beisp	iel
des Modellproteins CspB (Cold shock protein B)	15
1.5 Zielstellung der Arbeit	18
2 Materialien und Methoden	20
2.1 Materialien	20
2.1.1 Chemikalien	20
2.1.2 Standards und <i>Kits</i>	20
2.1.3 Antibiotika und Enzyme	20
2.1.4 Säulen und Säulenmaterialien	20
2.1.5 <i>E. coli</i> - Stämme	20
2.1.6 Plasmide und Primer	21
2.1.7 Sonstige Materialien	21
2.1.8 Geräte	22
2.2 Methoden	22
2.2.1 Ortsspezifische Mutagenese.	22
2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA	24
2.2.3 Anzucht von <i>E. coli</i> - Stämmen	24
2.2.4 Proteinreinigung	24
2.2.4.1 Reinigung der CspB-Fusionsproteine	24
2.2.4.2 Abspaltung des His-Tags	25
2.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	26
2.2.6 Konzentrationsbestimmung von Protein- und Nukleinsäurelösungen	
mittels UV-Absorption	26
2.2.7 Fluoreszenzspektroskopie	27
2.2.7.1 Intrinsische Fluoreszenz.	27
2.2.7.2 Aktivitätsmessungen	27
2.2.8 Circulardichroismus	28
2.2.9 Entfaltungs- und Rückfaltungsübergänge	29
2.2.9.1 Chemisch induzierte Entfaltungs- und Rückfaltungsübergänge	
2.2.9.2 Thermisch induzierte Entfaltungs- und Rückfaltungsübergänge	
2.2.9.3 Stabilitätsmessungen mittels <i>stopped-flow</i> -Fluoreszenz	

2.2.10 Fibrillierung und Fibrillencharakterisierung	32
2.2.10.1 Fibrillierungsansätze	32
2.2.10.2 Präparation von <i>Seeds</i>	32
2.2.10.3 Detektion amyloider Fibrillen durch ANS- und ThT-Fluoreszenzmessungen	33
2.2.10.4 Elektronenmikroskopie	33
2.2.10.5 Präparation der Fibrillen für weitere Untersuchungen	33
2.2.10.6 Konzentrationsbestimmung von Fibrillenlösungen mittels Tryptophan-	
Fluoreszenz	34
2.2.10.7 Chemische Stabilität der Fibrillen	34
2.2.10.8 Proteolyse.	35
2.2.10.9 Reversed phase - HPLC	35
2.2.11 Massenspektrometrie	36
2.2.12 Röntgenbeugung	36
3 Ergebnisse	37
3.1 Charakterisierung der löslichen Fusionsproteine mit einem Linker von drei und	
16 Aminosäuren.	37
3.1.1 Reinigung der Fusionskonstrukte	37
3.1.2 Nachweis von nativem CspB und MCspB in den monomeren Fusions-	
proteinen	39
3.1.3 Bestätigung einer erhöhten thermodynamischen Stabilität von Fusionen	
mit MCspB	43
3.2 Charakterisierung der löslichen Fusionsproteine aus N-terminalen Domänen	
mit MCspB	47
3.2.1 Reinigung der Fusionskonstrukte	47
3.2.2 Nachweis von nativem MCspB in den Fusionen mit den N-terminalen	
Domänen	48
3.2.3 Reduzierte thermodynamische Stabilität von MCspB in den Fusionen	
mit den N-terminalen Domänen von PABPN1	51
3.3 Fibrillenbildung der Fusionsproteine mit L3/16-Linker	52
3.3.1 Analyse der Fibrillenbildung von Fusionen mit CspB	53
3.3.2 Fibrillierung der Fusionen mit CspB nach Zugabe von Seeds	56
3.3.3 Charakterisierung der fibrillären Strukturen von Fusionen mit CspB	58
3.3.3.1 Faltungszustand von CspB in den Fibrillen	58
3.3.3.2 Proteolysegeschützter Bereich der Fibrillen	59
3.3.3.3 Röntgenbeugung von Fibrillen aus 17Ala-L16-CspB	63
3.3.3.4 Stabilität der Fibrillen gegenüber chemischen Denaturierungsmitteln	64
3.3.4 MCspB in den L3- und L16-Varianten verhindert die Fibrillenbildung der	
Fusionsproteine	65
3.3.4.1 MCspB verhindert die Fibrillierung auch in Anwesenheit von Seeds	67
3.4 Fibrillenbildung der Fusionen aus den N-terminalen Domänen von PABPN1	
und MCspB	67
3.4.1 Fusionen der N-terminalen Domänen mit MCspB bilden Fibrillen	68
3.4.2 Nachweis von nativem MCspB in den Fibrillen aus 17Ala-N-MCspB	70

3.5 Der Einfluss von Schütteln auf die Fibrillenbildung	71
3.5.1 Verkürzte <i>lag</i> -Phase der Fibrillierung von Fusionen mit CspB	71
3.5.2 Charakterisierung der Fibrillen von Fusionen mit CspB	74
3.5.2.1 Entfaltetes CspB in den Fibrillen	74
3.5.2.2 Proteolysegeschützter Bereich von Typ II - Fibrillen	75
3.5.2.3 Röntgenbeugung von Typ II - Fibrillen aus 17Ala-L16-CspB3.5.2.4 Vergleichbare Stabilität der Typ I - und Typ II - Fibrillen gegenüber chemisch	77 len
Denaturierungsmitteln	78
3.5.3 Fibrillierung von Fusionen mit MCspB	80
3.5.3.1 Entfaltetes Protein in Typ II – Fibrillen mit MCspB	81
3.5.3.2 Die Stabilität der Typ II - Fibrillen gegenüber chemischen Denaturierungs-	
mitteln bleibt von der Mutation A46K/S48R unbeeinflusst	82
3.6 Einfluss des His-Tags auf die Fusionsproteine	83
3.6.1 Faltung und Stabilität von CspB in den monomeren Fusionsproteinen	
nach Abspaltung des His-Tags	84
3.6.2 Die <i>lag</i> -Phase der Fibrillenbildung bleibt unverändert	86
4 Diskussion	88
4.1 Poly-alanin-abhängige Fibrillierung der Linkerfusionen	88
4.1.1 Betrachtungen zur <i>lag</i> -Phase der Fibrillierung	89
4.1.2 Strukturelle Eigenschaften der Fibrillen	91
4.1.3 Der Faltungszustand von CspB und die Fibrillenkernstruktur	92
4.1.4 Einfluss einer stabilisierenden Mutation in CspB auf die poly-alanin-	
induzierte Fibrillenbildung	95
4.2 Aktives Protein in amyloiden Fibrillen	96
4.3 Fibrillierung unter dem Einfluss von Schütteln	97
5 Zusammenfassung	101
6 Abkürzungen	103
6.1 Allgomaina Abkürzungen	102
6.2 Abkürzungen für Fusionsproteine	103
7 Literaturverzeichnis	105
8 Anhang	117

1 Einleitung

1.1 Zum Begriff "amyloid"

Der Begriff "amyloid" (stärke-ähnlich) wurde erstmalig 1839 von dem deutschen Botaniker Matthias Schleiden genutzt. Er beschrieb damit Hemizellulose in Pflanzenstängeln, die sich mit Jod anfärben ließ (Vogel & Schleiden, 1839). Rudolph Virchow übertrug den Begriff 1854 in die Medizin als er während einer Autopsie im Gehirn eine Substanz fand, die er ebenfalls mit Jod anfärben konnte. Er bezeichnete diese Substanz als Zellulose-Körperchen und stellte bereits damals fest, dass die Zellulose-Körperchen nur im erwachsenen Gehirn zu finden waren und damit möglicherweise eine pathologische Bedeutung haben (Virchow, 1854). Nur fünf Jahre später zeigten Friedreich und Kekulé, dass es sich bei der mit Jod anfärbbaren Substanz keinesfalls um Zellulose handelte, sondern um Protein (Friedreich & Kekulé, 1859).

Erst 100 Jahre danach wurde schließlich der Beweis erbracht, dass die amyloide Substanz fibrilläre Strukturen darstellt (Cohen & Calkins, 1959). Bis zu diesem Zeitpunkt waren amyloide Ablagerungen nur im Zusammenhang mit pathologischen Befunden im Extrazellulärraum bekannt. Deshalb handelt es sich gemäß der ursprünglichen Definition bei amyloiden Fibrillen um extrazelluläre Proteinablagerungen (siehe *Review* Westermark *et al.*, 2005). In den darauffolgenden Jahren wurden jedoch immer mehr Proteine entdeckt, die entweder *in vivo* in intrazellulären, fibrillären Ablagerungen enthalten waren oder *in vitro* fibrillierten (Kirschner *et al.*, 1987; Zucker-Franklin & Franklin, 1970). Diese Fibrillen wurden als "amyloid-artig" bezeichnet.

Mit der später gewonnenen Erkenntnis, dass amyloide Fibrillen prinzipiell einen vergleichbaren molekularen Aufbau besitzen, die *Cross*-β-Struktur (siehe S. 5ff, 1.3.2) (Eanes & Glenner, 1968; Geddes *et al.*, 1968), wird mittlerweile der Begriff "amyloid" nicht mehr nur für extrazelluläre, fibrilläre Strukturen verwendet, sondern für alle Fibrillen, die diese *Cross*-β-Struktur aufweisen. "Amyloid" bezeichnet demnach eher einen strukturellen Zustand mit charakteristischen Eigenschaften (siehe *Review* Fändrich, 2007). Zur Vereinfachung wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit nicht zwischen den Bezeichnungen "amyloid" und "amyloid-artig" unterschieden.

1.2 Proteinmissfaltungen

Die native, dreidimensionale Struktur eines Proteins ist die determinierende Eigenschaft für seine Funktion. Diese dreidimensionale Struktur wird unter anderem beeinflusst die Gesamtheit der Wechselwirkungen durch interatomaren wie Wasserstoffbrücken, ionischen und hydrophoben Wechselwirkungen sowie kovalenten Bindungen wie Disulfidbrücken. Wie die Arbeitsgruppe um Christian Anfinsen bereits 1963 feststellte, wird die native Struktur durch die primäre Aminosäuresequenz bestimmt. Diese beeinflusst, welche Interaktionen zwischen den Aminosäureseitenketten untereinander und mit dem Peptidrückgrat ausgebildet werden können (Epstein et al., 1963). Anfinsen postulierte, dass die dreidimensionale Struktur eines nativen Proteins in dessen physiologischen Milieu diejenige Struktur ist, in der die freie Energie des Systems am geringsten ist (Anfinsen, 1973).

Trotz fast 50 Jahre langer intensiver Forschung ist die Proteinfaltung, insbesondere von größeren Proteinen, ein bis heute kaum verstandener Prozess. So kann es in Abhängigkeit von äußeren Faktoren neben der nativen Struktur zu alternativen Konformationen oder auch Missfaltungen von Proteinen kommen (siehe *Review* Dobson, 2004). Was genau beeinflusst aber nun die Missfaltung und Aggregation eines Proteins? Die beiden wichtigsten Faktoren sind sowohl die Hydrophobizität als auch die Gesamtladung der Polypeptidkette. Je höher die Hydrophobizität exponierter Bereiche und je niedriger die Gesamtladung eines Proteins ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit zur Aggregatbildung (Calamai *et al.*, 2003).

In mit dem vermehrten Auftreten aggregierter vivo gehen Proteine Proteinmissfaltungs-Krankheiten einher (siehe Review Herczenik & Gebbink, 2008). Dabei kommt es häufig zur Bildung von amyloiden, fibrillären Strukturen, die bestimmte Proteinmissfaltungs-Krankheiten, sogenannte Amyloidosen, hervorrufen. Hierzu gehören unter anderem neurodegenerative Krankheiten wie z.B. die Alzheimersche und Parkinsonsche Krankheit sowie systemische Amyloidosen wie die Dialyse-assozierte Amyloidose (siehe Reviews Chiti & Dobson, 2006; Sideras & Gertz, 2009). Obwohl die mit den Krankheiten assoziierten löslichen Proteine keine Ähnlichkeit hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz und ihrer Struktur aufweisen, besitzen die daraus gebildeten amyloiden Fibrillen strukturelle Gemeinsamkeiten (siehe S. 5ff, 1.3.2) (siehe Review Jahn & Radford, 2005). Diese Tatsache deutet darauf hin, dass, im Kontrast zur nativen Proteinfaltung, die Bildung amyloider Fibrillen hauptsächlich auf Interaktionen des Polypeptid-Rückgrates, weitgehend unabhängig von den Aminosäureseitenketten, beruht (Fändrich & Dobson, 2002). Daher könnte die Aufklärung des Entstehungsmechanismus amyloider Strukturen für ein Protein wichtige Erkenntnisse darüber liefern wie andere Proteine amyloide Fibrillen bilden (siehe Review Jahn & Radford, 2005).

1.3 Amyloide fibrilläre Strukturen

1.3.1 Entstehung amyloider Strukturen

Zur Beschreibung der Entstehung amyloider Fibrillen muss zunächst unterschieden werden, ob es sich um gefaltete oder sogenannte nativ entfaltete¹ Proteine als Ausgangsspezies handelt. Im Fall der gefalteten Proteine können nur dann Fibrillen gebildet werden, wenn der native Zustand des Proteins destabilisiert ist und ein erhöhter Anteil an zumindest partiell entfalteten Konformationen entsteht (siehe Reviews Chiti & Dobson, 2006; Uversky & Fink, 2004). Für einige Proteine wie z.B. Transthyretin ist der Grad der partiellen Entfaltung, der für die Fibrillierung ausreicht, sehr gering (Lai et al., 1996). Bei anderen Proteinen wiederum, wie für α-Lactalbumin gezeigt, ist ein hoher Entfaltungsgrad Voraussetzung für die Initiation der Fibrillenbildung (Goers *et al.*, 2002). Die Notwendigkeit der zumindest partiellen Entfaltung wird dadurch erklärt, dass die Konformationsänderung von Proteinen aus der nativen in die Cross-B-Struktur aufgrund der Tertiärstruktur sonst nicht möglich wäre (siehe Review Uversky & Fink, 2004). In vitro wird die Destabilisierung des nativen Zustands meist durch niedrige pH-Werte, hohe Temperaturen, Aminosäureaustausche oder Zugabe von Denaturierungsmitteln erreicht (siehe Review Jahn & Radford, 2005). In vivo führen oft destabilisierende Punktmutationen wie im Fall von Lysozym und Transthyretin zur Fibrillierung der betroffenen Proteine (Booth et al., 1997; Hammarström et al., 2002).

Für einige nativ entfaltete Proteine konnte mittlerweile gezeigt werden, dass partielle Strukturbildung den ersten Schritt bei der Fibrillierung darstellt (siehe *Reviews* Kumar & Udgaonkar, 2010; Uversky, 2008). Am besten untersucht ist dieser Prozess am Beispiel von α -Synuclein, dessen Protonierung zu einer partiellen Faltung und kompakteren Konformation mit einem signifikanten Anteil an Sekundärstrukturen führt (Uversky *et al.*, 2001). Die daraufhin aufgestellte Hypothese, dass eine partiell gefaltete Konformation eine entscheidende Voraussetzung für die Fibrillierung darstellt, wird dadurch gestützt, dass bei einer wachsenden Anzahl nativ entfalteter Proteine partiell gefaltete Spezies gefunden wurden, die kritisch für die Fibrillenbildung waren (z.B. bei A β_{1-40} , Amylin, Tau, Prothymosin α) (Chirita *et al.*, 2005; Pavlov *et al.*, 2002; Rubinstein *et al.*, 2009; Soong *et al.*, 2009).

3

¹ Als nativ entfaltete (*natively unfolded*) Proteine werden Proteine bezeichnet, für die experimentell gezeigt wurde, dass sie in gereinigter Form und bei neutralem pH keine geordnete Struktur besitzen. In der Literatur sind auch die Bezeichnungen intrinsich unstrukturiert (*intrinsically unstructured*) oder ungeordnet (*disordered*) geläufig. Ein ungeordnetes Protein besitzt keine spezifische Tertiärstruktur und besteht aus einer Vielzahl von Konformationen, normalerweise mit dynamischen φ und ψ Torsionswinkeln des Proteinrückgrates. Obwohl diesen Proteinen eine geordnete Struktur fehlt, sind sie funktionell. Meist interagieren nativ entfaltete Proteine mit einem Liganden und erfahren dadurch eine Strukturveränderung zu einer gefalteten Form (Fink, 2005).

Während der Initiation der Fibrillierung bilden sich zunächst lösliche, oligomere Spezies mit geringem Molekulargewicht (Abb. 1.1), die im Fall von A β aus zwei bis sechs Monomeren und im Fall einer Phosphoglyceratkinase aus bis zu zehn Monomeren bestehen (Bitan *et al.*, 2001, 2003; Modler *et al.*, 2003). Wenn eine kritische Masse erreicht ist, kommt es zur Nukleation der Fibrillierung. Es wurde von mehreren Arbeitsgruppen beobachtet, dass bei der Nukleation die Oligomere assoziieren und häufig kurze Protofibrillen bilden, bei denen es sich um oligomere Spezies mit höherem Molekulargewicht handelt (Abb. 1.1) (Modler *et al.*, 2003; siehe *Review* Chiti & Dobson, 2006). Der Prozess bis zur Nukleation stellt die *lag*-Phase dar (Naiki *et al.*, 1997).



Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Hypothese zur Entstehung amyloider Fibrillen. Die Umwandlung von Proteinen in amyloide Fibrillen geschieht über partiell strukturierte Konformationen des jeweiligen Proteins und protofibrilläre Oligomere (modifiziert nach Kumar & Udgaonkar, 2010).

Protofibrillen wurden mittlerweile für die Fibrillierung einer ganzen Reihe von amyloidogenen Proteinen wie α -Synuclein, Amylin, Transthyretin und Poly-Glutaminenthaltenden Proteinen beschrieben und vor allem bei der Fibrillierung von A β ausgiebig untersucht (Conway *et al.*, 2000; Kayed *et al.*, 2004; Quintas *et al.*, 2001; Walsh *et al.*, 1997). Die kugelförmigen Oligomere können mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie sichtbar gemacht werden und besitzen einen Durchmesser von 2 - 5 nm. Durch Assoziation der Oligomere können ketten- sowie ringförmige Strukturen entstehen (Walsh *et al.*, 1999). Protofibrillen sind generell durch ausgiebige β -Struktur gekennzeichnet und können den fibrillenspezifischen Fluoreszenzfarbstoff Thioflavin T (ThT) binden (siehe *Review* Chiti & Dobson, 2006). Die Erkenntnis, dass ein spezifischer Antikörper protofibrilläre Spezies verschiedener Proteine binden kann, deutet darauf hin, dass bereits amyloide Oligomere einige wichtige gemeinsame strukturelle Elemente besitzen (Kayed *et al.*, 2003). Neuere Studien lassen vermuten, dass diese Oligomere stärker cytotoxisch wirken als die Fibrillen selbst (siehe *Review* Uversky, 2010). Die weitere Umwandlung von Protofibrillen in amyloide Fibrillen kann je nach Protein durch Anlagerung von Monomeren oder weiteren Protofibrillen geschehen. Das Fibrillenwachstum erfolgt ab diesem Zeitpunkt exponentiell und erreicht später ein Plateau (siehe *Review* Chiti & Dobson, 2006).

Obwohl diese Hypothese zur Enstehung von amyloiden Fibrillen für immer mehr Proteine möglich scheint und weitgehend Zustimmung findet, bleibt zu erwähnen, dass es sich bei Beobachtungen während der Fibrillierung häufig nur um Momentaufnahmen handelt. Die Prozesse zwischen den Momentaufnahmen sind kaum erforscht und beruhen meist auf Schlussfolgerungen. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass Proteine, deren Fibrillierungsmechanismus noch nicht untersucht worden ist, unabhängig vom hier beschriebenen Mechanismus fibrillieren.

1.3.2 Eigenschaften und Struktur amyloider Fibrillen

Fibrilläre Strukturen können mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie leicht als lange unverzweigte Filamente mit einem Durchmesser von 6 - 13 nm identifiziert werden (Abb. 1.2 A) (siehe *Reviews* Greenwald & Riek, 2010; Sunde & Blake, 1997).

Die Fibrillen bestehen je nach amyloidogenem Protein meist aus zwei bis sechs Protofilamenten, wobei jedes Protofilament einen Durchmesser von 2 - 5 nm aufweist (Serpell *et al.*, 2000, siehe *Review* Chiti & Dobson, 2006). Es wurden aber z.B. im Fall von Glucagon auch schon Fibrillen beobachtet, die nur aus einem Protofilament bestehen (siehe *Review* Pedersen *et al.*, 2010). Des Weiteren besitzen amyloide Fibrillen eine Affinität zu spezifischen Farbstoffen wie ThT und Kongorot (LeVine, 1993; Missmahl & Hartwig, 1953). Die Bindung von Kongorot erzeugt eine gelb-grüne Lichtdoppelbrechung unter polarisiertem Licht (Abb. 1.2 B). Ferner weisen Fibrillen in der Regel eine außerordentlich hohe Resistenz gegenüber Natriumdodecylsulfat (SDS), Denaturierungsmitteln und proteolytischem Verdau auf (Bagriantsev *et al.*, 2006; Bocharova *et al.*, 2005; Daude *et al.*, 2010; Lodderstedt, 2007; Scheuermann, 2003).

Amyloide Fibrillen besitzen trotz unterschiedlicher nativer Struktur der Proteine als gemeinsames strukturelles Motiv die *Cross*- β -Struktur, in der die β -Stränge im rechten Winkel zur Fibrillenachse orientiert sind und zwei β -Faltblätter erzeugen (Abb. 1.2 C) (Geddes *et al.*, 1968; Sunde *et al.*, 1997). In der *Cross*- β -Struktur sind die durch Wasserstoffbrücken verbundenen, übereinanderliegenden β -Stränge 0.46 - 0.48 nm

voneinander entfernt und der Abstand zwischen den beiden β -Faltblättern beträgt ca. 1.0 nm. Durch diese Abstände wird das für amyloide Fibrillen charakteristische Röntgenbeugungsmuster mit Reflexionen bei 4.6 - 4.8 und ca. 10 Å erzeugt (Abb 1.2 D) (Eanes & Glenner, 1968; Sunde *et al.*, 1997).



Abbildung 1.2: Struktur amyloider Fibrillen. (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme der Fibrillen von Transthyretin. Der Balken entspricht 200 nm. (B) Charakteristische gelb-grüne Doppelbrechung von Fibrillen der leichten Ketten von Immunoglobulin nach Kongorot-Färbung. (C) Schematische Darstellung der *Cross*-β-Struktur. (D) Röntgenbeugungsmuster von fibrillärem Myoglobin. Die Pfeile heben die Reflexion bei 10.11 Å und die Dreiecke die Reflexion bei 4.63 Å hervor (aus Sunde & Blake, 1997(A, B); Herczenik & Gebbink, 2008 (C); Fändrich *et al.*, 2001 (D)).

Eine der wenigen bis jetzt bekannten Ausnahmen von dieser typischen *Cross-* β -Struktur stellen Fibrillen der Prionendomäne des Prionenproteins HET-s dar. Hier wird die Fibrillenkernstruktur als β -Solenoid bezeichnet und ist durch drei β -Stränge definiert, die im rechten Winkel zur Fibrillenachse parallele β -Faltblätter formen (Wasmer *et al.*, 2008).

Aufgrund der beträchtlichen Größe, der geringen Löslichkeit und der nichtkristallinen Natur amyloider Fibrillen ist die Aufklärung ihrer molekularen Struktur schwierig. Seit kurzem tragen neue Methoden wie die Festkörper-NMR-Spektroskopie zum Verstehen der amyloiden Struktur bei (siehe *Reviews* Kumar & Udgaonkar, 2010; Tycko, 2006). Ein sehr gutes Beispiel für die Strukturaufklärung durch Festkörper-NMR-Analysen stellt das Strukturmodell des Protofilaments von A β_{1-40} dar, welches die Arbeitsgruppe um Robert Tycko entwickelte (Abb. 1.3) (Petkova *et al.*, 2002, 2006).



Abbildung 1.3: Strukturmodell für amyloide Fibrillen von A β_{1-40} . Darstellung eines Protofilaments gebildet aus vier β -Faltblättern; parallel und im rechten Winkel zur Fibrillenachse gezeigt (Petkova *et al.*, 2006).

In diesem Modell sind die Aminosäurereste 1 - 9 des A β_{1-40} -Peptids ungeordnet, die Reste 10 - 22 sowie 30 - 40 bilden die beiden β -Stränge der Kernregion der Fibrillen und die Reste 23 - 29 einen Bogen bzw. *Loop* (Abb. 1.3). Die β -Stränge eines A β_{1-40} -Peptids erzeugen zwei separate, parallele β -Faltblätter, die durch ihre Seitenketten und den verbindenden *Loop* in Kontakt kommen und miteinander interagieren (Petkova *et al.*, 2002).

Nicht nur die A β_{1-40} -Protofilament-Struktur wurde in den letzten Jahren durch Festkörper-NMR-Spektroskopie ermittelt. Auch weitere Modelle für Fibrillen von Peptidfragmenten von Transthyretin, Amylin, Calcitonin, α -Synuclein und anderen amyloidogenen Proteinen wurden aufgestellt (Caporini *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010; Naito *et al.*, 2004; Vilar *et al.*, 2008). Dabei konnten sowohl parallele (Transthyretin, Amylin, α -Synuclein) als auch antiparallele (Calcitonin) β -Faltblätter in den Fibrillen identifiziert werden, wobei parallele β -Faltblätter verbreiteter sind (Caporini *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010; Naito *et al.*, 2004; Vilar *et al.*, 2008). Meist werden die aus Festkörper-NMR-Analysen ermittelten Daten mit Daten von anderen experimentellen Techniken wie Infrarot-Spektroskopie, Elektronen-Paramagnetischer Resonanz, Wasserstoff / Deuterium (H/D)-Austausch, Cryo-Elektronenmikroskopie und biochemischen Methoden wie limitierter Proteolyse und chemischem *Cross-linking* abgeglichen (siehe *Review* Tycko, 2006).

Die Arbeitsgruppe um David Eisenberg ermittelte anhand der Röntgenbeugung an Mikrokristallen fibrillen-bildender Segmente von 13 amyloidogenen Proteinen



Abbildung 1.4: Atomare *Cross-* β -Struktur am Beispiel von Mikrokristallen des Peptides GNNQQNY aus dem Hefeprion Sup35p. Jeder β -Strang ist ein Peptidmolekül. Der Pfeil markiert die Fibrillenachse. Kohlenstoffatome sind in grau oder lila, Sauerstoffatome in rot und Stickstoffatome in blau dargestellt (Nelson *et al.*, 2005).

Die Untersuchungen zeigten, dass das *Cross*- β -Motiv des Peptides GNNQQNY aus einem Paar von β -Faltblättern besteht. Jedes β -Faltblatt ist aus übereinanderliegenden, parallelen β -Strängen aufgebaut, die durch Wasserstoffbrücken des Peptidrückgrats und durch Wasserstoffbrückenbindungen übereinander angeordneter Seitenketten assoziiert sind. Die beiden β -Faltblätter sind durch van der Waals-Wechselwirkungen an der Kontaktfläche fest verbunden (Abb. 1.4) (Sawaya *et al.*, 2007). Diese ineinander greifenden β -Faltblätter werden auch *"Steric Zipper"* genannt. Da sich in der Kontaktfläche der untersuchten *Cross*- β -Struktur des GNNQQNY-Peptides keine Wassermoleküle befinden, wird diese Struktur im Speziellen als *"Dry Steric Zipper"* bezeichnet (Sawaya *et al.*, 2007). Aus den weiteren Untersuchungen der Arbeitsgruppe mit anderen amyloidogenen Peptiden wurden insgesamt acht verschiedene Klassen eines *"Dry Steric Zippers"* postuliert. Diese Klassen unterscheiden sich in der Anordnung der β -Stränge im Faltblatt, den sich zwischen den Faltblättern gegenüberliegenden Seitenketten und dem Verlauf der β -Stränge zwischen den beiden Faltblättern (Sawaya *et al.*, 2007).

Trotz der weiterentwickelten Techniken gestaltet sich die Strukturaufklärung von amyloiden Fibrillen als Herausforderung. So können verschiedene Methoden einen unterschiedlichen molekularen Aufbau der untersuchten Fibrillen ergeben. Dies liegt häufig in

8

der unterschiedlichen Sensitivität der Methoden gegenüber unstrukturierten Bereichen in den Fibrillen begründet. Weiterhin spielt auch der Anteil von nicht-fibrillärem Material in der Probe eine Rolle. Daher ist es schwierig durch unterschiedliche Techniken ermittelte Ergebnisse miteinander zu vergleichen (siehe *Review* Tycko, 2006). Darüber hinaus können amyloide Fibrillen eines Proteins einen gewissen Grad an Polymorphismus aufweisen (siehe *Review* Chiti & Dobson, 2006). So können zum Beispiel minimale Änderungen der Pufferbedingungen oder der Proteinkonzentration signifikante Unterschiede in der Molekularstruktur der Fibrillen hervorrufen (Andersen *et al.*, 2010; Fujiwara *et al.*, 2003). Des Weiteren konnten im Fall von A $\beta_{1.40}$ in einer Fibrillierungsprobe Fibrillen mit 12 verschiedenen Morphologien gefunden werden (Meinhardt *et al.*, 2009). Dies bedeutet wiederum, dass es neben dem *Cross*- β -Motiv keine universellen molekularen Strukturmerkmale in amyloiden Fibrillen gibt.

1.3.3 Funktionelle amyloide Strukturen

Obwohl amyloide Strukturen im Zusammenhang mit Krankheiten entdeckt wurden, können einige *in vivo* eine funktionelle Bedeutung einnehmen. In den letzten Jahren wurden immer mehr Proteine beschrieben, die funktionelle Amyloidfibrillen bilden (siehe *Review* Fowler *et al.*, 2007). Sehr gut untersuchte Beispiele hierfür sind die *Curli*-Fasern aus *Escherichia coli* und verschiedenen *Salmonella*-Spezies (Chapmann *et al.*, 2002; Dueholm *et al.*, 2010). Diese Fasern besitzen alle wesentlichen Eigenschaften amyloider Fibrillen und bilden eine extrazelluläre Matrix, die Oberflächenadhesion und Koloniebildung der Bakterien vermittelt. Die primäre strukturelle Komponente der *Curli*-Fasern, CsgA, wird löslich sekretiert und fibrilliert anschließend extrazellulär (siehe *Review* Fowler *et al.*, 2007).

Die Hyphen des filamentösen Bakteriums *Streptomyces coelicolor* sekretieren Proteine der Chaplin-Familie, die ein Netz aus amyloiden Fibrillen an der Grenzfläche zwischen den Hyphen und der Luft bilden. Dadurch wird die Oberflächenspannung an der Grenzfläche reduziert und die Hyphen können in die Luft wachsen. Dieses besondere Wachstum der Hyphen stellt einen wichtigen Schritt für die Sporenbildung dar (Claessen *et al.*, 2003). Ähnlich den Chaplinen bilden auch die von Pilzen sekretierten Hydrophobine amyloide Fibrillen an Phasengrenzflächen und ermöglichen die Bildung von Sporen und Fruchtkörpern (Butko *et al.*, 2001).

Ebenfalls sehr gut untersucht ist die Fibrillierung der Prionen Sup35p und Ure2p aus *Saccharomyces cerevisiae* und HET-s aus *Podospora anserina*. Diese Prionen bilden Fibrillen, die den Organismen eine phänotypische Diversität verschaffen. HET-s verhindert in seiner fibrillären Form die Fusion von Pilzhyphen zu einem Heterokaryon und limitiert dadurch wahrscheinlich die Ausbreitung von viralen Infektionen (Coustou *et al.*, 1997). Bei Sup35p handelt es sich um einen Translations-Terminationsfaktor, dessen zytoplasmatische Fibrillierung zu einem vermehrten Überlesen von Stopp-Codons führt, wodurch ein verändertes Proteom entsteht (Eaglestone *et al.*, 1999; Kawai-Noma *et al.* 2010). Ure2p reguliert durch Repression eines Transkriptionsfaktors den Stickstoffmetabolismus. Die Fibrillierung des Proteins verhindert diese Repression und es erfolgt eine vermehrte Aufnahme des Harnsäureabbauproduktes Allantoat in die Zellen (Taylor *et al.*, 1999; Wickner, 1994).

Funktionelle amyloide Strukturen kommen aber nicht nur in einzelligen Organismen vor. Die Chorion-Proteine von Insekten und Fischen bilden in deren Eischalen amyloide Fibrillen und die Eier sind dadurch vor proteolytischem Verdau und physikalischen Einflüssen geschützt (Iconomidou *et al.*, 2000).

In den letzten Jahren konnte sogar im Menschen eine funktionelle amyloide Struktur nachgewiesen werden. Das Transmembranprotein Pmel17 wird in der Membran von Melanosomen proteolytisch gespalten. Die Spaltung resultiert in einer M α -Untereinheit des Proteins. Diese Untereinheit ist Hauptbestandteil der amyloiden Strukturen in Melanosomen und spielt eine Rolle bei der Polymerisierung von Intermediaten der Melaninsynthese (Fowler *et al.*, 2006).

Diese wenigen Beispiele zeigen, dass die Ablagerung von Proteinen in amyloiden Strukturen *in vivo* eine Vielfalt von diversen biologischen Funktionen zur Folge hat.

1.3.4 Fibrillierung in vitro und artifizielle Fibrillen

Lange Zeit wurde angenommen, dass die Fähigkeit amyloide Strukturen zu bilden auf eine relativ geringe Anzahl von Proteinen limitiert ist. Spätestens seit der Entdeckung, dass viele verschiedene Proteine, die *in vivo* nicht fibrillieren, *in vitro* in der Lage sind Fibrillen zu bilden, kam die Hypothese der amyloiden Struktur als allgemeine Eigenschaft von Polypeptidketten auf (siehe *Review* Dobson, 2004). Bei den ersten *in vitro* hergestellten amyloiden Fibrillen eines Proteins, das *in vivo* nicht fibrillierte, handelte es sich um Fibrillen der SH3-Domäne der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase aus dem Rind (Guijarro *et al.*, 1998). Mittlerweile wurden immer mehr Proteine bzw. Domänen von Proteinen identifiziert, die ausschließlich *in vitro* fibrillieren. Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über einige dieser Proteine. Weiterhin wurde die Fibrillenbildung auch mit kurzen Peptiden und Homopoly-Aminosäuren wie Poly-Threonin, Poly-Lysin, Poly-Glutamat, Poly-Glutamin und PolyAlanin untersucht (Balbirnie *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002; Fändrich & Dobson, 2002; Giri *et al.*, 2007; Shinchuk *et al.*, 2005; Westermark *et al.*, 2009).

Protein	Ursprungsorganismus	Referenz
Barstar	Bacillus amyloliquefaciens	Gast et al., 2003
3-Phosphoglyceratkinase	Saccharomyces cerevisiae	Damaschun et al., 2000
Monellin	Dioscoreophyllum cumminsii (Mondsamengewächs)	Konno <i>et al.</i> , 1999
Apomyoglobin	Homo sapiens sapiens	Fändrich <i>et al.</i> , 2001
Concanavalin A	Canavalia ensiformis (Jackbohne)	Vetri <i>et al.</i> , 2007
Fibroblasten-Wachstumsfaktor 1	Notopthalmus viridescens (Grünlicher Wassermolch)	Srisailam et al., 2002
Acylphosphatase	Homo sapiens sapiens	Chiti et al., 1999
Glucoamylase (Stärkebindedomäne)	Rhizopus oryzae (Schimmelpilz)	Liu <i>et al.</i> , 2008
Co-Chaperon GroES	Escherichia coli	Higurashi <i>et al.</i> , 2005
Cyclin-Kinase Untereinheit 1	Saccharomyces cerevisiae	Bader <i>et al.</i> , 2006
α-Urease	Canavalia ensiformis (Jackbohne)	McDuff et al., 2004

Tabelle 1.1: Beispiele für nur in vitro fibrillenbildende Proteine.

Auch artifizielle Fusionen von amyloidogenen Sequenzen bzw. Domänen mit globulären Proteinen können zur Fibrillierung des gesamten Fusionsproteins führen. Dies wurde z.B. gezeigt für Fusionen der N-terminalen Domäne von Ure2p mit Carbonischer Anhydrase, Gluthation-S-Transferase, Barnase und GFP, weiterhin für Fusionen von Alaninpeptiden mit dem Kälteschockprotein B und für Insertionen amyloidogener Sequenzen in Ribonuclease A (Baxa *et al.*, 2002, 2003; Sackewitz *et al.*, 2008; Teng & Eisenberg, 2009).

1.4 Poly-alanin-abhängige Proteinmissfaltungen

Obwohl wahrscheinlich jedes Protein in Abhängigkeit von den Bedingungen amyloide Fibrillen bilden kann, gibt es bestimmte Aminosäuresequenzen, die als amyloidogen bezeichnet werden. Dies bedeutet, dass ein Protein, welches die Sequenz beinhaltet, eher fibrilliert als dasselbe Protein ohne amyloidogene Sequenz. So können z.B. Verlängerungen von natürlich vorkommenden Poly-Glutaminen (polyQ) bzw. Poly-Alaninen (polyA) amyloidogen sein. Die Verlängerungen der natürlichen Poly-Aminosäure-Sequenzen werden durch Trinukleotidexpansionen in der jeweiligen codierenden DNA verursacht und führen zu verschiedenen neurologischen, neurodegenerativen oder neuromuskulären Erkrankungen (siehe *Reviews* McMurray, 2010; Pearson *et al.*, 2005). Bis heute sind elf verschiedene durch CAG-Expansionen ausgelöste polyQ-Krankheiten bekannt. Hierbei handelt es sich stets um neurodegenerative Krankheiten, deren pathologische Gemeinsamkeit die intranukleäre bzw. zytoplasmatische Akkumulation von fibrillierten polyQ-Proteinen in Neuronen ist. Die *in vitro* erzeugten fibrillären Proteinablagerungen zeigten wesentliche Charakteristika amyloider Fibrillen (siehe *Reviews* Bauer & Nukina, 2009; Shao & Diamond, 2007).

Neben polyQ-Expansionen sind auch polyA-Expansionen die Ursache verschiedener Krankheiten. Obwohl polyA-Sequenzen von mindestens fünf Alaninen in ca. 500 humanen Proteinen vorkommen, sind nur neun Proteine bekannt, bei denen die Expansion der natürlichen polyA-Sequenz zu einem krankheitsassoziierten Phänotyp führt (Lavoie *et al.*, 2003). Acht der insgesamt neun Gene mit GCN-Expansionen codieren für Transkriptionsfaktoren (Tab. 1.2) (siehe *Review* Albrecht & Mundlos, 2005). Im Gegensatz dazu codiert das Gen *PABPN1* für ein nukleäres poly-Adenin-bindendes Protein (Brais *et al.*, 1998).

Erstaunlich ist, dass die natürlichen humanen polyA-Sequenzen mit bis zu 20 Alaninen relativ kurz sind und bereits Expansionen ab einem zusätzlichen Alaninrest krankheitsauslösend sein können. Die längste bekannte Alaninsequenz mit 33 Alaninen weist der Transkriptionsfaktor PHOX2B auf (Trochet *et al.*, 2005). Krankheitsbegleitend sind im Zusammenhang mit polyA-Expansionen häufig Proteinmissfaltung, Aggregation und proteolytischer Abbau, weshalb auch polyA-assoziierte Erkrankungen zu den Proteinmissfaltungs-Krankheiten zählen (Tab. 1.2) (siehe *Review* Albrecht & Mundlos, 2005).

Untersuchungen von polyA-Peptiden *in vitro* zeigten, dass die löslichen Peptide abhängig von der Anzahl der Alanine α -helikale Strukturen ausbilden (Miller *et al.*, 2002). Die Tendenz der Poly-Alanine sich gegenüber einem wässrigen Lösungsmittel abzuschirmen führt zur Ausbildung von makromolekularen β -Faltblattstrukturen, die extrem stabil gegenüber pH-, Temperatur- und Denaturierungsmittel-induzierter Entfaltung sind (Forood *et al.*, 1995; Pérez-Payá *et al.*, 1996). Später wurde gezeigt, dass diese makromolekularen Strukturen eine *Cross*- β -Struktur aufweisen, welche für amyloide Fibrillen charakteristisch ist. Die Bildung der Alanin-Fibrillen ist neben der Anzahl der Alanine von experimentellen Bedingungen wie Konzentration, Temperatur und Inkubationszeit abhängig (Blondelle *et al.*, 1997; Scheuermann *et al.*, 2003; Shinchuk *et al.*, 2005).

12

12

Protein	Einfluss der Poly-Alanin-Expansion	Referenz
FOXL2	Misslokalisierung des Proteins ins Zytoplasma und Aggregation	Moumné et al., 2008
ZIC2	Verlust der DNA-Bindung und der Transkriptionsaktivierung, normale Lokalisierung des Proteins im Nukleus, keine Aggregatbildung	Brown <i>et al.</i> , 2005
PHOX2B	Verminderung der DNA-Bindung und der Transkriptionsaktivierung, Misslokalisierung des Proteins ins Zytoplasma und Aggregation	Trochet <i>et al.</i> , 2005b
ARX	intranukleäre Fibrillenbildung sowie Misslokalisierung des Proteins ins Zytoplasma und dortige Aggregation	Nasrallah <i>et al.</i> , 2004 Shoubridge <i>et al.</i> , 2007
SOX3	intranukleäre Aggregatbildung sowie Misslokalisierung des Proteins ins Zytoplasma und dortige Aggregation, verminderte Transkriptionsaktivierung	Wong et al., 2007
RUNX2	Misslokalisierung des Proteins ins Zytoplasma und Aggregation	Albrecht et al., 2004
HOXA13	Misslokalisierung des Proteins ins Zytoplasma und Aggregation	Utsch <i>et al.</i> , 2007
HOXD13	Misslokalisierung des Proteins ins Zytoplasma und Aggregation, Abbau des Proteins im Zytoplasma	Albrecht et al., 2004
PABPN1	normale Lokalisierung des Proteins im Nukleus, intranukleäre Aggregatbildung, Abbau des Proteins nach Translation im Zytoplasma, polyA-Sequenz ist nicht essentiell für die Aggregation	Klein <i>et al.</i> , 2008
	Kolokalisierung der Arginin-Methyltransferasen PRMT1 und PRMT3 sowie des Hitzeschockproteins Hsp70 in nukleären Einschlüssen	Tavanez et al., 2009

 Tabelle 1.2: Proteine mit krankheitsauslösender Poly-Alanin-Expansion. Bei allen gezeigten Proteinen handelt es sich um nukleäre Proteine, die mit Ausnahme von PABPN1 Trankriptionsfaktoren darstellen.

Aufgrund der Tatsache, dass polyA-Peptide mit mindestens acht Alaninen in der Lage sind amyloide Fibrillen zu bilden (Shinchuk et al., 2005) und krankheitsbegleitende polyA-Expansionen zur Aggregation der betroffenen Proteine führen, liegt die Vermutung nahe, dass eventuell auch in vivo Alanin-Expansionen Fibrillierungen auslösen. Allgemein ist aber über die Grundlagen der durch polyA-Expansionen ausgelösten Krankheiten wenig bekannt und auch die Funktion der natürlichen polyA-Sequenzen ist weitgehend ungeklärt. Oft führen die Expansionen der polyA-Sequenzen zu einer teilweisen bis vollständigen Misslokalisierung der nukleären Proteine ins Zytoplasma und zu intranukleären bzw. zytoplasmatischen Aggregaten. Bei einigen Transkriptionsfaktoren vermindert die Expansion die DNA-Bindung der Proteine und die Transkriptionsaktivierung (Tab. 1.2). Demnach haben Alanin-Repeats Kernimport vielleicht eine Funktion bei dem der Proteine oder bei der Transkriptionsregulation. Dies vermutet auch die Gruppe von Stefan Mundlos, die in einer genomumfassenden Suche entdeckte, dass 77 % aller Proteine mit einer polyA-Sequenz von mindestens acht Alaninen im Nukleus lokalisiert sind (Albrecht et al. 2004).

Am besten untersucht ist die Poly-Alanin-Expansion im Fall des nukleären poly-Adenin-bindenden Proteins PABPN1. Kurze Expansionen der zehn Alanine umfassenden, natürlichen N-terminalen polyA-Sequenz auf maximal 17 Alanine führen zu Okulopharyngealer Muskeldystrophie (OPMD), einer progressiven, spät einsetzenden Erkrankung mit einhergehender Muskelschwäche (Brais *et al.*, 1998). Als charakteristisches Merkmal der Krankheit wurden intranukleäre, fibrilläre Ablagerungen in Muskelfasern nachgewiesen (Tomé & Fardeau, 1980). Später konnte gezeigt werden, dass diese Ablagerungen das poly-Adenin-bindende Protein PABPN1 enthalten (Uyama *et al.*, 2000).

Wildtyp-PABPN1 ist ein Multidomänen-Protein von 306 Aminosäuren. Die Nterminale glutamatreiche Domäne wird durch eine kurze α-helikale- und eine RNA-Binde-Domäne von der argininreichen C-terminalen Domäne getrennt (Nemeth *et al.*, 1995; siehe *Review* Kühn & Wahle, 2004). Das Protein bindet spezifisch an poly-Adenine und ist an der post-transkriptionellen poly-Adenylierung der prä-mRNA beteiligt (Wahle, 1991). *In vitro*-Analysen zur Fibrillierung der N-terminalen Domäne von PABPN1 zeigten, dass sich in Abhängigkeit von der Anwesenheit der Poly-Alanin-Sequenz extrem stabile, fibrilläre Strukturen bilden (Scheuermann *et al.*, 2003, Lodderstedt *et al.*, 2007). Erste *in vitro*-Untersuchungen zum Fibrillierungsverhalten des Voll-Längen-Proteins deuteten allerdings darauf hin, dass PABPN1 im Gegensatz zur isolierten N-terminalen Domäne unabhängig von der Poly-Alanin-Sequenz fibrilliert (Hempel, 2011; Winter *et al.*, *Manuskript in Vorbereitung*). Weiterhin scheint der Fibrillierungsmechanismus des Voll-Längen-Proteins von dem der N-terminalen Domäne abzuweichen, da sich Fibrillen des Voll-Längen-Proteins hinsichtlich Morphologie und Stabilität stark von den Fibrillen der N-terminalen Domäne unterscheiden (Hempel, 2011; Winter *et al.*, 2011; Winter *et al.*, 2011; Winter *et al.*, 2011-Längen-Proteins

Auch die *in vivo*-Daten zur Ablagerung von PABPN1 lassen widersprüchliche Interpretationen zu. Einige Daten deuteten darauf hin, dass die Verlängerung der Poly-Alanin-Sequenz um sieben Alanine zur intranukleären Aggregation des Proteins und zum vermehrten Zelltod führt (Fan *et al.*, 2001; Konopka *et al.*, 2011; Shanmugam *et al.*, 2000). Andere Studien räumten ein, dass bei erhöhtem Expressionsniveau auch WT-PABPN1 mit zehn Alaninen in der Lage ist intranukleäre Aggregate zu bilden (Bao *et al.*, 2002). Diese Untersuchungen zur *in vivo*-Ablagerung von PABPN1 erfolgten aber stets als Fusion mit GFP. Untersuchungen zur Aggregation von nicht mit GFP fusioniertem PABPN1 zeigten wiederum, dass die Aggregation im Nukleus von der Poly-Alanin-Sequenz unabhängig ist (Klein *et al.*, 2008). Eventuell erfolgt die Ablagerung nicht als Folge der verlängerten Poly-Alanin-Sequenz, sondern aufgrund von zwei in der C-terminalen Domäne gelegenen Oligomerisierungsdomänen, deren Deletion die Aggregation des Proteins verhindert (Fan *et al.*, 2001).

1.4.1 Untersuchungen zur poly-alanin-induzierten Fibrillenbildung am Beispiel des Modellproteins CspB (*Cold shock protein* B)

Wie bereits im vorigen Abschnitt erwähnt, können die publizierten *in vivo*-Ergebnisse zur poly-alanin-abhängigen Fibrillenbildung von PABPN1 unterschiedlich interpretiert werden. Aus diesem Grund wurde in unserer Arbeitsgruppe ein *in vitro*-Modellsystem für die poly-alanin-induzierte Fibrillierung entwickelt. Da von PABPN1 weder die Struktur des gesamten Proteins noch thermodynamische Parameter zur Faltung des Proteins bekannt sind, eignet sich das Voll-Längen-Protein nicht, um die Fibrillierung im Kontext einer stabil gefalteten Domäne zu untersuchen. Daher wurde der Einfluss einer gefalteten Domäne zunächst anhand von Fusionen der N-terminalen Domäne von PABPN1 mit einem gut charakterisierten Modellprotein analysiert (Sackewitz *et al.*, 2008). Als Modellprotein diente hierfür das Kälteschockprotein B (*Cold shock protein* B - CspB)² aus *Bacillus subtilis*. Folgende Überlegungen führten zu dieser Wahl:

- Die Struktur des Proteins ist bekannt. CspB ist ein 67 Aminosäuren umfassendes Eindomänen-Protein, aufgebaut aus fünf antiparallelen β-Strängen. Die β-Stränge bilden zwei β-Faltblätter, welche ein β-*Barrel* mit einem hydrophoben Kern erzeugen (Abb. 1.5 A) (Schindelin *et al.*, 1993; Schnuchel *et al.*, 1993).
- CspB bindet über zwei konservierte RNA-Bindemotive einzelsträngige DNA und RNA (Abb. 1.5 B) (Schröder *et al.*, 1995; Max *et al.*, 2006). Die korrekte Faltung des Proteins kann über diese Bindung leicht nachgewiesen werden, da dabei die intrinsische Fluoreszenz von CspB stark verringert wird (Lopez *et al.*, 1999; Zeeb *et al.*, 2006).

² CspB ist eines von drei in *Bacillus subtilis* identifizierten Kälteschockproteinen, die vermehrt bei niedrigen Temperaturen synthetisiert werden (Willimsky *et al.*, 1992). *In vivo* dient das Protein wahrscheinlich zum einen als transkriptioneller Aktivator von Kälteschockgenen (Graumann & Marahiel, 1994) und gewährleistet zum anderen eine effektive Translation bei geringen Temperaturen durch Verhinderung der Bildung von mRNA-Sekundärstrukturen (Hunger *et al.*, 2006).



Abbildung 1.5: Strukturmodell von CspB aus *Bacillus subtilis*. Die β -Stränge β 1 bis β 5 sind in rot dargestellt. (A) Ansicht der 5 β -Stränge (Schindelin *et al.*, 1993; PDB ID: 1CSP). (B) Ansicht von CspB mit gebundenem Hexathymidin (dT6, schwarz). Die an der Bindung beteiligten Phenylalanine sind in gelb, das Tryptophan in grün dargestellt (Max *et al.*, 2006; PDB ID: 2ES2).

- Der Faltungsmechanismus des Proteins ist sehr gut charakterisiert. Eine Reihe thermodynamischer und kinetischer Analysen sprechen f
 ür eine Faltung nach einem Zweizustandsmodell ohne detektierbare Faltungsintermediate (Garcia-Mira *et al.*, 2004; Schindler *et al.*, 1995; Schindler & Schmid, 1996).
- Zahlreiche CspB-Varianten sind hinsichtlich Faltung und thermodynamischer Stabilität sehr gut beschrieben (Fu *et al.*, 2009; Garcia-Mira *et al.*, 2004; Garcia-Mira & Schmid, 2006; Martin *et al.*, 2002; Max *et al.*, 2007; Wunderlich *et al.*, 2005).

Im Folgenden werden die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe bezüglich der polyalanin-abhängigen Fibrillierung im Kontext des Modellproteins CspB kurz zusammengefasst:

Zunächst wurde das stabil gefaltete Eindomänen-Protein mit drei verschiedenen Varianten der N-terminalen Domäne von PABPN1 (mit zehn, 17 oder ohne Alanine) fusioniert (Abb. 1.6 A) (Sackewitz *et al.*, 2008). Trotz der zusätzlichen 125 Aminosäuren band CspB in den Fusionen weiterhin einzelsträngige Nukleinsäuren und war demnach nativ gefaltet (Sackewitz *et al.*, 2008). Innerhalb weniger Wochen bildeten die Fusionsproteine in Anwesenheit der Poly-Alanin-Sequenz amyloide Strukturen, in denen die native, aktive Struktur von CspB erhalten blieb (Sackewitz *et al.*, 2008). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Fibrillenbildung eines Proteins nicht notwendigerweise zur Entfaltung des

gesamten Proteins und damit zum Funktionsverlust führen muss. Wahrscheinlich liegt die amyloidogene Sequenz in den Fusionen aus N-terminalen Domänen mit CspB strukturell unabhängig und sterisch ungehindert von der gefalteten CspB-Domäne vor. Hier durchläuft vermutlich nur die amyloidogene Sequenz eine Konformationsveränderung während CspB in seiner ursprünglichen Konformation verbleibt (Sackewitz, 2009).



PABPN1

Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Fusionsproteine. Mit Ausnahme der "direkten Fusionen" wurden für alle Linker- und CspB-Varianten 3 N-terminale Fusionen produziert: 17 Alanine entsprechen der größten Alaninexpansion im Fall von PABPN1, 10 Alanine repräsentieren die Wildtypsequenz und die Konstrukte ohne Alanine dienten als Negativkontrolle (modifiziert nach Sackewitz *et al.*, 2008). Die CspB-Variante A46K/S48R wurde im weiteren Verlauf der Arbeit mit MCspB bezeichnet. Gekennzeichnete Fusionen wurden nicht in dieser Arbeit hergestellt (* Sackewitz, 2009; ⁺ von Einem, 2006; [#] Winter, 2008).

Darauf aufbauend stellte sich die Frage, ob auch die direkte Fusion von Alaninpeptiden mit CspB zur Fibrillenbildung des Proteins führt. Um dies zu überprüfen wurden Peptide von zehn bzw. 17 Alaninen N-terminal mit CspB fusioniert (Abb. 1.6 D). Auch für diese Varianten konnten innerhalb einiger Wochen fibrilläre Strukturen nachgewiesen werden (Sackewitz *et al.*, 2008). Dies bestätigte, dass Poly-Alanin-Sequenzen generell einen amyloidogenen Charakter besitzen und zur Fibrillierung eines stabil gefaltenen Proteins führen können (Sackewitz, 2009).

Untersuchungen zur Aktivität von CspB in den Fibrillen der "direkten Fusionen" ergaben, dass die Bindung einzelsträngiger Nukleinsäuren nicht mehr erfolgte (Sackewitz *et al.*, 2008). Um zu klären, warum CspB in diesen Fibrillen nicht nativ gefaltet vorlag, wurde der proteolyseresistente Bereich der Fibrillen ermittelt. Dabei konnte festgestellt werden, dass die proteolysegeschützte, fibrilläre "Kernstruktur" neben den Alaninen bis zu 16 N-terminale Aminosäuren von CspB beinhaltete (Sackewitz, 2009). Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass die Fibrillen durch einen größeren ΔG_D -Wert (Gibbs freie Energie der Denaturierung) als monomeres CspB stabilisiert werden. Im Umkehrschluss stellte sich folgende Frage: Kann monomeres CspB so stabilisiert werden, dass trotz der fusionierten Alanine die Fibrillierung inhibiert wird?

Um diese Frage zu beantworten, wurde Wildtyp-CspB im Kontext der direkt fusionierten Alaninpeptide durch die Einführung der Doppelmutation A46K/S48R um ca. 10 kJ/mol stabilisiert (Abb. 1.6 D) (Winter, 2008; Wunderlich *et al.*, 2005). Diese Stabilisierung inhibierte die Fibrillierung der Fusionen mit zehn und 17 Alaninen (Winter, 2008). In den Fusionen mit A46K/S48R-CspB wurden die löslichen Proteine demnach durch einen größeren ΔG_D -Wert stabilisiert als die Fibrillen. Übereinstimmend damit konnte bereits für andere fibrillen-bildende Proteine gezeigt werden, dass Mutationen, die zur Verringerung der thermodynamischen Stabilität führen, die *lag*-Phase der Fibrillierung verkürzen (Chiti *et al.*, 2000; Espargaró *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010).

1.5 Zielstellung der Arbeit

Aus den Ergebnissen der Arbeitsgruppe ergaben sich für die vorliegende Dissertation zwei grundlegende Fragestellungen:

 Welcher Abstand zwischen einer amyloidogenen Sequenz und einer gefalteten Domäne ist notwendig, damit die Faltung und Aktivität der Domäne in den Fibrillen erhalten bleibt?

Das stabil gefaltete Protein CspB lag in Fibrillen der Fusionen mit der N-terminalen Domäne von PABPN1 nativ gefaltet vor. Im Kontrast dazu wurde CspB in Fibrillen der direkten Fusionen mit Alaninpeptiden entfaltet (Sackewitz *et al.*, 2008). Dies deutet darauf hin, dass wahrscheinlich der Abstand zwischen der amyloidogenen Sequenz und CspB darüber entscheidet, ob CspB auch in amyloiden Fibrillen gefaltet vorliegt.

Für die Beantwortung dieser Frage sollten verschiedene Fusionsproteine hergestellt werden, in denen die Länge der amyloidogenen Peptide (0, 10 oder 17 Alanine) und die Länge des Linkers (3 oder 16 Aminosäurereste) zwischen den Alaninpeptiden und CspB variiert. In der Nomenklatur der Varianten bezeichnen "ΔAla", "10Ala" und "17Ala" die Länge der Alaninsequenz und "L3" sowie "L16" die Länge des Linkers (Abb. 1.6 B, C). Die Linkerlängen von drei bzw. 16 Aminosäuren resultieren aus dem ermittelten proteolysegeschützten Bereich von Fibrillen der direkten Fusionen aus Alaninpeptiden und CspB (Sackewitz, 2009). Dieser Bereich enthielt neben der Alaninsequenz bis zu 16 Aminosäuren von CspB. Demnach sollte ein Linker mit 16 Aminosäuren geeignet sein, um den gefalteten Zustand von CspB in den Fibrillen aufrechtzuerhalten.

2.) Beeinflusst die thermodynamische Stabilität einer gefalteten Domäne die Fibrillenbildung auch dann, wenn die amyloidogene Sequenz strukturell unabhängig und sterisch ungehindert von der gefalteten Domäne vorliegt?

Die stabilisierende Mutation A46K/S48R im CspB inhibiert die Fibrillierung der direkten Fusionen, da hier die löslichen Proteine durch einen größeren ΔG_D -Wert stabilisiert werden als die Fibrillen. Es stellte sich die Frage, ob die Mutation A46K/S48R die Fibrillierung der Linker-Varianten L3 und L16 und vor allem die Fibrillierung der Fusionen von CspB mit den N-terminalen Domänen von PABPN1 beeinflussen würde. Liegt die amyloidogene Sequenz wirklich strukturell unabhängig von CspB vor, sollte zumindest bei Fusionen mit der 125 Aminosäuren umfassenden N-terminalen Domäne die Stabilisierung von CspB die Fibrillierung nicht beeinflussen.

Für eine bessere Übersichtlichkeit aller in dieser Arbeit beschriebenen Varianten befindet sich am Ende der Dissertation eine herausklappbare Seite mit einer schematischen Darstellung der Fusionsproteine und deren Bezeichnung.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien stammten von den Firmen Applichem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und hatten den Reinheitsgrad "zur Analyse". Zur Herstellung von Puffern wurde bidestilliertes Wasser verwendet.

2.1.2 Standards und Kits

Tabelle 2.1: Verwendete Standards und Kits.

Produkt	Hersteller
GeneRuler [™] 100 bp DNA Marker	Fermentas (St. Leon-Rot)
Protein-Marker II und Prestained	Peqlab (Erlangen)
QuickChange [®] II Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies (La Jolla, USA)
Taq PCR Kit	New England Biolabs (Beverly, USA)
E.Z.N.A. [®] Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab (Erlangen)

2.1.3 Antibiotika und Enzyme

Tabelle 2.2:	In dieser	Arbeit genutzte	Antibiotika	und Enzyme.
--------------	-----------	-----------------	-------------	-------------

Produkt	Hersteller
Benzonase [®]	Merck (Darmstadt)
Proteinase K	Roche Diagnostics (Mannheim)
Proteaseinhibitormix (cOmplete EDTA free)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)
Kanamycin	Roth (Karlsruhe)

2.1.4 Säulen und Säulenmaterialien

Tabelle 2.3: Verwendete Säulen und Säulenmaterialien.

Säule	Hersteller
Jupiter [®] 5u C18 300Å (250 × 4.6 mm)	Phenomenex (Aschaffenburg)
XK 26/20-Leersäule	Amersham Biotech (Freiburg)
2.5 ml Leersäulen	MoBiTec GmbH (Göttingen)
Superdex [®] 75 <i>prep grade</i> (120 ml)	Amersham Biotech (Freiburg)
Ni-NTA	Qiagen (Hilden)
Thrombin-Agarose	Sigma (St. Louis, USA)

2.1.5 E. coli - Stämme

Die in dieser Arbeit genutzten *E. coli*-Stämme sind in Tabelle 2.4 aufgeführt. Während der Stamm *E. coli* BL21 (DE3) für die heterologe Proteinexpression verwendet wurde, erfolgte die Replikation der nach 2.2.1 mutagenisierten Plasmide (siehe S. 22f) im Stamm *E. coli* XL1 *Blue*.

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
E. coli XLI-Blue	F', $Tn10$, $proA^+B^+$, $lacI^q$, $\Delta(lacZ)M15/recA1$, $endA1$,	Stratagene (Heidelberg)
	gyrA96(NaI ^r), thi, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), supE44, relA1, lac	
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	B, F ⁻ , $ompT$, gal , $[dcm]$, $[lon]$, $hsdSB(rB-mB-)$, $gal\lambda$ (DE3)	Novagen (Bad Soden)

Tabelle 2.4: Verwendete E. coli-Stämme.

2.1.6 Plasmide und Primer

Zur Herstellung der Expressionskonstrukte verwendete Plasmide sind in Tabelle 2.5 aufgelistet. Primer wurden von der Firma Eurofins MWG (Ebersberg) in HPLC-gereinigter Form bezogen (Tab. 2.6). Die rot markierten Nukleotide der Mutageneseprimer A46K/S48R kennzeichnen die Tripletts für die Aminosäureaustausche A46K und S48R im CspB.

 Tabelle 2.5: Verwendete Plasmide.

Plasmid	Herkunft
pET15b/N-WT-CspB	Dissertation Mirko Sackewitz (2009)
pET15b/N-(+7)Ala-CspB	Dissertation Mirko Sackewitz (2009)
pET15b/N-∆Ala-CspB	Dissertation Mirko Sackewitz (2009)
pUBS520 (dnaY, p15A ori, lacI ^q , kan ^r)	Dr. Ulrich Brinkmann (Brinkmann et al., 1989)

Tabelle 2.6: Verwendete Primer. F - Forward Primer, R - Revers Primer.

Mutageneseprimer für die Herstellung der Linkervarianten														
L16-F	5`-GAA	GAC	ATT	TAG	TAC	CAG	GAT	TAG	AAG	GTA	AAG	TAA	AAT	GG-3`
L16-R	5`-CCA	TTT	TAC	TTT	ACC	TTC	TAA	TCC	TGG	TAC	TAA	ATG	TCT	TC-3`
L3-F	5`-GCA	GGA	GCA	GCA	GGA	GGA	GGC	TTA	GAA	GGT	AAA	GTA	AAA	TGG-3`
L3-R	5`-CCA	TTT	TAC	TTT	ACC	TTC	TAA	GCC	TCC	TCC	TGC	TGC	TCC	TGC-3`
Δ-L3-F	5`-AGC	CAT	ATG	GCA	GGA	GGA	GGC	TTA	GAA	GGT	AAA	GTA	AAA	TGG-3`
Δ -L3-R	5`-CCA	TTT	TAC	TTT	ACC	TTC	TAA	GCC	TCC	TCC	TGC	CAT	ATG	GC-3`
Mutageneseprimer A	46K/S48	R												
MCspB-F	5`-CTT	TAG	AAG	AAG	GCC	AA <mark>A</mark>	AAG	TT <mark>C</mark>	GTT	TTG	AAA	TCG	TTG	AAG-3`
MCspB-R	5`-CCT	TCA	ACG	ATT	TCA	AA <mark>A</mark>	CGA	ACT	TTT	TGG	CCT	TCT	TCT	AAA -3`
Sequenzierprimer														
T7-F	5`-CGA	AAT	TAA	TAC	GAC	TCA	C-3`							
T7-R	5`-gct	AGT	TAT	TGC	TCA	GCG	GTG	G-3`						

2.1.7 Sonstige Materialien

Materialien der Standardlaborausstattung wurden, soweit nicht in Tabelle 2.7 aufgeführt, über den Laborfachhandel Dr. Ilona Schubert (Leipzig) bezogen.

Tabelle 2.7: Sonstige Materialien.	
------------------------------------	--

Produkt	Hersteller
Dialyseschläuche MWCO 3 500	Spectrum-Laboratories (Rancho Domingues, USA)
Küvetten für die Spektrometrie	Hellma (Mühlheim)
Elektroporationsküvetten	Peqlab (Erlangen)
C_{18} -Zip Tips [®]	Millipore (Billerica, USA)
Kupfergrids für die Elektronenmikroskopie	Plano (Wetzlar)

2.1.8 Geräte

Neben den in Tabelle 2.8 aufgeführten Geräten wurden Geräte der Standardlaborausstattung verwendet.

Tabelle 2.8: In dieser Arbeit genutzte Geräte.

Gerät	Hersteller
ÄKTA TM Explorer 100/Purifier	Amersham Biotech (Freiburg)
Avanti [®] J-20 und J-25 Zentrifuge	Beckmann (München)
Optima TM TLX Ultrazentrifuge	Beckmann (München)
Gaulin Micron Lab 40 (Homogenisator)	APV (Lübeck)
Electroporator 2510	Eppendorf (Hamburg)
Mastercycler [®] Gradient	Eppendorf (Hamburg)
Elektronenmikroskop EM 600	Zeiss (Jena)
NanoPhotometer TM UV/Vis Spektrophotometer	Implen (München)
FluoroMax-2 TM Spektrofluorimeter	SPEX Instruments S.A. (Edison, USA)
Jasco [®] J-810 Spektropolarimeter	Jasco Systems (Great Dunmow, UK)
SpeedVac RC10.10 mit Kühlfalle RCT 60	Jouan (Femwald)
HPLC Gina 50	Gyncotek GmbH (Germering)
SX20 Stopped flow Spektrometer	Applied Photophysics (Leatherhead, UK)
REFLEX TM - und Ultraflex TM 3-Spektrometer	Bruker-Franzen-Analytik (Bremen)

2.2 Methoden

2.2.1 Ortsspezifische Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese erfolgte nach Vorschrift des *QuickChange*[®] II *Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies). Als Ausgangsplasmide dienten die in der Dissertation von Mirko Sackewitz hergestellten Fusionskonstrukte aus den N-terminalen Domänen von PABPN1 und Wildtyp-CspB (Abb. 2.1 A) (Sackewitz, 2009).



Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der "Mutagenese-PCR". Die schwarzen Pfeile stellen die spezifischen Primer dar. (A) In den ersten Zyklen der PCR erfolgte durch spezifische Primer das "Ausloopen" eines Großteils der DNA-Sequenz, die für die N-terminale Domäne codiert. Die gestrichelten Linien kennzeichnen den aus der Plasmid-DNA entfernten Bereich. (B) Im weiteren Verlauf der PCR konnten die spezifischen Primer vollständig an die neu generierten Plasmide binden.

Zunächst wurde für die Herstellung der verschiedenen Linkervarianten die codierende Sequenz der N-terminalen Domäne mit spezifischen Primern auf 16 bzw. drei Aminosäuren C-terminal der Alaninsequenz verkürzt (Abb. 2.1, Tab. 2.10). Anschließend wurden durch eine weitere ortsspezifische Mutagenese zwei Punktmutationen in den für CspB codierenden Bereich eingeführt, um mit MCspB fusionierte Linkervarianten herzustellen. Tabelle 2.9 zeigt den Reaktionsansatz und das Programm der "Mutagenese-PCR".

Tabelle	2.9:	"Mutagenese-	PCR".
---------	------	--------------	-------

PCR-Reaktionsansatz		PCR-Programm		
10×Puffer	5 µl			
Template-Plasmid	10 ng	Denaturierung	95°C	30 s
Forward Primer (10 µM)	1 µl	Denaturierung	95°C	ן 30 s
Reverse Primer (10 µM)	1 µl	Annealing	55°C	60 s ≻ 18 ×
dNTPs	1 µl	Amplifikation	68°C	ر 6 min 30 s
<i>Pfu</i> Ultra	1 µl		4°C	Stopp
ddH ₂ O	add 50 µl			

Nach der PCR wurden die methylierten Ausgangsplasmide mit 1 μ l *Dpn*I (10 U) bei 37°C eine Stunde lang verdaut. Anschließend erfolgte die Transformation der PCR-Produkte in chemokompetente *E. coli* XLI-*Blue*-Zellen. Transformanten für die L3/16-Linkervarianten wurden mittels Kolonie-PCR nach Vorschrift des *Taq PCR Kits* (NEB) mit T7-Primern (siehe S. 21, Tab. 2.6) auf die richtige Konstruktgröße überprüft und anschließend sequenziert.

рЕТ15b/17Ala-L3-CspB L3-F рЕТ15b/N-(+7)Ala-CspB D3-R PET15b/10Ala-L3-CspB L3-F pET15b/10Ala-L3-CspB A-L3-F PET15b/N-\DAla-CspB pET15b/17Ala-L16-CspB A-L3-F PET15b/N-\DAla-CspB pET15b/17Ala-L16-CspB L16-F PET15b/N-(+7)Ala-CspB pET15b/10Ala-L16-CspB L16-F PET15b/N-(+7)Ala-CspB pET15b/10Ala-L16-CspB L16-F PET15b/N-\DAla-CspB pET15b/17Ala-L16-CspB L16-F PET15b/N-\DAla-CspB pET15b/17Ala-L16-CspB L16-F PET15b/N-\DAla-CspB pET15b/17Ala-L16-CspB MCspB-F PET15b/N-\DAla-L3-CspB mCspB-R PET15b/10Ala-L3-CspB MCspB-R pET15b/17Ala-L3-MCspB MCspB-F PET15b/10Ala-L3-CspB mCspB-R PET15b/10Ala-L3-CspB MCspB-R pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-F PET15b/10Ala-L16-CspB mCspB-R PET15b/10Ala-L16-CspB MCspB-R pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-R PET15b/10Ala-L16-CspB mCspB-R PET15b/10Ala-L16-CspB MCspB-R pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-R	Expressionskonstrukt	Primer	Ausgangsplasmid
L3-R pET15b/10Ala-L3-CspB L3-R pET15b/AAla-L3-CspB A-L3-F pET15b/AAla-L3-CspB A-L3-R pET15b/17Ala-L16-CspB L16-F pET15b/10Ala-L16-CspB L16-R pET15b/10Ala-L16-CspB L16-R pET15b/10Ala-L16-CspB L16-R pET15b/17Ala-L3-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-L3-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-L3-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-L3-MCspB MCspB-F pET15b/17Ala-L3-MCspB MCspB-F pET15b/17Ala-L3-MCspB MCspB-F pET15b/17Ala-L16-MCspB MCspB-F pET15b/17Ala-L16-MCspB MCspB-R pET15b/17Ala-L16-MCspB MCspB-R pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-R pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-R pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-R pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-R pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-AAla-CspB	pET15b/17Ala-L3-CspB	L3-F	pET15b/N-(+7)Ala-CspB
pET15b/10Ala-L3-CspB L3-F pET15b/N-WT-CspB μ3-R pET15b/Ala-L3-CspB A-L3-R pET15b/17Ala-L16-CspB L16-F pET15b/N-(+7)Ala-CspB pET15b/17Ala-L16-CspB L16-F pET15b/N-MT-CspB pET15b/10Ala-L16-CspB L16-F pET15b/N-AAla-CspB pET15b/17Ala-L16-CspB L16-F pET15b/N-AAla-CspB pET15b/AAla-L16-CspB L16-F pET15b/N-AAla-CspB pET15b/17Ala-L3-MCspB MCspB-F pET15b/17Ala-L3-CspB mCspB-R mCspB-R pET15b/10Ala-L3-CspB pET15b/10Ala-L3-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-L3-CspB mCspB-R mCspB-R pET15b/10Ala-L3-CspB mCspB-R mCspB-R pET15b/10Ala-L3-CspB mCspB-R mCspB-R pET15b/10Ala-L16-CspB mCspB-R mCspB-R pET15b/N-(+7)Ala-CspB mCspB-R		L3-R	
L3-R pET15b/AAla-L3-CspB A-L3-R pET15b/17Ala-L16-CspB L16-F pET15b/10Ala-L16-CspB L16-R pET15b/AAla-L16-CspB L16-R pET15b/AAla-L16-CspB L16-R pET15b/AAla-L16-CspB L16-R pET15b/17Ala-L3-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-L3-MCspB MCspB-R pET15b/10Ala-L3-MCspB MCspB-R pET15b/AAla-L3-MCspB MCspB-R pET15b/10Ala-L3-MCspB MCspB-R pET15b/10Ala-L3-MCspB MCspB-R pET15b/10Ala-L3-MCspB MCspB-R pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-R pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-R pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-R pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-R pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-R pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-R pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-R pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-R pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-R pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-R pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-R pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-R pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-R pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-R pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-R pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-R pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-R pET15b/N-AAla-CspB MCspB-R pET15b/N-AAla-CspB	pET15b/10Ala-L3-CspB	L3-F	pET15b/N-WT-CspB
pET15b/ΔAla-L3-CspB Δ-L3-F pET15b/N-ΔAla-CspB Δ-L3-R pET15b/17Ala-L16-CspB L16-F pET15b/N-(+7)Ala-CspB pET15b/10Ala-L16-CspB L16-F pET15b/N-WT-CspB pET15b/10Ala-L16-CspB L16-F pET15b/N-ΔAla-CspB pET15b/10Ala-L16-CspB L16-F pET15b/N-ΔAla-CspB pET15b/10Ala-L16-CspB L16-F pET15b/N-ΔAla-CspB pET15b/17Ala-L3-MCspB MCspB-F pET15b/17Ala-L3-CspB mCspB-R pET15b/10Ala-L3-CspB MCspB-R pET15b/10Ala-L3-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-L3-CspB mCspB-R pET15b/10Ala-L3-CspB MCspB-R pET15b/17Ala-L16-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-L3-CspB mCspB-R pET15b/17Ala-L16-CspB MCspB-R pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-L16-CspB mCspB-R mCspB-R pET15b/10Ala-L16-CspB pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-F pET15b/N-(+7)Ala-CspB mCspB-R pET15b/10Ala-L16-CspB MCspB-R pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-(+7)Ala-CspB mCspB-R pE		L3-R	
Δ-L3-RpET15b/17Ala-L16-CspBL16-FpET15b/N-(+7)Ala-CspBL16-RpET15b/10Ala-L16-CspBL16-FpET15b/10Ala-L16-CspBL16-FpET15b/N-WT-CspBL16-RpET15b/N-AAla-CspBL16-RpET15b/17Ala-L3-MCspBMCspB-FpET15b/17Ala-L3-CspBmCspB-RmCspB-RpET15b/10Ala-L3-CspBpET15b/10Ala-L3-MCspBMCspB-FpET15b/10Ala-L3-CspBmCspB-RmCspB-RpET15b/10Ala-L3-CspBpET15b/10Ala-L3-MCspBMCspB-FpET15b/10Ala-L3-CspBmCspB-RmCspB-RpET15b/17Ala-L16-CspBmCspB-RmCspB-RpET15b/17Ala-L16-CspBpET15b/10Ala-L16-MCspBMCspB-FpET15b/10Ala-L16-CspBmCspB-RmCspB-RpET15b/10Ala-L16-CspBpET15b/10Ala-L16-MCspBMCspB-FpET15b/10Ala-L16-CspBmCspB-RmCspB-RpET15b/10Ala-L16-CspBpET15b/17Ala-N-MCspBMCspB-FpET15b/N-(+7)Ala-CspBmCspB-RmCspB-RpET15b/N-(+7)Ala-CspBpET15b/10Ala-N-MCspBMCspB-FpET15b/N-(+7)Ala-CspBmCspB-RmCspB-RpET15b/N-(+7)Ala-CspBpET15b/10Ala-N-MCspBMCspB-FpET15b/N-WT-CspBmCspB-RmCspB-RpET15b/N-AAla-CspBpET15b/AAla-N-MCspBMCspB-FpET15b/N-AAla-CspBmCspB-RmCspB-RpET15b/N-AAla-CspBmCspB-RmCspB-RpET15b/N-AAla-CspBmCspB-RmCspB-RpET15b/N-AAla-CspBmCspB-RmCspB-RpET15b/N-AAla-CspBmCspB-RmCspB-RpET15b/N-AAla-CspB<	pET15b/AAla-L3-CspB	Δ-L3-F	pET15b/N-∆Ala-CspB
рЕТ15b/17Ala-L16-CspB L16-F рЕТ15b/N-(+7)Ala-CspB 16-R рЕТ15b/N-MAla-L16-CspB L16-F pET15b/AAla-L16-CspB L16-F pET15b/N-AAla-CspB 16-R pET15b/N-AAla-CspB L16-F pET15b/AAla-L16-CspB L16-F pET15b/N-AAla-CspB 16-R pET15b/N-AAla-CspB MCspB-F pET15b/17Ala-L3-MCspB MCspB-F pET15b/17Ala-L3-CspB mCspB-R mCspB-R mCspB-R pET15b/10Ala-L3-MCspB MCspB-F pET15b/AAla-L3-CspB mCspB-R mCspB-R mCspB-R pET15b/17Ala-L16-MCspB MCspB-F pET15b/17Ala-L16-CspB MCspB-R mCspB-R mCspB-R pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-L16-CspB MCspB-R mCspB-R mCspB-R pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-F pET15b/Nala-L16-CspB MCspB-R pET15b/NAla-L16-CspB MCspB-R pET15b/17Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-(+7)Ala-CspB MCspB-R pET15b/N-(+7)Ala-CspB MCspB-R pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB		Δ -L3-R	
beta base in the second sec	pET15b/17Ala-L16-CspB	L16-F	pET15b/N-(+7)Ala-CspB
pET15b/10Ala-L16-CspB L16-F pET15b/N-WT-CspB μ16-R pET15b/ΛΔla-L16-CspB L16-F μ16-R pET15b/N-ΔΔla-CspB μ16-R pET15b/N-ΔΔla-CspB μ16-R pET15b/N-ΔΔla-CspB μ16-R pET15b/17Ala-L3-CspB μ16-R pET15b/17Ala-L3-CspB μ16-R pET15b/17Ala-L3-CspB μ16-R pET15b/10Ala-L3-CspB μ16-R pET15b/10Ala-L3-CspB μ16-R pET15b/10Ala-L3-CspB μ16-R pET15b/10Ala-L3-CspB μ16-R pET15b/10Ala-L3-CspB μ15b/10Ala-L3-MCspB MCspB-R μ15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-R μ15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-R μ15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-R μ15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-R μ15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-R μ15b/17Ala-N-MCspB MCspB-R μ15b/17Ala-N-MCspB MCspB-R μ15b/10Ala-N-MCspB MCspB-R μ15b/10Ala-N-MCspB MCspB-R μ15b/10Ala-N-MCspB MCspB-R μ15b/10Ala-N-MCspB MC		L16-R	
$\begin{array}{cccc} L16-R & PET15b/\Lambda Ala-L16-CspB & L16-R & PET15b/N-\Lambda Ala-CspB \\ L16-R & PET15b/17Ala-L3-MCspB & MCspB-F & PET15b/17Ala-L3-CspB \\ MCspB-R & PET15b/10Ala-L3-MCspB & MCspB-F & PET15b/10Ala-L3-CspB \\ MCspB-R & PET15b/\Delta Ala-L3-MCspB & MCspB-F & PET15b/\Delta Ala-L3-CspB \\ MCspB-R & PET15b/17Ala-L16-MCspB & MCspB-F & PET15b/17Ala-L16-CspB \\ MCspB-R & PET15b/10Ala-L16-MCspB & MCspB-F & PET15b/10Ala-L16-CspB \\ MCspB-R & PET15b/10Ala-L16-MCspB & MCspB-F & PET15b/N-(+7)Ala-CspB \\ MCspB-R & PET15b/10Ala-N-MCspB & MCspB-F & PET15b/N-(+7)Ala-CspB \\ MCspB-R & PET15b/10Ala-N-MCspB & MCspB-F & PET15b/N-4Ala-CspB \\ PET15b/10Ala-N-MCspB & MCspB-F & PET15b/N-\DeltaAla-CspB \\ MCspB-R & PET15b/N-AAla-CspB $	pET15b/10Ala-L16-CspB	L16-F	pET15b/N-WT-CspB
pET15b/ΔAla-L16-CspB L16-F pET15b/I∧ΔAla-CspB pET15b/17Ala-L3-MCspB MCspB-F pET15b/17Ala-L3-CspB mCspB-R pET15b/10Ala-L3-MCspB MCspB-F pET15b/ΔAla-L3-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-L3-CspB mCspB-R pET15b/10Ala-L3-CspB MCspB-R pET15b/ΔAla-L3-MCspB MCspB-F pET15b/ΔAla-L3-CspB mCspB-R pET15b/ΔAla-L3-CspB MCspB-R pET15b/17Ala-L16-MCspB MCspB-F pET15b/17Ala-L16-CspB mCspB-R pET15b/10Ala-L16-CspB MCspB-R pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-L16-CspB mCspB-R pET15b/10Ala-L16-CspB MCspB-R pET15b/17Ala-N4CspB MCspB-F pET15b/ΔAla-L16-CspB mCspB-R pET15b/17Ala-N4CspB MCspB-R pET15b/17Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-(+7)Ala-CspB mCspB-R pET15b/N-4Ala-N-MCspB MCspB-R pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-4Ala-CspB mCspB-R pET15b/N-4Ala-CspB MCspB-R pET15b/ΔAla-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-4Ala-CspB		L16-R	
L16-R pET15b/17Ala-L3-MCspB MCspB-F pET15b/17Ala-L3-CspB mCspB-R pET15b/10Ala-L3-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-L3-MCspB MCspB-F pET15b/0Ala-L3-CspB mCspB-R pET15b/0Ala-L3-MCspB MCspB-F mCspB-R pET15b/0Ala-L3-CspB mCspB-R pET15b/17Ala-L16-CspB mCspB-R mCspB-R pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-F mCspB-R pET15b/10Ala-L16-CspB mCspB-R pET15b/10Ala-L16-CspB mCspB-R mCspB-R pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-F mCspB-R pET15b/10Ala-L16-CspB mCspB-R pET15b/10Ala-L16-CspB mCspB-R mCspB-R pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-F mCspB-R pET15b/N-(+7)Ala-CspB mCspB-R mCspB-R pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-F mCspB-R pET15b/N-(+7)Ala-CspB mCspB-R pET15b/N-(+7)Ala-CspB mCspB-R pET15b/N-MCspB mCspB-R pET15b/N-MCspB mCspB-R	pET15b/AAla-L16-CspB	L16-F	pET15b/N-∆Ala-CspB
pET15b/17Ala-L3-MCspB MCspB-F pET15b/17Ala-L3-CspB pET15b/10Ala-L3-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-L3-CspB mCspB-R pET15b/ΔAla-L3-MCspB MCspB-F pET15b/ΔAla-L3-MCspB MCspB-F pET15b/ΔAla-L3-CspB mCspB-R pET15b/ΔAla-L3-CspB MCspB-R pET15b/17Ala-L16-MCspB MCspB-F pET15b/17Ala-L16-CspB mCspB-R mCspB-R mCspB-R pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-L16-CspB mCspB-R mCspB-R mCspB-R pET15b/17Ala-L16-MCspB MCspB-F pET15b/ΔAla-L16-CspB mCspB-R mCspB-R mCspB-R pET15b/17Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/AAla-L16-CspB mCspB-R mCspB-R mCspB-R pET15b/17Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-(+7)Ala-CspB mCspB-R mCspB-R mCspB-R pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-(+7)Ala-CspB mCspB-R mCspB-R mCspB-R pET15b/AAla-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-AAla-CspB mCspB-R mCspB-R		L16-R	
МСspB-R PET15b/10Ala-L3-MCspB MCspB-R PET15b/ΔAla-L3-MCspB MCspB-F MCspB-R PET15b/17Ala-L16-MCspB MCspB-R PET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-R PET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-F PET15b/ΔAla-L16-MCspB MCspB-F PET15b/ΔAla-L16-MCspB MCspB-R PET15b/17Ala-N-MCspB MCspB-F PET15b/17Ala-N-MCspB MCspB-F PET15b/17Ala-N-MCspB MCspB-F MCspB-R PET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-F MCspB-R PET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-F MCspB-R PET15b/N-MT-CspB MCspB-R PET15b/N-ΔAla-CspB MCspB-R PET15b/N-ΔAla-CspB MCspB-R	pET15b/17Ala-L3-MCspB	MCspB-F	pET15b/17Ala-L3-CspB
рЕТ15b/10Ala-L3-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-L3-CspB pET15b/ΔAla-L3-MCspB MCspB-F pET15b/ΔAla-L3-CspB pET15b/17Ala-L16-MCspB MCspB-F pET15b/17Ala-L16-CspB pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-L16-CspB pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-L16-CspB pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-L16-CspB mCspB-R mCspB-R mCspB-R pET15b/17Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-(+7)Ala-CspB mCspB-R mCspB-R mCspB-R pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-(+7)Ala-CspB mCspB-R mCspB-R mCspB-R pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-WT-CspB mCspB-R mCspB-R mCspB-R pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-\DAla-CspB mCspB-R mCspB-R mCspB-R pET15b/AAla-N-MCspB MCspB-R mCspB-R pET15b/AAla-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-\DAla-CspB MCspB-R mCspB-R mCspB-R		MCspB-R	
MCspB-R pET15b/ΔAla-L3-MCspB MCspB-F pET15b/ΔAla-L3-CspB pET15b/17Ala-L16-MCspB MCspB-F pET15b/17Ala-L16-CspB pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-L16-CspB pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-R pET15b/10Ala-L16-CspB pET15b/ΔAla-L16-MCspB MCspB-R pET15b/ΔAla-L16-CspB pET15b/ΔAla-L16-MCspB MCspB-R pET15b/ΔAla-L16-CspB pET15b/17Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-(+7)Ala-CspB pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-(+7)Ala-CspB pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-(+7)Ala-CspB pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-(+7)Ala-CspB mCspB-R mCspB-R mCspB-R pET15b/ΔAla-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-ΔAla-CspB mCspB-R mCspB-R mCspB-R pET15b/ΔAla-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-ΔAla-CspB	pET15b/10Ala-L3-MCspB	MCspB-F	pET15b/10Ala-L3-CspB
pET15b/ΔAla-L3-MCspB MCspB-F pET15b/ΔAla-L3-CspB mCspB-R pET15b/17Ala-L16-MCspB MCspB-F pET15b/17Ala-L16-CspB pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-L16-CspB mCspB-R pET15b/ΔAla-L16-MCspB MCspB-R pET15b/ΔAla-L16-MCspB MCspB-F pET15b/ΔAla-L16-CspB mCspB-R pET15b/ΔAla-L16-CspB mCspB-R pET15b/ΔAla-L16-CspB pET15b/17Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-ΔAla-L16-CspB mCspB-R mCspB-R mCspB-R pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-(+7)Ala-CspB mCspB-R mCspB-R mCspB-R pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-WT-CspB mCspB-R mCspB-R mCspB-R pET15b/ΔAla-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-ΔAla-CspB mCspB-R mCspB-R mCspB-R pET15b/ΔAla-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-ΔAla-CspB		MCspB-R	
MCspB-R pET15b/17Ala-L16-MCspB MCspB-F pET15b/17Ala-L16-CspB MCspB-R pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-L16-CspB MCspB-R pET15b/ΔAla-L16-MCspB MCspB-F pET15b/ΔAla-L16-CspB MCspB-R pET15b/17Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-(+7)Ala-CspB MCspB-R pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-WT-CspB MCspB-R pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-WT-CspB MCspB-R pET15b/ΔAla-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-ΔAla-CspB MCspB-R pET15b/ΔAla-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-ΔAla-CspB MCspB-R pET15b/N-ΔAla-CspB	pET15b/AAla-L3-MCspB	MCspB-F	pET15b/∆Ala-L3-CspB
рЕТ15b/17Ala-L16-MCspB MCspB-F pET15b/17Ala-L16-CspB MCspB-R pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-L16-CspB MCspB-R pET15b/ΔAla-L16-MCspB MCspB-F pET15b/ΔAla-L16-CspB MCspB-R pET15b/17Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-(+7)Ala-CspB MCspB-R pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-WT-CspB MCspB-R pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-WT-CspB MCspB-R pET15b/ΔAla-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-ΔAla-CspB MCspB-R pET15b/N-ΔAla-CspB MCspB-R		MCspB-R	
MCspB-R pET15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-L16-CspB MCspB-R pET15b/ΔAla-L16-MCspB MCspB-F pET15b/ΔAla-L16-CspB MCspB-R pET15b/17Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-(+7)Ala-CspB MCspB-R pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-WT-CspB MCspB-R pET15b/ΔAla-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-ΔAla-CspB MCspB-R	pET15b/17Ala-L16-MCspB	MCspB-F	pET15b/17Ala-L16-CspB
рЕТ15b/10Ala-L16-MCspB MCspB-F pET15b/10Ala-L16-CspB MCspB-R pET15b/ΔAla-L16-MCspB MCspB-F pET15b/ΔAla-L16-CspB MCspB-R pET15b/17Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-(+7)Ala-CspB MCspB-R pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-WT-CspB MCspB-R pET15b/ΔAla-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-ΔAla-CspB MCspB-R pET15b/ΔAla-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-ΔAla-CspB MCspB-R		MCspB-R	
MCspB-R pET15b/ΔAla-L16-MCspB MCspB-F pET15b/ΔAla-L16-CspB MCspB-R pET15b/N-(+7)Ala-CspB MCspB-R pET15b/N-WT-CspB MCspB-R pET15b/N-WT-CspB MCspB-R pET15b/ΔAla-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-ΔAla-CspB MCspB-R	pET15b/10Ala-L16-MCspB	MCspB-F	pET15b/10Ala-L16-CspB
рЕТ15b/ΔAla-L16-MCspB MCspB-F pET15b/ΔAla-L16-CspB MCspB-R pET15b/17Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-(+7)Ala-CspB MCspB-R pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-WT-CspB MCspB-R pET15b/ΔAla-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-ΔAla-CspB MCspB-R pET15b/N-ΔAla-CspB		MCspB-R	
MCspB-R pET15b/17Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-(+7)Ala-CspB MCspB-R pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-WT-CspB MCspB-R pET15b/ΔAla-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-ΔAla-CspB MCspB-R	pET15b/AAla-L16-MCspB	MCspB-F	pET15b/∆Ala-L16-CspB
рЕТ15b/17Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-(+7)Ala-CspB MCspB-R pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-WT-CspB MCspB-R pET15b/ΔAla-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-ΔAla-CspB MCspB-R		MCspB-R	
MCspB-R pET15b/10Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-WT-CspB MCspB-R pET15b/ΔAla-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-ΔAla-CspB MCspB-R	pET15b/17Ala-N-MCspB	MCspB-F	pET15b/N-(+7)Ala-CspB
рЕТ15b/10Ala-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-WT-CspB MCspB-R pET15b/ΔAla-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-ΔAla-CspB MCspB-R		MCspB-R	
рЕТ15b/ΔAla-N-MCspB MCspB-R pET15b/N-ΔAla-CspB MCspB-R pET15b/N-ΔAla-CspB	pET15b/10Ala-N-MCspB	MCspB-F	pET15b/N-WT-CspB
pET15b/ΔAla-N-MCspB MCspB-F pET15b/N-ΔAla-CspB MCspB-R		MCspB-R	
MCspB-R	pET15b/AAla-N-MCspB	MCspB-F	pET15b/N-∆Ala-CspB
		MCspB-R	

Tabelle 2.10: Primer und Templates zur Herstellung der Expressionskonstrukte.

Die in CspB eingeführten Punktmutationen A46K und S48R wurden mittels Sequenzierung durch die Firma Eurofins MWG (Ebersberg) bestätigt. Alle in dieser Arbeit hergestellten Expressionsplasmide sind in Tabelle 2.10 aufgeführt.

2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Alle Plasmidpräparationen wurden mit dem E.Z.N.A. *Plasmid Miniprep Kit* I (Peqlab) durchgeführt und erfolgten nach Anleitung.

2.2.3 Anzucht von E. coli - Stämmen

Für die Expression der Gene der verschiedenen Fusionsproteine wurde der *E. coli*-Stamm BL21(DE3) genutzt. Dieser wurde zusätzlich mit dem Plasmid pUBS520 transformiert (Brinkmann *et al.*, 1989). Das Plasmid enthält das Gen *dnaY*, welches für zwei in *E. coli* selten vorkommende tRNAs_{Arg} mit den Codons AGA und AGG codiert. Durch die zusätzlichen tRNA-Kopien wird die Ausbeute an rekombinantem Protein stark erhöht. Zur Anzucht der Zellen für die Expression wurden Einzelkolonien verwendet, die nicht älter als 24 h waren.

Zunächst wurde mit einer Einzelkolonie eine 200 ml-Übernachtkultur angeimpft. Die Anzucht der Zellen für die Expression erfolgte in 6 l-Schüttelkolben mit 1.5 l LB-Medium (modifiziert) (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl) sowie den Antibiotika Ampicillin (100 μ g/ml) und Kanamycin (50 μ g/ml). Die Hauptkultur wurde mit 15 ml Vorkultur beimpft und bei 37°C mit 130 rpm inkubiert. Nach Erreichen einer OD_{600 nm} von 0.6 - 0.8 wurde die heterologe Genexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Die Expression erfolgte für 4 h, und anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation für 20 min bei 5 000 g und 4°C geerntet. Die Lagerung der Zellen bis zum Zellaufschluss erfolgte bei -80°C.

2.2.4 Proteinreinigung

2.2.4.1 Reinigung der CspB-Fusionsproteine

Für den Zellaufschluss wurde die Zellfeuchtmasse zunächst in 4 ml Puffer A pro Gramm Zellen resuspendiert (alle Puffer siehe Tab. 2.11). Anschließend erfolgte der Aufschluss mittels Hochdruckdispersion bei mind. 600 bar in drei Durchgängen. Um die enthaltenen Nukleinsäuren zu entfernen, wurde die Zellsuspension bei Raumtemperatur (RT) mit der Endonuklease Benzonase[®] in einer Endkonzentration von 160 U/ml sowie 3 mM MgCl₂ versetzt und zwei Stunden lang inkubiert. Nachfolgend wurden unlösliche Bestandteile durch 20 minütige Zentrifugation mit 75 600 g bei 4°C abgetrennt. Der Überstand nach Alle sich anschließenden Chromatographieschritte erfolgten ebenfalls bei 10°C mittels ÄKTATM*Explorer* bzw. ÄKTATM*Purifier*. Die hierfür benötigten Puffer wurden vor der Benutzung filtriert und entgast. Für die nach der Dialyse durchgeführte Ni-NTA-Affinitätschromatographie wurden die Zellrohextrakte erneut 20 min bei 75 600 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine mit Puffer B equilibrierte Ni-NTA-Säule (Säulenvolumen (SV) = 60 ml) mit einem Fluss von 1 ml/min aufgetragen. Nach dem Waschen mit Puffer C über 2 SV erfolgte die Elution durch einen linearen Gradienten über 1 SV mit Puffer D. Um einen proteolytischen Abbau der Proteine zu unterdrücken, wurde den Elutionsfraktionen 5 mM EDTA zugesetzt. Fraktionen mit Fusionsprotein wurden vereinigt und zur Konzentrierung in einen Dialyseschlauch (MWCO 3 500) überführt, bei 10°C in Polyethylenglycol (PEG) 35 000 eingebettet und auf 8 - 12 ml konzentriert. Anschließend wurde eine Gelfiltration mittels Superdex[®] 75 (SV = 120 ml) in Puffer E bei einem Fluss von 1 ml/min durchgeführt. Die gereinigten Proteine wurden erneut mit Hilfe von PEG 35 000 auf mindestens 0.5 mM konzentriert und in Puffer E bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Tabelle 2.11: Verwendete Puffer zur Proteinreinigung.

Puffer	Zusammensetzung	pН
Puffer A	50 mM Tris/HCl, Proteaseinhibitormix (cOmplete,	8.0
	EDTA free) (1 Tablette/50 ml)	
Puffer B	6 M Guanidiniumhydrochlorid, 50 mM Tris/HCl	8.0
Puffer C	50 mM Tris/HCl, 20 mM Imidazol	8.0
Puffer D	50 mM Tris/HCl, 250 mM Imidazol	8.0
Puffer E	5 mM KH ₂ PO ₄ , 100 mM NaCl	7.5

2.2.4.2 Abspaltung des His-Tags

Zur Abspaltung des His-*Tags* der Varianten Δ Ala-L3-CspB, 10Ala-L3-CspB und 17Ala-L3-CspB wurde 1 ml Thrombin-Agarose in eine 3 ml-Leersäule überführt und mit 5 SV 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 equilibriert. Anschließend wurden 10 mg des jeweiligen Proteins auf die Säule aufgetragen, und die Proteolyse erfolgte unter leichtem Schütteln bei RT über Nacht. Das Eluat wurde auf eine 1 ml-Ni-NTA-Säule übertragen und erneut unter Schütteln bei RT eine Stunde lang inkubiert. Der das Fusionsprotein ohne His-*Tag* enthaltende Durchfluss wurde aufgefangen und die Proteinkonzentration spektroskopisch bestimmt. Anschließend erfolgte eine erneute Konzentrierung der Proteine auf 0.5 mM mit Hilfe von PEG 35 000.

2.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine wurden in Proteinprobenpuffer aufgenommen und durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die genaue Zusammensetzung der Gele kann Tabelle 2.12 entnommen werden.

Puffer	Zusammensetzung
SDS-Probenpuffer (5x)	100 mM Tris/HCl, 4.8% (<i>w/v</i>) SDS, 16% (<i>v/v</i>) Glycerin, 0.1% (<i>w/v</i>) Bromphenolblau, 2% (<i>v/v</i>) 2-Mercaptoethanol, pH 8.0
SDS-Trenngel (14%)	7 ml Acrylamidstammlösung (30% ig mit 0.8% Bisacrylamid), 4 ml deionisiertes Wasser, 4 ml Trenn-gelpuffer, 50 µl TEMED, 100 µl APS (10% (w / v))
SDS-Sammelgel (6%)	1.2 ml Acrylamidstammlösung (30% ig mit 0.8% Bisacrylamid), 3.3 ml deionisiertes Wasser, 1.5 ml Sammel-gelpuffer, 30 μ l TEMED, 60 μ l APS (10% (<i>w</i> / <i>v</i>))
SDS-Trenngelpuffer	3 M Tris/HCl, 0.4% (<i>w/v</i>) SDS, pH 8.85
SDS-Sammelgelpuffer	100 mM Tris/HCl, 0.4% (w/v) SDS, pH 6.8
SDS-Laufpuffer	250 mM Tris/HCl, 1% (w/v) SDS, 1.87 M Glycin, pH 8.3
SDS-Gel-Färbelösung	40% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure, 1 g/l Coomassie Brillant Blau
SDS-Gel-Entfärbelösung	40% (v/v) Ethanol, $10%$ (v/v) Essigsäure

Tabelle 2.12: Zusammensetzung der Gele und der verwendeten Puffer.

Die Proben wurden zunächst in einem 6%igen Sammelgel konzentriert und anschließend in einem 14%igen Trenngel aufgetrennt. Nach der elektrophoretischen Trennung bei 175 V für ca. 1 h wurden die Proteine im Gel mit Coomassie Brillant Blau-Lösung angefärbt (Fairbanks *et al.*, 1971).

2.2.6 Konzentrationsbestimmung von Protein- und Nukleinsäurelösungen mittels UV-Absorption

Die Konzentrationsbestimmung gereinigter Proteine erfolgte spektroskopisch an einem Nanophotometer (Implen) nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz (Gl. 2.1). Für die Berechnung der Proteinkonzentration wurde die Absorption bei 280 nm genutzt.

$$A_{280} = \varepsilon_{280} \times c \times d \qquad \qquad \text{Gl. 2.1}$$

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

Die Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine wurden nach Gill und von Hippel berechnet und sind in Tabelle 2.13 aufgelistet (Gill & von Hippel, 1989). Zusätzlich wurde die Extinktion bei 320 nm ermittelt. Dies diente der Analyse der Lichtstreuung und gab Hinweise auf Aggregate.

Die Konzentration des Oligonukleotids dT7 wurde über die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Der molare Extinktionskoeffizient für dT7 beträgt 58 800 $M^{-1} \times cm^{-1}$.

Tabelle 2.13: Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine.

Protein	$\epsilon (M^{-1} \times cm^{-1})$
17/10/ΔAla-L3-CspB/MCspB	5 500
17/10/∆Ala-L16-CspB/MCspB	5 500
17/10/ΔAla-N-MCspB	6 9 9 0

2.2.7 Fluoreszenzspektroskopie

Alle Fluoreszenzmessungen, auch die unter 2.2.10.3 und 2.2.10.6 beschriebenen Messungen mit fibrillärem Protein (siehe S. 33f), wurden an einem FluoroMax-2TM Spektro-fluorimeter mit 5 nm Spaltbreiten des Anregungs- und Emissionsstrahls bei 20°C durchgeführt.

2.2.7.1 Intrinsische Fluoreszenz

Die Messungen der intrinsischen Proteinfluoreszenz erfolgten in 1 cm-Küvetten bei einer Proteinkonzentration von 3 μ M. Die Emissionsspektren wurden von 300 - 400 nm nach Anregung bei 295 nm aufgenommen und pufferkorrigiert.

2.2.7.2 Aktivitätsmessungen

CspB besitzt die Eigenschaft einzelsträngige Nukleinsäuren mit hoher Affinität zu binden (Graumann & Marahiel, 1994). Die höchste Affinität konnte für die Bindung des Oligonukleotids dT7 an CspB festgestellt werden ($K_D = 1.8 \text{ nM} \pm 0.4 \text{ nM}$) (Zeeb *et al.*, 2006). Während der Bindung verringert sich die intrinsiche Tryptophanfluoreszenz von CspB um ca. 80%, da das einzige Trp des Proteins direkt an der Oligonukleotidbindung beteiligt ist (Zeeb *et al.*, 2006). Daher war es möglich zur Überprüfung der nativen Struktur von CspB eine Fluoreszenztitration durchzuführen.

Die Messungen erfolgten in 2 ml 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 mit einer Proteinkonzentration von 3 bzw. 0.1 μ M. Nach Anregung bei 295 nm wurde die Fluoreszenz bestimmt und dT7 in 0.25 bzw. 0.01 μ M-Schritten bis zu einer Konzentration von 6 bzw. 0.4 μ M titriert. Die Spektren wurden pufferkorrigiert und die Fluoreszenzabnahme berechnet. Die Analyse erfolgte je nach Variante am Maximum der Tryptophanfluoreszenzspektren. Die Spektren der monomeren Proteine wurden bei 352 nm ausgewertet und die der Fibrillen bei 340 nm (L3/16-Linkervarianten) bzw. ebenfalls bei 352 nm (Fusionen mit der N-terminalen Domäne). Für die Analyse wurde die relative Fluoreszenzabnahme gegen die dT7-Konzentration aufgetragen. Die sich ergebenden hyperbolen Bindungsisothermen wurden nach Gleichung 2.2 ausgewertet (Lohmann & Bujalowski, 1991).

$$Q = Q_{\max} \frac{A - \sqrt{A^2 - 4 \times n \times [P]_0 - [Y]_0}}{2 \times [P]_0}$$
Gl. 2.2

$$\mathbf{A} = K_{\mathrm{D}} + [\mathbf{P}]_0 + \mathbf{n} \times [\mathbf{Y}]_0$$

t dT7

2.2.8 Circulardichroismus

Fern-UV-CD-Spektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 195 - 250 nm in Quarzglasküvetten mit einer Schichtdicke von 0.01 cm und Nah-UV-CD-Spektren in einem Wellenlängenbereich von 250 - 300 nm bei einer Schichtdicke von 1 cm aufgenommen. Die Proteinkonzentration betrug 1 mg/ml. Die Spektren wurden bei 20°C, einer Geschwindigkeit von 10 nm/min, einer Spaltbreite von 1 nm und einer Glättung von 1 sec gemessen. Alle Spektren wurden zwanzigfach akkumuliert und pufferkorrigiert. Die gemessene Elliptizität Θ wurde anhand Gleichung 2.3 und 2.4 in die molare [Θ] und mittlere residuelle Elliptizität [Θ]_{MRW} umgerechnet.

$$[\Theta] = \frac{\Theta \times Mr}{c \times d \times 10}$$
Gl. 2.3

Θ	gemessene Elliptizität in mdeg
$[\Theta]$	molare Elliptizität in deg \times cm ² \times dmol ⁻¹
$[\Theta]_{MRW}$	mittlere residuelle Elliptizität in deg \times cm ² \times dmol ⁻¹
M _r	Molekulargewicht in Dalton
c	Proteinkonzentration in mg/ml
N _A	Anzahl der Aminosäuren im Proteinmolekül
d	Schichtdicke der Küvette in cm

2.2.9 Entfaltungs- und Rückfaltungsübergänge

2.2.9.1 Chemisch induzierte Entfaltungs- und Rückfaltungsübergänge

Die Faltung von CspB verläuft ohne das Auftreten charakterisierbarer Intermediate (Schindler *et al.*, 1995), d.h. der native und der denaturierte Zustand des Proteins stehen miteinander im Gleichgewicht und die Auswertung der Übergänge kann anhand eines Zweizustandsmodells erfolgen (Tanford, 1968). Dabei kann die thermodynamische Stabilität (Gibbs freie Energie der Denaturierung ΔG_D) bei beliebiger Harnstoffkonzentration im Gleichgewicht nach Gleichung 2.5 beschrieben werden.

$$\Delta G_D = -R \times T \times \ln K_D \qquad \qquad \text{Gl. 2.5}$$

$\Delta G_{ m D}$	thermodynamische Stabilität in J/mol
R	universelle Gaskonstante = $8.314472 \text{ J/(mol} \times \text{K})$
Т	absolute Temperatur in K
K _D	Gleichgewichtskonstante

Für die Analysen wurden die Fusionsproteine in 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 bei variierenden Harnstoffkonzentrationen und RT für mindestens eine Stunde inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung des Anteils nativer bzw. denaturierter Spezies mittels Fluoreszenzspektroskopie. Hierfür wurde der Emissionswert bei 345 nm nach einer Anregung von 295 nm über 60 s aufgezeichnet und anschließend gemittelt. Die Messungen erfolgten bei einer Proteinkonzentration von 3 μ M, die Spaltbreiten betrugen 5 nm und die Temperatur 20°C. Die genauen Denaturierungsmittelkonzentrationen wurden refraktometrisch nach Gleichung 2.6 bestimmt (Pace, 1986).

$$\begin{bmatrix} Harnstoff \end{bmatrix} = 117.66 \times \Delta N + 29.753 \times \Delta N^2 + 185.56 \times \Delta N$$
Gl. 2.6
[Harnstoff] Harnstoffkonzentration in M
 ΔN Änderung des Brechungsindexes

Für die Auswertung wurde der Anteil nativer Spezies aus den gemessenen Fluoreszenzwerten nach Gleichung 2.7 berechnet und gegen die Harnstoffkonzentration aufgetragen.

$$\alpha = \frac{(y_{obs} - y_D)}{(y_N - y_D)}$$
Gl. 2.7

α	relativer Anteil nativer Spezies
y _{obs}	experimentelle Daten
y _N	Messgröße des nativen Proteins
y _D	Messgröße des denaturierten Proteins

Zur Ermittlung der durchschnittlichen Messgröße des nativen (y_N) bzw. denaturierten (y_D) Proteins wurden die Fluoreszenzwerte in dem jeweiligen Plateau durch eine lineare Funktion beschrieben und der Schnittpunkt mit der y-Achse als y_N bzw. y_D eingesetzt.

Die Auswertung der Übergangskurve und die Bestimmung der thermodynamischen Parameter, Kooperativität m und thermodynamische Stabilität ΔG_D , erfolgte unter Anwendung von Gleichung 2.8.

$$\alpha = \frac{1}{1 + e^{-((\Delta G_D - m \times [D])/R \times T)}}$$
Gl. 2.8

α	relativer Anteil nativer Spezies
$\Delta G_{ m D}$	thermodynamische Stabilität in J/mol
т	Kooperativität in J/mol × M
[D]	Denaturierungsmittelkonzentration in M
R	universelle Gaskonstante = 8.314472 J/mol×K
Т	Temperatur in K

Die Harnstoffkonzentration, bei der der Anteil nativer und denaturierter Spezies gleich ist, wird als Übergangsmittelpunkt bezeichnet und kann mit Gleichung 2.9 beschrieben werden.

$$\left[Harnstoff\right]_{1/2} = \frac{\Delta G_D}{m}$$
Gl. 2.9

[Harnstoff] _{1/2}	Übergangsmittelpunkt in M
т	Kooperativität in J/mol × M
$\Delta G_{ m D}$	thermodynamische Stabilität in J/mol

2.2.9.2 Thermisch induzierte Entfaltungs- und Rückfaltungsübergänge

Thermisch induzierte Deund Renaturierungen wurden mit Hilfe des Circulardichroismus gemessen. Die Änderung der Sekundärstruktur mit ansteigender Temperatur wurde bei 205 nm in Quarzglasküvetten mit einer Schichtdicke von 0.1 cm verfolgt. Die Proteinkonzentration betrug 0.2 mg/ml und die Heizrate 1°C/min. Für die Datenpunkte wurde die Elliptizität alle 0.2°C über 8 sec gemittelt. Die Entfaltungen wurden für Fusionen mit CspB von 10 - 80°C und für Fusionen mit MCspB von 20 - 90°C gemessen. Die gemessene Elliptizität O wurde anhand der Gleichungen 2.3 und 2.4 (siehe S. 28) in die mittlere residuelle Elliptizität $[\Theta]_{MRW}$ umgerechnet, und die erhaltenen Werte nach Gleichung 2.7 (siehe S. 29) normiert. Anschließend wurde nach Gleichung 2.10 die Übergangstemperatur $T_{\rm m}$ berechnet. Für $\Delta C_{\rm P}$ (Änderung der Wärmekapazität bei Entfaltung des Proteins bei konstantem Druck) wurde ein konstanter Wert von 4.0 kJ/(mol×K) eingesetzt (Perl et al., 2000).

$$y_{obs}(T) = \frac{y_N^0 + m_N \times T + \left(y_U^0 + m_U \times T\right) \times e^{\left\{-\frac{\Delta H_U(Tm)}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{Tm}\right) - \frac{\Delta C_P}{R} \left[1 \times \frac{Tm}{T} + \ln\left(\frac{Tm}{T}\right)\right]\right\}}}{1 + e^{\left\{-\frac{\Delta H_U(Tm)}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{Tm}\right) - \frac{\Delta C_P}{R} \left[1 - \frac{Tm}{T} + \ln\left(\frac{Tm}{T}\right)\right]\right\}}}$$
Gl. 2.10

experimentelle Daten
spektroskopische Messgröße bei 0K
Steigung der Basislinien
Temperatur in K
Temperatur im Mittelpunkt des thermischen Übergangs in K
van't Hoff Enthalpie in J/mol
universelle Gaskonstante = $8.314472 \text{ J/(mol} \times \text{K})$
Änderung der Wärmekapazität in J/K

Die Variablen in Gleichung 2.10 wurden durch nichtlineare Regression an die experimentellen Daten (y_{obs}) angeglichen.

2.2.9.3 Stabilitätsmessungen mittels stopped-flow-Fluoreszenz

Die *stopped-flow*-Methode ermöglicht eine Messung der Geschwindigkeit von Proteinfaltungsreaktionen. Hierbei werden die Proteinlösung und der Puffer aus zwei Spritzen in eine Mischzelle geschossen und in eine Beobachtungsküvette überführt. Der zeitliche Verlauf der Reaktion wird spektroskopisch verfolgt.

Entfaltung und Rückfaltung wurde mit einem SX 20 *Stopped-flow*-Spektrometer (Applied Photophysics, Leatherhead, UK) mit Hilfe der Integralfluoreszenz oberhalb von 305 nm nach Anregung bei 280 nm bei 20°C bestimmt. Die Entfaltung des nativen Proteins erfolgte durch Verdünnung in 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 mit variierenden Harnstoffkonzentrationen. Für die Messung der Rückfaltungsreaktionen wurde das Protein zunächst eine Stunde lang in 4.6 M Harnstoff, 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Verdünnung der Proteinlösung in den gleichen Puffer mit verschiedenen Harnstoffkonzentrationen gestartet. Hierfür wurde jeweils ein Volumenteil Protein mit zehn Volumenteilen Puffer gemischt. Es wurden je fünf einzelne Progresskurven gemittelt. Anschließend erfolgte die Anpassung der Daten an eine Gleichung für eine einfach exponentielle Reaktion 1. Ordnung (Gl. 2.11).

$$y_{obs} = A \times e^{(-\lambda \times t)} + B$$
 Gl. 2.11

Yobs	experimentelle Daten
A	Signalamplitude
В	offset
λ	apparente Geschwindigkeitskonstante in s ⁻¹
t	Zeit in s
Der Logarithmus der apparenten Geschwindigkeitskonstanten λ wurde gegen die Harnstoffkonzentration aufgetragen. Die Abhängigkeit dieser Geschwindigkeitskonstanten von der Harnstoffkonzentration wird durch Gleichung 2.12 beschrieben.

$$\lambda = k_{NU}^{0} \times e^{(m_{NU} \times [D])} + k_{UN}^{0} \times e^{(m_{UN} \times [D])}$$
Gl. 2.12

 $\begin{array}{ll} \lambda & \text{apparente Geschwindigkeitskonstante in s}^{-1} \\ k^0_{\text{NU/UN}} & \text{extrapolierte Geschwindigkeitskonstanten in s}^{-1} \\ m_{\text{NU/UN}} & \text{kinetische Kooperativitätsparameter in J/mol} \times M \\ [D] & \text{Denaturierungsmittelkonzentration in M} \end{array}$

Aus den nach Gleichung 2.12 extrapolierten Geschwindigkeitskonstanten k_{NU} und k_{UN} wurde anschließend nach Gleichung 2.5 (siehe S. 29) die thermodynamische Stabilität ΔG_D ermittelt. Die Kooperativität *m* wurde aus den kinetischen Parametern m_{NU} und m_{UN} nach Gleichung 2.13 berechnet.

$$m = R \times T \times (m_{NU} - m_{UN})$$
Gl. 2.13

mKooperativität in J/mol × KRuniverselle Gaskonstante = 8.314472 J/(mol×K)TTemperatur in K $m_{NU/UN}$ kinetische Kooperativitätsparameter in J/mol × M

2.2.10 Fibrillierung und Fibrillencharakterisierung

2.2.10.1 Fibrillierungsansätze

Für die Fibrillenbildung wurden die Fusionsproteine in 500 µl 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, 0.1% Na-Azid, pH 7.5 bei 37°C entweder ohne Schütteln im Brutschrank oder unter Schütteln (500 rpm) im Eppendorf-Thermoschüttler inkubiert. Die Proteinkonzentration betrug 0.5 mM. Die Fibrillenbildung wurde mittels ANS-Fluoreszenz und Elektronenmikroskopie verfolgt. Des Weiteren wurde der Einfluss von Fibrillenfragmenten von 10Ala-CspB auf die Fibrillierung getestet. Hierfür wurden (Seeds) den Fibrillierungsansätzen 5% Seeds (w/w) zugesetzt.

2.2.10.2 Präparation von Seeds

Um zu testen, ob die Fibrillenbildung der monomeren Proteine durch fragmentierte Fibrillen (*Seeds*) beschleunigt werden kann, wurden zu den Fibrillierungsansätzen *Seeds* der Fibrillen von 10Ala-CspB hinzugegeben. Für die Herstellung der *Seeds* wurden die Fibrillen zunächst bei 105 000 g und 4°C für 1 h zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 2 M GdmCl, 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 gewaschen und der Überstand für eine indirekte

Konzentrationsbestimmung der *Seeds* zurückbehalten. Das gewaschene Pellet wurde erneut zentrifugiert und in 600 μ l 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 aufgenommen. Die Fragmentierung der Fibrillen erfolgte mittels Ultraschall mit einer Amplitude von 70% und einem Intervall von 0.5 für 15 × 10 s. Nachfolgend wurden die *Seeds* bei 200 000 g für 1 h zentrifugiert, in 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 gewaschen, erneut zentrifugiert und in einem geringen Volumen 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 aufgenommen, so dass die Konzentration an *Seeds* circa 25 μ g/ μ l betrug. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte indirekt durch Bestimmung der verbliebenen Menge löslichen Proteins im Überstand.

2.2.10.3 Detektion amyloider Fibrillen durch ANS- und ThT-Fluoreszenzmessungen

Zur Detektion von Fibrillen wurden Fluoreszenzmessungen mit den Fluoreszenzfarbstoffen 1-Anilino-8-naphtalensulfonsäure (ANS) und Thioflavin T (ThT) durchgeführt. Die Fluoreszenzspektren wurden bei einer jeweiligen Farbstoffkonzentration von 50 μ M in 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 und einer Proteinkonzentration von 5 μ M gemessen. Emissionsspektren von ANS wurden von 400 - 600 nm bei einer Anregungswellenlänge von 370 nm aufgenommen und Emissionsspektren von ThT von 460 - 550 nm bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm (ANS) bzw. 482 nm (ThT) ausgewertet.

2.2.10.4 Elektronenmikroskopie

Für die Elektronenmikroskopie wurden kohlebeschichtete Kupfergrids (Plano) verwendet. Diese wurden zunächst 1 min mit 0.1 mg/ml Bacitracin behandelt. Anschließend erfolgte für 3 min die Adsorption eines Aliquots des zu untersuchenden Fibrillierungsansatzes. Der Grid wurde nachfolgend dreimal 1 min mit bidestilliertem Wasser gewaschen. Die Kontrastierung erfolgte durch kurze Inkubation (15 s) in 1% (w/v) Uranylacetat. Die Aufnahmen wurden an einem EM 600 (Zeiss) von Herrn Dr. Gerd Hause (Biozentrum, MLU Halle-Wittenberg) angefertigt.

2.2.10.5 Präparation der Fibrillen für weitere Untersuchungen

Für weitergehende Untersuchungen wurden die Fibrillen zunächst bei 105 000 g und 4°C eine Stunde lang zentrifugiert. Das Fibrillenpellet wurde mit 1.5 M GdmCl, 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 gewaschen und erneut durch Zentrifugation abgetrennt. Anschließend wurde das Pellet mit 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 gewaschen, um das

vorhandene GdmCl vollständig zu entfernen. Die Konzentration der Fibrillen wurde mittels Tryptophan-Fluoreszenz bestimmt.

2.2.10.6 Konzentrationsbestimmung von Fibrillenlösungen mittels Tryptophan-Fluoreszenz

Die für die Bestimmung der Fibrillenkonzentration genutzte Methode basiert auf der Fluoreszenz von Proteinen in 6 M GdmCl (Pajot, 1976). Hierfür wurden die Fibrillen zunächst nach 2.2.10.5 präpariert, das Pellet in 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 aufgenommen und ein Teil der Lösung in 2 ml 6 M GdmCl, 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 verdünnt. Die Fluoreszenz der Lösung wurde nach Anregung bei 295 nm bestimmt. Anschließend wurde in acht Schritten 1 μ l einer 1 mM Tryptophanlösung hinzugegeben und nach jedem Titrationsschritt erneut die Fluoreszenz ermittelt. Die Fluoreszenzwerte bei 361 nm wurden nachfolgend gegen die Tryptophankonzentration im Messansatz aufgetragen. Für die sich daraus ergebende Gerade wurden der Anstieg (m) und der Schnittpunkt mit der y-Achse berechnet (y). Zudem wurde die Fluoreszenz des Puffers ohne Protein ermittelt (y₀). Anschließend wurde nach Gleichung 2.14 die ursprüngliche Proteinkonzentration im Messansatz (x) berechnet.

х	Proteinkonzentration im Messansatz in µM
m	Anstieg der Eichgerade
У	Schnittpunkt der Eichgerade mit der y-Achse
y ₀	Fluoreszenzwert des Puffers ohne Protein

2.2.10.7 Chemische Stabilität der Fibrillen

Um die chemische Stabilität gegenüber GdmCl zu bestimmen, wurden die Fibrillen in GdmCl-Konzentrationen verschiedenen anschließend aufgenommen und die Proteinkonzentration der löslichen, monomeren und der fibrillären Spezies bestimmt. Hierfür wurden dem Fibrillierungsansatz 30 µl Probe entnommen und mit 105 000 g bei 4°C eine Stunde lang zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 µl 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 mit verschiedenen GdmCl-Konzentrationen (0 - 5 M) resuspendiert und bei RT unter Schütteln 2 h lang inkubiert. Aus dieser Probe wurden 10 µl entnommen, in 790 µl 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 gegeben und nach Anregung bei 295 nm die intrinsische Fluoreszenz gemessen. Die restlichen 40 µl der resuspendierten Probe wurden erneut zentrifugiert, der Überstand abgenommen, und die Proteinkonzentration im Überstand mittels UV-Absorption bestimmt. Das Pellet wurde in 20 µl 6 M GdmCl, 5 mM KH₂PO₄,

100 mM NaCl, pH 7.5 unter Schütteln bei RT 2 h lang solubilisiert, und anschließend ebenfalls die Proteinkonzentration berechnet. Aus den ermittelten Proteinkonzentrationen wurden die absoluten Proteinmengen in µg im Überstand und Pellet ermittelt. Für die Auswertung wurden sowohl die Maxima der intrinsischen Fluoreszenz als auch die prozentuale Proteinmenge im Überstand bzw. Pellet in Abhängigkeit der GdmCl-Konzentration aufgetragen.

2.2.10.8 Proteolyse

In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass aus Poly-Alaninen bestehende Fibrillen eine hohe Resistenz gegenüber Proteasen besitzen (Forood *et al.*, 1995; Sackewitz, 2009; Scheuermann, 2003). Diese Stabilität ist vermutlich in der *Cross-* β -Struktur der Fibrillen begründet. Daher sollten Fibrillen durch eine Proteasebehandlung auf ihre *Cross-* β -Struktur reduziert werden. Um die Stabilität der in dieser Arbeit erzeugten Fibrillen gegenüber proteolytischem Abbau zu testen, wurden die nach 2.2.10.5 (siehe S. 33) vorbehandelten Fibrillen in 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 in einer Endkonzentration von 1 mg/ml gelöst und 1:50 (*w/w*) mit Proteinase K versetzt. Die Proteolyse erfolgte bei RT unter Schütteln über einen Zeitraum von bis zu 8 h. Die Reaktion wurde zum gewünschten Zeitpunkt mit 10 mM PMSF abgestoppt.

Für SDS-Polyacrylamid-Gele wurden 25 μ l des Reaktionsansatzes entnommen, mit 5 μ l SDS-Probenpuffer versetzt und 2 min lang bei 95°C inkubiert. Während der Inkubation wurde der Deckel des Reaktionsgefäßes geöffnet, um das Isopropanol, in welchem PMSF gelöst war, zu verdampfen.

Für die Bestimmung des proteolysegeschützten Bereiches wurde die Reaktion nach 2 h abgestoppt und der Ansatz 1 h lang bei 105 000 *g* und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde einmal mit 1.5 M GdmCl, 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 und einmal mit GdmClfreiem Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Pellet über Nacht bei RT unter Schütteln in 6 M GdmSCN, 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 solubilisiert und die erzeugten Peptide mittels *reversed phase* - HPLC gereinigt.

2.2.10.9 Reversed phase – HPLC

Die *reversed phase* - HPLC (*high performance liquid chromatography*) dient zur Auftrennung unterschiedlich hydrophober Peptide und wurde genutzt, um die solubilisierten Peptide, der unter 2.2.10.8 proteasebehandelten Fibrillen, aufzutrennen. Hierfür wurde eine Jupiter 5u C18 300 Å (250×4.6 mm) - Säule genutzt. Der Fluss betrug 0.7 ml/min. Als

Laufmittel wurde H₂O, 0.1% TFA (ν/ν) verwendet. Die Elution der Peptide erfolgte mit einem linear ansteigenden Gradienten von ACN, 0.1% TFA (ν/ν). Nach der Injektion von 100 µl Protein wurde 3 min mit Laufmittel gespült. Die Konzentration des Elutionsmittels wurde innerhalb von 70 min auf 50% und anschließend innerhalb von 27 min auf 100% erhöht. Die Aufzeichnung der Chromatogramme erfolgte bei 215 nm. Die Protein enthaltenden Fraktionen wurden aufgefangen und das Lösungsmittel mittels *SpeedVac* RC10.10 (Jouan) verdampft. Anschließend erfolgte die massenspektrometrische Analyse der Proteinproben.

2.2.11 Massenspektrometrie

Die Bestimmung der Massen der monomeren Fusionsproteine wurde von Frau Dr. A. Schierhorn durchgeführt (Forschungsstelle "Enzymologie der Proteinfaltung", Max-Planck-Gesellschaft, Halle). Hierfür wurden die mit Hilfe von *Zip-Tips*[®] (Millipore) entsalzten Proben durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie an einem REFLEXTM- oder UltraflexTM3-Spektrometer (Bruker-Franzen-Analytik) analysiert.

Die Massen der proteaseresistenten Fragmente der Fibrillen wurden von Herrn Dr. C. Ihling untersucht (Institut für Pharmazie, MLU Halle-Wittenberg). Die mittels *reversed phase* - HPLC gereinigten Proben wurden durch Elektrospray-Ionisation ionisiert und anschließend in einem LTQ Orbitrap XL – Hybrid Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen) vermessen. Die Gesamtspektren wurden deconvolutiert und die monoisotopischen Massen gegen die Sequenzen abgeglichen (max. Fehler = 3 ppm).

2.2.12 Röntgenbeugung

Für die Röntgenbeugungsmessungen wurden die Fibrillen dreimal mit Wasser gewaschen und anschließend für mindestens 72 h lyophilisiert. Die Aufnahme des Beugungsmusters wurde von Herrn M. Schöpfel durchgeführt (Institut für Biochemie und Biotechnologie, MLU Halle-Wittenberg). Die Proben wurden mit monochromatischer CuKα-Röntgenstrahlung ($\lambda = 1.54182$ Å) eines Drehanoden-Röntgengenerators (MicroMax 007, RigakuMSC, Tokio, Japan) vermessen. Die Detektion erfolgte mit einer *Imaging Plate* (Rigaku R-AxisVI++, Tokio, Japan). Die Daten wurden mit einem Drehwinkelinkrement von $\Delta \varphi = 0.01^{\circ}$ und einer Belichtungszeit zwischen 30 - 120 s aufgenommen.

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der Dissertation von Mirko Sackewitz deuteten darauf hin, dass der Abstand zwischen der amyloidogenen Sequenz und dem gefalteten Kälteschockprotein CspB einen wesentlichen Einfluss auf die Faltung und Aktivität von CspB in den Fibrillen besitzt (Sackewitz *et al.*, 2008, Sackewitz, 2009). Darauf aufbauend wurde in dieser Arbeit untersucht, wieviele Aminosäurereste zwischen der amyloidogenen Sequenz und CspB notwendig sind, um die Faltung von CspB in den Fibrillen aufrechtzuerhalten. Eine zweite wichtige Frage war, ob die thermodynamische Stabilität von CspB in den verschiedenen Fusionsproteinen eine Rolle für die Fibrillenbildung spielt.

3.1 Charakterisierung der löslichen Fusionsproteine mit einem Linker von drei und 16 Aminosäuren

Im Abschnitt 3.1 werden die löslichen, monomeren Fusionsproteine mit einem Linker von drei bzw. 16 Aminosäuren beschrieben. In der Nomenklatur bezeichnen "ΔAla", "10Ala" und "17Ala" die Länge der Alaninsequenz, "L3" sowie "L16" die Länge des Linkers und "CspB" bzw. "MCspB" Wildtyp-CspB und die stabilisierte CspB-Variante mit dem Aminosäureaustausch A46K/S48R. Im Folgenden werden die Begriffe L3- bzw. L16-Linkervarianten genutzt, um die Konstrukte mit den verschiedenen Linkerlängen unabhängig von der Anzahl der Alanine zusammenzufassen. Für eine bessere Übersichtlichkeit aller beschriebenen Varianten befindet sich am Ende der Dissertation eine herausklappbare Seite mit einer schematischen Darstellung der Fusionsproteine und deren Bezeichnung.

3.1.1 Reinigung der Fusionskonstrukte

Die Reinigung aller in dieser Arbeit beschriebenen Fusionsproteine mit CspB und MCspB erfolgte anhand des in der Dissertation von Mirko Sackewitz entwickelten Protokolls (siehe S. 24f, 2.2.4.1) (Sackewitz, 2009). Die dort beschriebene initiale Hitzefällung wurde aufgrund der geringen thermischen Stabilität einiger CspB-Konstrukte nicht durchgeführt (siehe S. 44, Abb. 3.6). Der erste Reinigungsschritt nach dem Zellaufschluss war eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass denaturierende Bedingungen sowohl zu einer besseren Reinigung der Konstrukte als auch zur Entfernung der an CspB gebundenen Nukleinsäuren führen (Sackewitz, 2009). Anschließend wurden die Fusionsproteine auf der Säule zurückgefaltet und eluiert. Nach der Ni-NTA-Affinitätschromatographie waren nur noch wenige

Verunreinigungen in der Proteinlösung enthalten, die durch eine sich anschließende Gelfiltration entfernt wurden. Die gereinigten Fusionsproteine sind in Abbildung 3.1 dargestellt.

Aus 20 g Zellfeuchtmasse konnten für Fusionen mit CspB zwischen 120 - 170 mg Protein gereinigt werden. Die Ausbeute für Fusionen mit MCspB war mit 180 - 220 mg aufgereinigtem Protein geringfügig höher. Die Identität und Homogenität der Proteine konnte mittels massenspektrometrischer Analyse bestätigt werden. Dabei wurde gezeigt, dass das Nterminale Methionin aller Fusionsproteine abgespalten war. Die Variante Δ Ala-L16-CspB neigte ab einer Konzentration von ca. 0.6 mM stark zur Aggregation. Dies konnte für die anderen Fusionsproteine nicht festgestellt werden. Durch Aufnahme von UV-Spektren nach der Reinigung konnten Aggregate der geringer konzentrierten Proteinlösungen für alle Fusionen ausgeschlossen werden (siehe Anhang S. 118, Abb. 8.1 A, B). Auch die vollständige Entfernung der Nukleinsäuren wurde durch die UV-Spektren bestätigt.



Abbildung 3.1: SDS-PA-Gel der gereinigten Fusionsproteine mit einem Linker von drei bzw. 16 Aminosäuren. Coomassie-gefärbt.

Alle gereinigten Proteine enthielten einen N-terminalen His-*Tag*, der für die nachfolgenden Untersuchungen nicht entfernt wurde. Bereits veröffentlichte Ergebnisse für die direkten Fusionen 10Ala-CspB und 17Ala-CspB waren stets für Proteine mit His-*Tag* beschrieben (Sackewitz *et al.*, 2008). Daher wurden auch die Versuche mit den L3/16-Linkervarianten mit His-*Tag* durchgeführt um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten. In Kapitel 3.6 ist ausführlich dargelegt, dass der His-*Tag* weder einen Einfluss auf die Faltung von CspB noch auf die *lag*-Phase der Fibrillenbildung der Fusionsproteine besitzt (siehe S. 83ff).

3.1.2 Nachweis von nativem CspB und MCspB in den monomeren Fusionsproteinen

Mit Hilfe der Fern-UV-CD-Spektroskopie wurden zunächst die Sekundärstrukturanteile der verschiedenen Fusionsproteine analysiert. Anschließend wurden die Strukturanteile mit denen des nicht-fusionierten CspB verglichen, um einen eventuellen Einfluss der N-terminal fusionierten Aminosäuren auf die Sekundärstruktur von CspB festzustellen. Abbildung 3.2 zeigt die Fern-UV-CD-Spektren der L3- und L16-Linkervarianten fusioniert mit CspB (A) und MCspB (B). Das Referenzspektrum von CspB entspricht den in der Literatur beschriebenen Daten (Abb. 3.2 A, blaue Linie) (Schindler *et al.*, 1995). Die Struktur von CspB wird hauptsächlich durch β-Faltblatt- und *random-coil*-Strukturanteile geprägt (Schindelin *et al.*, 1993).



Abbildung 3.2: Fern-UV-CD-Spektren der Fusionen mit CspB (A) und MCspB (B). Die Spektren wurden in 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 bei 20°C gemessen. CspB in blau, L3-Linkervarianten in schwarz, L16-Linkervarianten in rot. Δ Ala - durchgezogene Linien, 10Ala - gestrichelte Linien, 17Ala - kurz gestrichelte Linien.

Die Fusion des L3- bzw. L16-Linkers ohne Alanine führte zu einer Abnahme der Intensität der Spektren in Abhängigkeit der Länge des Linkers, wobei der Verlauf der Spektren ähnlich ist (Abb. 3.2 A, durchgezogene Linien). Die Spektren weisen ein absolutes Maximum bei 198 nm und ein lokales Maximum bei ca. 220 nm auf. Lediglich das Minimum der Spektren verschiebt sich von 210 nm bei CspB zu niedrigeren Wellenlängen, 207 nm bei Δ Ala-L3-CspB und 204 nm bei Δ Ala-L16-CspB. Dies deutet darauf hin, dass der Anteil an *random-coil*-Strukturen im Gesamtprotein zunimmt.

Die Fusion von zehn Alaninen resultierte im Kontext beider Linkervarianten nochmalig in einer Verringerung der Intensität des CD-Signals und in einer geringen Verschiebung der Minima und Maxima der Spektren (Abb. 3.2 A, gestrichelte Linien). Dies weist wiederum auf einen erhöhten Anteil an *random-coil*-Strukturen, verursacht durch die zusätzlichen zehn Alanine, im Gesamtprotein hin.

Die Erweiterung der Alaninsequenz auf 17 Alanine führte zu einer deutlichen Veränderung des CD-Signals (Abb. 3.2 A, kurz gestrichelte Linien). Es kommt zu einer Verschiebung des absoluten Maximums zu einer Wellenlänge unterhalb von 196 nm. Weiterhin ist ein absolutes Minimum bei ca. 206 nm und ein lokales Minimum bei ca. 222 nm zu beobachten. Diese Veränderungen im CD-Spektrum lassen auf eine Zunahme an α -helikaler Struktur im Kontext der 17 Alanine schließen. Ähnliche Veränderungen der CD-Spektren wurden bereits bei den direkten Fusionen aus Alaninpeptiden und CspB beobachtet (Sackewitz *et al.*, 2008). Die CD-Spektren der verschiedenen Fusionen mit MCspB haben einen ähnlichen Verlauf wie die CD-Spektren der Fusionen mit CspB (Abb. 3.2 B). Ein Einfluss der Mutation A46K/S48R auf die Sekundärstrukturanteile der Fusionsproteine kann demnach ausgeschlossen werden.

Anschließend wurden durch Fluoreszenz- und Nah-UV-CD-Messungen die tertiären Kontakte von CspB und MCspB bestimmt, um zu überprüfen, ob (M)CspB trotz der unterschiedlichen Sekundärstrukturanteile in den Fusionsproteinen nativ gefaltet vorlag. Da sich das einzige, in den Fusionen vorhandene, Tryptophan an Position acht im (M)CspB befindet, konnte dieser Aminosäurerest zur Überprüfung des Faltungszustandes genutzt werden. Zunächst wurde die intrinsische Tryptophanfluoreszenz der Fusionen unter nativen Bedingungen und nach Denaturierung mit 6 M GdmCl bestimmt (siehe Anhang S. 119, Abb. 8.2 A, B). Das Maximum der Fluoreszenzspektren verschob sich um 8 nm von 352 nm im nativen Zustand auf 360 nm im denaturierten Zustand. Weiterhin war durch die Denaturierung die Fluoreszenzintensität um ca. 50% verringert. Dies konnte bereits für nichtfusioniertes (M)CspB besitzen demnach die gleichen optischen Eigenschaften bezüglich der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz.

Um den Faltungszustand von (M)CspB in den Fusionsproteinen näher zu charakterisieren, wurden Nah-UV-CD-Messungen durchgeführt (Abb. 3.3). Die resultierenden Spektren werden durch die molekulare Umgebung der aromatischen Aminosäuren geprägt und sind ein exaktes Kriterium für den korrekten Faltungszustand eines Proteins.

Der Verlauf der Nah-UV-CD-Spektren von (M)CspB und den verschiedenen Fusionen ist nahezu identisch und lässt auf eine unveränderte molekulare Umgebung des einzigen Tryptophanrestes in nicht-fusioniertem (M)CspB und den Fusionen schließen. Es bleibt zu erwähnen, dass die Intensitäten der Spektren von Fusionen mit MCspB minimal höher sind als die der Fusionen mit CspB. In der Variante A46K/S48R werden zwischen den β -Strängen eins und vier zwei zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen sowie eine Salzbrücke ausgebildet (Max *et al.*, 2007). Dies könnte dazu führen, dass sich das Tryptophan in MCspB in einer geringfügig veränderten molekularen Umgebung befindet.



Abbildung 3.3: Nah-UV-CD-Spektren der Fusionen mit CspB (A) und MCspB (B). Die Messung der Spektren erfolgte in 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 bei 20°C. L3-Linkervarianten in schwarz, L16-Linkervarianten in rot. Varianten ohne, mit zehn bzw. mit 17 Alaninen wurden in der Farbgebung nicht unterschieden, da die Spektren nahezu identisch sind. Die blaue Linie entspricht dem Spektrum für CspB (A) bzw. MCspB (B).

Um zu bestätigen, dass (M)CspB auch im Kontext der Fusionsproteine aktiv vorlag, wurde die Eigenschaft von (M)CspB einzelsträngige Nukleinsäuren zu binden getestet. Durch die Nukleinsäurebindung des Oligonukleotids dT7 wird die intrinsiche Tryptophanfluoreszenz von (M)CspB verringert. Abbildung 3.4 zeigt die ermittelten Bindungsisothermen für die L3und L16-Linkervarianten, fusioniert mit (M)CspB.

Zunächst wurden mittels Aktiver-Zentren-Titration bei einer Proteinkonzentration von 3 µM die Bindungsstöchiometrien bestimmt (Abb. 3.4 A, C). Bei geringen dT7-Konzentrationen wurde eine lineare Abhängigkeit des abnehmenden Fluoreszenzsignals von der dT7-Konzentration beobachtet. Ab einer dT7-Konzentration von ca. 2.5 µM werden die Bindungsisothermen durch eine asymptotische Funktion beschrieben, und es kann von einer vollständigen Sättigung ausgegangen werden. Da CspB für dT7 einen K_D-Wert im nM-Bereich aufweist (Max et al., 2006), erfolgte die Bestimmung des K_D-Wertes für die Fusionsproteine mittels Gleichgewichts-Titration bei einer Proteinkonzentration von 100 nM. Bei dieser Proteinkonzentration erfolgt die Titration annähernd unter Gleichgewichtsbedingungen zwischen den freien Bindungspartnern und dem Komplex. Die hierbei ermittelten Bindungsisothermen sind in Abbildung 3.4 B, D dargestellt. Die berechneten Dissoziationskonstanten K_D sowie die Bindungsstöchiometrien sind für alle Fusionskonstrukte in Tabelle 3.1 gezeigt.



Abbildung 3.4: dT7-Bindungsisothermen der L3- und L16-Linkervarianten fusioniert mit (M)CspB. (A, C) Aktive-Zentren-Titration mit einer Proteinkonzentration von 3 μ M. (B, D) Gleichgewichts-Titration bei einer Proteinkonzentration von 100 nM. Die Messungen wurden in 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 bei 20°C durchgeführt.

-	Tabelle 3.1: K _D -Werte und	Stöchiometrien der	Bindung von dT7	' durch (M)CspB	in den Fusionen.
---	--	--------------------	-----------------	-----------------	------------------

Fusionsprotein	$K_{\rm D}({\rm nM})$	Stöchiometrie
17Ala-L3-CspB	4.7 ± 0.9	0.92
10Ala-L3-CspB	19.6 ± 1.9	0.83
∆Ala-L3-CspB	17.4 ± 1.3	0.88
17Ala-L16-CspB	10.6 ± 2.0	0.81
10Ala-L16-CspB	9.3 ± 1.8	0.83
ΔAla-L16-CspB	7.9 ± 1.2	0.84
17Ala-L3-MCspB	3.4 ± 0.8	0.89
10Ala-L3-MCspB	5.9 ± 1.5	0.83
∆Ala-L3-MCspB	10.2 ± 1.3	0.82
17Ala-L16-MCspB	18.9 ± 0.7	0.89
10Ala-L16-MCspB	3.6 ± 1.0	0.93
Δ Ala-L16-MCspB	4.1 ± 0.9	0.80

Sowohl die Fusionsproteine mit CspB als auch die Fusionen mit MCspB wiesen im Vergleich zu nicht-fusioniertem (M)CspB eine identisches dT7-Bindung auf. Die K_D -Werte von CspB und MCspB liegen mit 23.4 ± 5.2 nM bzw. 23.8 ± 2.8 nM im niedrigen nanomolaren Bereich (Sackewitz, 2009; Winter, 2008).

Zusammen mit den Ergebnissen der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz und der Nah-UV-CD-Spektren zeigt die Analyse der Nukleinsäurebindung, dass CspB und MCspB auch in den verschiedenen Fusionen mit Alaninpeptiden und Linkern korrekt gefaltet und nativ vorlag.

3.1.3 Bestätigung einer erhöhten thermodynamischen Stabilität von Fusionen mit MCspB

Die Bestimmung der thermodynamischen Stabilität ΔG_D (Gibbs freie Energie der Denaturierung) von CspB und MCspB in den Fusionen erfolgte mittels chemisch-induzierter Gleichgewichtsübergänge (Abb. 3.5). Die Entfaltungen waren stets reversibel, und für die jeweiligen Rückfaltungen wurden identische Kurven ermittelt (siehe Anhang S.120, Abb. 8.3). Die thermodynamischen Parameter sind in Tabelle 3.2 dargestellt.



Abbildung 3.5: Chemisch-induzierte Denaturierung der Fusionen mit CspB und MCspB. (A) Fusionen mit einem Linker von drei Aminosäuren. (B) Fusionen mit einem Linker von 16 Aminosäuren. Die Messungen erfolgten in 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 mit variierenden Harnstoffkonzentrationen bei einer Proteinkonzentration von 3 μ M und einer Temperatur von 20°C. Die Emission wurde bei 345 nm nach einer Anregung bei 295 nm bestimmt. Fusionen mit CspB, durchgezogene Linien und Kreise; Fusionen mit MCspB, gestrichelte Linien und Quadrate. Die blauen Linien entsprechen der Entfaltung von CspB bzw. MCspB.

Fusionsprotein	$\Delta G_{\rm D}$ (kJ/mol)	<i>m</i> (kJ/mol M)	$D_{1/2}(M)$	$T_{\rm m}$ (°C)
CspB	$12.4 \pm 0.9*$	$3.7 \pm 0.3*$	3.4*	52.1 ± 0.1
17Ala-L3-CspB	6.0 ± 0.4	4.0 ± 0.2	1.5	35.6 ± 0.2
10Ala-L3-CspB	6.0 ± 0.5	3.5 ± 0.2	1.7	36.7 ± 0.3
∆Ala-L3-CspB	$9.8\ \pm 0.6$	4.3 ± 0.2	2.3	40.0 ± 0.1
17Ala-L16-CspB	7.9 ± 0.5	3.6 ± 0.2	2.2	40.3 ± 0.3
10Ala-L16-CspB	7.8 ± 0.6	3.4 ± 0.2	2.3	40.6 ± 0.3
∆Ala-L16-CspB	6.8 ± 0.4	3.2 ± 0.1	2.1	40.3 ± 0.4
MCspB	$26.9 \pm 2.0^{\#}$	$4.8\pm0.4^{\#}$	5.6#	67.2 ± 0.1
17Ala-L3-MCspB	12.8 ± 0.6	3.2 ± 0.1	4.0	58.4 ± 0.1
10Ala-L3-MCspB	14.5 ± 0.6	3.4 ± 0.1	4.3	58.6 ± 0.1
∆Ala-L3-MCspB	15.1 ± 0.6	3.4 ± 0.1	4.4	60.3 ± 0.1
17Ala-L16-MCspB	16.4 ± 0.7	3.6 ± 0.1	4.6	59.7 ± 0.1
10Ala-L16-MCspB	15.1 ± 0.7	3.3 ± 0.1	4.6	59.3 ± 0.1
∆Ala-L16-MCspB	17.5 ± 0.7	3.8 ± 0.1	4.6	59.5 ± 0.1

Tabelle 3.2: Thermodynamische Parameter der chemischen und thermischen Entfaltung. Gekennzeichnete Parameter wurden aus anderen Arbeiten übernommen (*gemessen bei 25°C, Sackewitz *et al.*, 2008; [#]Winter, 2008).

Nicht-fusioniertes, freies CspB besitzt eine thermodynamische Stabilität ΔG_D von 12.4 ± 0.9 kJ/mol (Sackewitz *et al.*, 2008). Nach der Fusion von zehn oder 17 Alaninen, verbunden über einen Linker von drei Aminosäuren (L3), wurde die thermodynamische Stabilität ΔG_D auf 6.0 kJ/mol reduziert. Wurde der Linker zwischen den Alaninen und CspB auf 16 Aminosäuren (L16) erweitert, konnte ein geringfügig höherer ΔG_D -Wert von ca. 7.8 kJ/mol ermittelt werden. Demnach besitzt die Linkerlänge zwischen den Alaninen und CspB einen Einfluss auf die thermodynamische Stabilität von CspB in den Fusionen.

Des Weiteren wurden für alle Fusionen thermisch-induzierte Entfaltungen mittels CD-Spektroskopie gemessen (Abb. 3.6). Alle Entfaltungen waren vollständig reversibel.



Abbildung 3.6: Thermisch-induzierte Denaturierung der Fusionen mit CspB und MCspB. (A) Fusionen mit einem Linker von drei Aminosäuren. (B) Fusionen mit einem Linker von 16 Aminosäuren. Die Denaturierungen wurden bei 205 nm in 5 mM KH_2PO_4 , 100 mM NaCl, pH 7.5 bei einer Proteinkonzentration von 0.2 mg/ml gemessen. Fusionen mit CspB in schwarz, Fusionen mit MCspB in rot. Δ Ala - durchgezogene Linien, 10Ala - gestrichelte Linien, 17Ala - kurz gestrichelte Linien. Die blauen Linien repräsentieren die Entfaltung von CspB bzw. MCspB.

Auch die Übergangsmittelpunkte der thermischen Entfaltung sind in Tabelle 3.2 dargestellt. Nicht-fusioniertes CspB bzw. MCspB besitzt unter den hier genutzten Pufferbedingungen (5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5) einen Übergangsmittelpunkt von ca. 52 bzw. 67°C. Diese Daten stimmen mit den bereits in der Literatur veröffentlichten Werten von 53.8 (CspB) bzw. 69.7°C (MCspB) nahezu überein (Wunderlich *et al.*, 2005). Der sehr geringe Unterschied lässt sich durch den abweichenden Puffer (100 mM Na-Cacodylat, pH 7.0) in der Veröffentlichung von Schmid und Mitarbeitern erklären (Wunderlich *et al.*, 2005).

Die Übergangsmittelpunkte der thermisch-induzierten Entfaltungen korrelierten mit den berechneten ΔG_D -Werten der chemisch-induzierten Gleichgewichtsübergänge (Tab. 3.2). Diese Daten verdeutlichen, dass die Stabilität von CspB in allen Fusionen mit WT-CspB verringert ist. Die stärkste Destabilisierung von CspB wurde beobachtet, wenn CspB von den Alaninpeptiden durch einen Linker von drei Aminosäuren getrennt war. War nur der L3-Linker an CspB fusioniert (Δ Ala-L3-CspB), konnte ein ΔG_D -Wert von 9.8 kJ/mol bestimmt werden. Somit wird ein Großteil der Destabilisierung durch die Alanine und nicht durch den Linker verursacht.

Für alle Fusionsproteine mit MCspB konnten annähernd identische Übergangskurven ermittelt werden (Abb. 3.5, 3.6). Die Anwesenheit der N-terminal fusionierten Peptide führte generell zu einer Destabilisierung von MCspB um ca. 10 kJ/mol, unabhängig von der Länge des Linkers oder des Alaninpeptids. Dennoch führte die Mutation A46K/S48R zu einer Erhöhung der thermodynamischen Stabilität um ca. 8 kJ/mol im Vergleich zu den Fusionen mit WT-CspB.

Da die Faltung von CspB ohne charakterisierbare Intermediate nach einem Zweizustandmodells erfolgt (Schindler *et al.*, 1995), stellte sich die Frage, ob dieses Modell auch auf die Faltung der Fusionen angewendet werden kann. Hierfür wurde exemplarisch anhand der Variante 17Ala-L16-CspB der zeitliche Verlauf der Entfaltungs- und Rückfaltungsreaktion mittels *stopped-flow*-Fluoreszenzspektroskopie bestimmt. Der Logarithmus der dabei ermittelten apparenten Geschwindigkeitskonstanten wurde in einem Chevron-Plot gegen die Harnstoffkonzentration aufgetragen (Abb. 3.7 A).

Sowohl der Entfaltungs- als auch der Rückfaltungsast des Chevron-Plots war für 17Ala-L16-CspB linear. Dies deutet darauf hin, dass auch im Kontext der 17 Alanine und des Linkers von 16 Aminosäuren die Faltung ohne Intermediate verläuft. Die thermodynamische Stabilität ΔG_D von 17Ala-L16-CspB ist im Vergleich zur Stabilität von CspB um ca. 5 kJ/mol reduziert. Die extrapolierte Geschwindigkeitskonstante für die Entfaltung ist mit 11 s⁻¹

praktisch identisch mit dem Wert für CspB (Abb. 3.7 B). Der Entfaltungsast des Chevron-Plots ist sehr flach, da die Entfaltung von CspB fast unabhängig von der Harnstoffkonzentration verläuft. Dies ist zwar ungewöhnlich, aber bereits für Wildtyp-CspB beschrieben (Schindler *et al.*, 1995). Die Rückfaltungsreaktion von 17Ala-L16-CspB ist mit einem Wert von 120 s⁻¹ ca. neun mal langsamer als die Rückfaltung von CspB (Abb. 3.7 B). Dies ist wahrscheinlich auf die zusätzlichen N-terminalen Aminosäuren von 17Ala-L16-CspB zurückzuführen. Die langsame Rückfaltung bei gleichen Entfaltungsgeschwindigkeiten ist die Ursache für die geringere Stabilität von 17Ala-L16-CspB.



Abbildung 17Ala-L16-CspB bestimmt 3.7: **Chevron-Plot** von durch stopped-flow-Fluoreszenzspektroskopie. (A) Faltungsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit der Harnstoffkonzentration bei 20°C. Die Rückfaltungsexperimente sind als offene und die Entfaltungsexperimente als geschlossene Kreise dargestellt. Die durchgezogene Linie entspricht der Angleichung an die experimentellen Daten auf der Zweizustandmodells. Gestrichelte Linien sind extrapolierte Grundlage des Rückfaltungsund Entfaltungsgeschwindigkeiten. (B) Kinetische Daten von 17Ala-L16-CspB und CspB. Die Kinetiken wurden bei einer Anregung von 280 nm und einer Integralemission oberhalb von 305 nm aufgenommen. Die Proteinkonzentration betrug 3 µM in 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 mit variierenden Harnstoffkonzentrationen. Gekennzeichnete Parameter wurden nicht in dieser Arbeit bestimmt (*gemessen bei 25°C in 0.1 M Na-Cacodylat, pH 7.0, Schindler et al., 1995).

Beim Vergleich der Parameter für 17Ala-L16-CspB aus den kinetischen Messungen mit den Experimenten unter Gleichgewichtsbedingungen fällt auf, dass der aus den kinetischen Messungen ermittelte ΔG_D -Wert von 5.8 kJ/mol um ca. 2 kJ/mol von dem ΔG_D -Wert aus dem Experiment unter Gleichgewichtsbedingungen abweicht. Die Übergangsmittelpunkte stimmen mit 2.1 M und 2.2 M Harnstoff überein (siehe S. 44, Tab. 3.2). Demzufolge ist die abweichende thermodynamische Stabilität ΔG_D auf die unterschiedlichen Werte für die Kooperativität *m* zurückzuführen. Dieser Unterschied von ca. 1 kJ/mol×M zwischen den kinetischen Messungen und den Experimenten unter Gleichgewichtsbedingungen liegt allerdings im Bereich des für Wildtyp-CspB beobachteten Unterschiedes und ist somit nicht signifikant (vergleiche 2.8 kJ/mol×M mit 3.6 kJ/mol×M) (Abb. 3.7 B; siehe S. 44, Tab. 3.2).

Die Faltung von 17Ala-L16-CspB verläuft also ohne charakterisierbare Intermediate. Daher wurde auch für alle anderen Fusionskonstrukte angenommen, dass die Faltung nach einem kinetischen Zweizustandsmodell erfolgt.

3.2 Charakterisierung der löslichen Fusionsproteine aus Nterminalen Domänen mit MCspB

Im folgenden Abschnitt werden die löslichen Fusionsproteine aus den drei Nterminalen Domänen von PABPN1 (Δ /10/17Ala) mit stabilisiertem MCspB charakterisiert. Diese Varianten sind ebenfalls am Ende der Dissertation schematisch dargestellt. Die Aminosäuresequenzen der Fusionen sind im Anhang zu finden (siehe S. 117). In Kapitel 3.4 wird anschließend untersucht, ob die stabilisierende Mutation A46K/S48R die Fibrillierung beeinflussen kann, obwohl sich zwischen den Alaninpeptiden und CspB ca. 100 Aminosäurereste befinden (siehe S. 67ff). Wenn die amyloidogene Sequenz in den Fusionen mit der N-terminalen Domäne tatsächlich strukturell unabhängig von CspB vorliegt, sollte keine Beeinflussung nachzuweisen sein.

Die Fusionen mit WT-CspB wurden in der Dissertation von Mirko Sackewitz mit den Namen N-ΔAla-CspB, N-WT-CspB und N-(+7)Ala-CspB bezeichnet (Sackewitz, 2009). Zur Vereinfachung und zur besseren Eingliederung in die Nomenklatur der L3/16-Linkervarianten werden die Fusionen im Folgenden mit ΔAla-N-(M)CspB, 10Ala-N-(M)CspB und 17Ala-N-(M)CspB bezeichnet, wobei das "N" für die N-terminale Domäne von PABPN1 steht.

3.2.1 Reinigung der Fusionskonstrukte

Abbildung 3.8 zeigt die gereinigten Fusionen der N-terminalen Domänen von PABPN1 mit MCspB. Auch diese Fusionen wurden anhand des in der Dissertation von Mirko Sackewitz erstellten Protokolls gereinigt (Sackewitz, 2009). Obwohl die Fusionen eine molekulare Masse von ca. 23 kDa besitzen, wanderten sie in der SDS-PAGE bei ca. 35 kDa. Diese Differenz wurde bereits in der Arbeit von Mirko Sackewitz beschrieben und beruht vermutlich auf dem niedrigen isoelektrischen Punkt der N-terminalen Domäne von 4.6 (Sackewitz, 2009). Des Weiteren konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass die isolierten N-terminalen Domänen ein abnormales Laufverhalten in der SDS-PAGE aufweisen (Scheuermann *et al.*, 2003).

Aus 20 g Zellfeuchtmasse konnte von diesen Fusionen zwischen 50 und 70 mg Protein gereinigt werden. Die Identität und Homogenität der Proteine wurde mittels massenspektrometrischer Analyse bestätigt. Dabei konnte gezeigt werden, dass auch hier das N-terminale Methionin abgespalten war. Durch Aufnahme von UV-Spektren nach der Reinigung wurde die vollständige Entfernung der Nukleinsäuren von MCspB bestätigt und die Existenz von Aggregaten ausgeschlossen (siehe Anhang S. 118, Abb. 8.1 C).





3.2.2 Nachweis von nativem MCspB in den Fusionen mit den N-terminalen Domänen

Wie bereits für die Fusionsproteine mit den Linkern erfolgt, wurde zunächst der Sekundärstrukturgehalt der Fusionen von MCspB mit den N-terminalen Domänen analysiert. In Abbildung 3.9 sind die Fern-UV-CD-Spektren gezeigt. Trotz der Differenz von zehn Alaninen ist zwischen den Spektren von Δ Ala-N-MCspB und 10Ala-N-MCspB kaum ein Unterschied erkennbar. Aus den Spektren ist ersichtlich, dass signifikante Merkmale einer *random-coil*-Struktur vorhanden sind.



Abbildung 3.9: Fern-UV-CD-Spektren der Fusionen der N-terminalen Domänen mit MCspB. Die Spektren wurden in 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 bei 20°C gemessen. MCspB in blau, Δ Ala-N-MCspB durchgezogene Linie, 10Ala-N-MCspB gestrichelte Linie, 17Ala-N-MCspB - kurz gestrichelte Linie. Das Spektrum von 17Ala-N-MCspB zeigt ein leicht verschobenes absolutes Minimum von 202 auf 204 nm, eine Schulter im Bereich zwischen 222 und 226 nm und ein ansteigendes Signal zwischen 200 und 195 nm. Dadurch lässt sich hier ein minimal erhöhter Anteil an α -helikaler Struktur im Protein vermuten. Insgesamt sind die Fern-UV-CD-Spektren aller Fusionen von MCspB mit den N-terminalen Domänen aber eher durch einen hohen Anteil von *random-coil*-Struktur gekennzeichnet. Dies ist durch die N-terminale Domäne von PABPN1 bedingt, welche nur sehr geringe Anteile an Sekundärstrukturelementen aufweist (Scheuermann, 2003) und zu den nativ entfalteten Protein-Domänen gehört (siehe Einleitung S.3, 1.3.1). Die hier gezeigten Spektren der Fusionen mit MCspB ähneln im Verlauf den Spektren der nicht fusionierten N-terminalen Domänen. Die β -Faltblattanteile von MCspB haben in Zusammenhang mit den unstrukturierten N-terminalen Domänen kaum einen Einfluss auf die Fern-UV-CD-Spektren. Ähnliche Ergebnisse konnten in früheren Arbeiten für Fusionen der N-terminalen Domänen mit Wildtyp-CspB gezeigt werden (Sackewitz, 2009).

Die korrekte Faltung von MCspB konnte auch für Fusionen mit den N-terminalen Domänen durch Fluoreszenz- und Nah-UV-CD-Messungen überprüft werden, da die Nterminale Domäne kein zusätzliches Tryptophan enthält. Das Maximum der intrinsischen Fluoreszenz verschob sich ähnlich den verschiedenen Linkervarianten von 352 nm im nativen Zustand auf 359 nm im denaturierten Zustand (siehe Anhang S.119, Abb. 8.2 C). Demnach ist MCspB sowohl unfusioniert als auch in den Fusionen mit den N-terminalen Domänen ähnlich strukturiert.

Auch der Verlauf der Nah-UV-CD-Spektren von fusioniertem und nicht-fusioniertem MCspB ist nahezu identisch (Abb. 3.10). Lediglich im Bereich zwischen 250 und 260 nm weichen die Intensitäten der Spektren des N-terminal fusionierten MCspB leicht von nicht-fusioniertem MCspB ab (vergleiche Abb. 3.10, schwarze Linien mit blauer Linie).



Abbildung 3.10: Nah-UV-CD-Spektren der Fusionen der N-terminalen Domänen mit MCspB. Die Messungen erfolgten in 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 bei 20°C. Die Spektren der Fusionsproteine wurden in der Farbgebung nicht unterschieden, da sie nahezu identisch sind. Die blaue Linie entspricht dem Nah-UV-CD-Spektrum von MCspB. Diese Intensitätsschwankung konnte im Rahmen der Dissertation nicht erklärt werden. Möglicherweise wird der Unterschied durch ein in der N-terminalen Domäne vorkommendes Tyrosin verursacht. Da allerdings der Verlauf der Nah-UV-CD-Spektren gleich ist und die Intensitätsschwankung nur den Bereich von 250 - 260 nm betrifft, wurde trotzdem davon ausgegangen werden, dass die molekulare Umgebung des in MCspB vorkommenden Tryptophans zwischen fusioniertem und nicht-fusioniertem MCspB ähnlich ist.

Um zu bestätigen, dass MCspB in den Fusionen aktiv vorlag, wurde die Nukleinsäurebindung der Proteine getestet. Abbildung 3.11 zeigt die aus den Aktive-Zentrenund Gleichgewichts-Titrationen ermittelten Bindungsisothermen. Die dazugehörigen Dissoziationskonstanten K_D sowie Bindungsstöchiometrien sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

Wie bereits erwähnt, weist MCspB mit 23.8 ± 2.8 nM eine Dissoziationskonstante im nanomolaren Bereich auf (Winter, 2008). Die Dissoziationskonstanten der Fusionsproteine mit 7.9 bis 23.7 nM belegen eine vergleichbare dT7-Bindung (Tab. 3.3). Eine ähnliche Affinität für dT7 in den Fusionsproteinen konnte bereits durch Mirko Sackewitz für Fusionen aus N-terminalen Domänen und Wildtyp-CspB gezeigt werden (Sackewitz *et al.*, 2008).



Abbildung 3.11: dT7-Bindungsisothermen der Fusionen aus N-terminalen Domänen mit MCspB. (A) Aktive-Zentren-Titration bei einer Proteinkonzentration von 3 μ M. (B) Gleichgewichts-Titration bei einer Proteinkonzentration von 100 nM. Die Messungen wurden bei 20°C in 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 durchgeführt.

Tabelle 3.3: K_D-Werte und Stöchiometrien der Bindung von dT7 durch MCspB in den Fusionen.

Fusionsprotein	$K_{\rm D}({\rm nM})$	Stöchiometrie
17Ala-N-MCspB	23.7 ± 1.5	0.76
10Ala-N-MCspB	7.9 ± 1.3	0.74
$\Delta Ala-N-MCspB$	8.0 ± 1.5	0.75

Anhand der spektroskopischen Charakterisierung und der dT7-Bindung konnte gezeigt werden, dass MCspB auch in den Fusionen mit den verschiedenen N-terminalen Domänen nativ gefaltet vorlag.

3.2.3 Reduzierte thermodynamische Stabilität von MCspB in den Fusionen mit den N-terminalen Domänen von PABPN1

Die Bestimmung der thermodynamischen Stabilität ΔG_D in den Fusionen mit MCspB erfolgte auch hier mit Hilfe von Harnstoff-induzierten Gleichgewichtsübergängen. Abbildung 3.12 zeigt die Denaturierungsübergänge. Die vollständige Reversibilität der Entfaltungen ist im Anhang gezeigt (siehe S. 120, Abb. 8.4).



Abbildung 3.12: **Chemisch-induzierte** Denaturierung der Fusionen aus Nterminalen Domänen und MCspB. Die Messungen erfolgten in $5 \text{ mM } \text{KH}_2\text{PO}_4$, 100 mM NaCl, pH 7.5 mit variierenden Harnstoffkonzentrationen bei 20°C und einer Proteinkonzentration von 3 μΜ. Die Emission wurde bei 345 nm nach einer Anregung bei 295 nm bestimmt. Die blaue, gestrichelte Linie entspricht der Entfaltung von MCspB.

Tabelle 3.4 fasst die ermittelten thermodynamischen Parameter zusammen. Nichtfusioniertes, freies MCspB besitzt unter den hier verwendeten Pufferbedingungen eine thermodynamische Stabilität ΔG_D von 26.9 ± 2.0 kJ/mol (Winter, 2008). In den Fusionen mit den N-terminalen Domänen war die thermodynamische Stabilität ΔG_D auf ca. 19 - 20 kJ/mol reduziert. Diese Destabilisierung war unabhängig von der Anzahl der Alanine. Da sowohl nicht-fusioniertes MCspB als auch die Fusionen bei 5.6 bzw. 5.7 M Harnstoff den gleichen Übergangsmittelpunkt aufwiesen, liegt die reduzierte thermodynamische Stabilität ΔG_D in der geringeren Kooperativität *m* der Fusionsproteine begründet.

Tabelle 3.4: Thermodynamische Parameter der chemischen und thermischen Entfaltung. Gekennzeichnete Parameter wurden nicht in dieser Arbeit bestimmt ([#]Winter, 2008).

Fusionsprotein	$\Delta G_{\rm D}$ (kJ/mol)	<i>m</i> (kJ/mol M)	$D_{1/2}(M)$	$T_{\rm m}$ (°C)	
MCspB	$26.9 \pm 2.0^{\#}$	$4.8\pm0.4^{\#}$	$5.6 \pm 0.9^{\#}$	67.2 ± 0.1	
17Ala-N-MCspB	18.7 ± 0.8	3.3 ± 0.1	5.7 ± 0.4	66.1 ± 0.3	
10Ala-N-MCspB	19.9 ± 0.9	3.5 ± 0.2	5.7 ± 0.6	65.9 ± 0.2	
∆Ala-N-MCspB	20.7 ± 0.9	3.7 ± 0.2	5.6 ± 0.6	66.3 ± 0.2	

Die Kooperativität *m* beschreibt die unterschiedliche Wechselwirkung des nativen bzw. entfalteten Proteins mit dem Denaturierungsmittel und stellt ein Maß für den Anstieg der zugänglichen Oberfläche des Proteins während der Entfaltung dar (Myers *et al.*, 1995; Pace, 1986; Schellman, 1978). Im Fall der Fusionen mit der N-terminalen Domäne besitzt das Gesamtprotein aufgrund der unstrukturierten N-terminalen Domäne bereits im nativen Zustand einen hohen Anteil an zugänglicher Oberfläche. Hier ist die Wechselwirkung des nativen Proteins mit dem Denaturierungsmittel im Vergleich zu nicht-fusioniertem MCspB relativ hoch. Dies resultiert wahrscheinlich in einer deutlich verringerten Kooperativität.

Zur Bestätigung der Ergebnisse der Harnstoff-induzierten Entfaltungen wurden erneut für alle Fusionen thermische Entfaltungen mittels CD-Spektroskopie gemessen (Abb. 3.13). Der Übergangsmittelpunkt von MCspB lag bei 67°C und der der Fusionen bei ca. 66°C (Tab. 3.4). Diese sehr geringe Abweichung verdeutlicht, dass die Destabilisierung von MCspB in den Fusionen hauptsächlich auf der geringeren Kooperativität der Übergänge beruht.





Dennoch führt die Mutation A46K/S48R auch im Kontext der Fusionen mit den Nterminalen Domänen zu einer Stabilisierung der Fusionsproteine um ca. 9 kJ/mol. Die Fusionen mit WT-CspB wiesen dagegen eine thermodynamische Stabilität ΔG_D von ca. 10 kJ/mol auf (Sackewitz *et al.*, 2008).

3.3 Fibrillenbildung der Fusionsproteine mit L3/16-Linker

In den folgenden Kapiteln wird zunächst die poly-alanin-induzierte Fibrillierung der Fusionsproteine mit einem Linker von drei bzw. 16 Aminosäuren zwischen den Alaninpeptiden und Wildtyp-CspB beschrieben (10/17Ala-L3/16-CspB). Die Varianten Δ Ala-L3/16-CspB dienten als Negativkontrolle. Die Ergebnisse werden mit der in der Dissertation von Mirko Sackewitz beschriebenen Fibrillierung der direkten Fusionsproteine 10Ala-CspB und 17Ala-CspB verglichen (Sackewitz, 2009). Anschließend wird die Auswirkung der stabilisierenden Mutation A46K/S48R auf die Fibrillierung der L3- und L16-Linkervarianten dargestellt.

3.3.1 Analyse der Fibrillenbildung von Fusionen mit CspB

Die Fusionsproteine wurden bei einer Konzentration von 0.5 mM mehrere Wochen lang bei 37°C inkubiert. Die Fibrillenbildung wurde mittels 8-Anilino-1naphthalensulfonsäure (ANS)-Fluoreszenz-Messungen verfolgt. Der Fluoreszenzfarbstoff ANS bindet mit hoher Affinität an hydrophobe Oberflächen von Proteinen und wird unter anderem zum Nachweis von amyloiden Strukturen genutzt (Kayed et al., 1999; Scheuermann, 2003). Abbildung 3.14 zeigt exemplarische Fibrillierungskinetiken aller Fusionen mit CspB. Die Varianten mit 17 Alaninen zeigten einen unmittelbaren Anstieg der ANS-Fluoreszenz. Dieser Anstieg war bei Fusionen mit L16-Linker zwischen den Alaninen und CspB wesentlich schneller (vergleiche Abb. 3.14 B, rote Kreise mit A, schwarze Kreise).



Abbildung 3.14: Fibrillierungskinetiken der Fusionen mit CspB mit einem Linker von drei (A) bzw. 16 Aminosäuren (B). Die Proteine wurden bei 37°C und einer Konzentration von 0.5 mM in 5 mM KH_2PO_4 , 100 mM NaCl, 0.1% (w/v) NaN₃, pH 7.5 inkubiert. Die Auswertung der ANS-Fluoreszenz erfolgte bei einer Wellenlänge von 480 nm.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten allerdings, dass die sofortigen Anstiege der ANS-Fluoreszenz nicht im Auftreten von Fibrillen begründet lagen. Vielmehr bildeten sich in allen Fällen zunächst amorphe Aggregate (Abb. 3.15 A). Klar erkennbare fibrilläre Strukturen konnten erst nach einer Inkubationszeit von 35 (17Ala-L16-CspB) und 86 Tagen (17Ala-L3-CspB) nachgewiesen werden (Abb. 3.15 B).

Für die Varianten mit 10 Alaninen konnten erst nach 20 (10Ala-L16-CspB) bzw. 40 Tagen (10Ala-L3-CspB) signifikante Anstiege in der ANS-Fluoreszenz detektiert werden (vergleiche Abb. 3.14 B, rote Quadrate mit A, schwarze Quadrate). Auch hier wurde dieser Anstieg zunächst durch amorphe Aggregate verursacht, und Fibrillen konnten erst nach ca. 200 Tagen nachgewiesen werden (Abb. 3.15). Im Gegensatz zu den direkten Fusionen von Alaninen mit CspB (Sackewitz *et al.*, 2008) konnten für die Fusionen mit L3- bzw. L16-Linker nie langgestreckte, unverzweigte Fibrillen beobachtet werden. Die Fibrillen waren stets sehr kurz und "verklebt". Zudem konnten zusätzlich zu den fibrillären Strukturen in einigen Proben auch vereinzelt Aggregate beobachtet werden.

Die Varianten ohne Alanine interagierten weder mit ANS (Abb. 3.14 A, B), noch bildeten sie Fibrillen. Diese Ergebnisse bestätigen, dass auch die CspB-Fusionen mit den beiden verschiedenen Linkern von drei bzw. 16 Aminosäuren nur in Anwesenheit des Poly-Alanin-Segmentes fibrillierten.



Abbildung 3.15: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von 17Ala-L16-CspB, 17Ala-L3-CspB, 10Ala-L16-CspB und 10Ala-L3-CspB. (A) Auftretende amorphe Aggregate nach kurzer Inkubationszeit. (B) Fibrilläre Strukturen nach längerer Inkubation der Proben. Die Präparation der Grids erfolgte bei einer Proteinkonzentration von 0.5 mM. Die Aufnahmen entstanden bei einer Vergrößerung von 50 000.

Es stellte sich die Frage, warum die Anstiege in der ANS-Fluoreszenz nicht direkt von Fibrillenbildung begleitet waren. Dies lag eventuell darin begründet, dass der Fluoreszenzfarbstoff ANS neben amyloiden Fibrillen auch alle anderen Faltungszustände von Proteinen bindet, in denen hydrophobe Bereiche exponiert werden wie zum Beispiel bei amorphen Aggregaten. Der Fluoreszenzfarbstoff ThioflavinT (ThT) hingegen ist bekannt dafür spezifisch amyloide Fibrillen zu binden und wird daher gebräuchlicherweise für die Detektion amyloider Fibrillen verwendet (Khurana *et al.*, 2005).

Um festzustellen, ob sich mit ANS und ThT gemessene Fibrillierungskinetiken unterscheiden, wurden exemplarisch die Varianten 17Ala-L3-CspB und 17Ala-L16-CspB bei 37°C inkubiert und die jeweilige Fluoreszenz ermittelt (Abb. 3.16). Wie Abbildung 3.16 unterschieden sich die Anstiege der mit ThT und ANS zeigt, gemessenen Fibrillierungskinetiken nicht. Dies war unerwartet, da aufgrund der sich zuerst bildenden amorphen Aggregate angenommen wurde, dass die mit ANS gemessenen Fibrillierungskinetiken früher ansteigen sollten als die mit ThT ermittelten. Warum auch die ThT-Fluoreszenz anstieg, obwohl noch keine klar erkennbaren, fibrillären Strukturen im Ansatz vorhanden waren, konnte nicht geklärt werden. Möglicherweise stellen die beobachteten Aggregate fibrilläre Vorstufen dar, die bereits durch einen hohen β-Faltblattanteil gekennzeichnet sind. In diesem Fall könnte auch ThT an die Strukturen binden.



Abbildung 3.16: Vergleich der Fibrillierungskinetiken von 17Ala-L3-CspB (A) und 17Ala-L16-CspB (B) gemessen mit ThT und ANS. Die Proteine wurden bei einer Konzentration von 0.5 mM und 37°C in 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, 0.1% (*w/v*) NaN₃, pH 7.5 inkubiert. Die Auswertung der Fluoreszenz erfolgte für ANS bei einer Wellenlänge von 480 nm und für ThT bei einer Wellenlänge von 482 nm.

Da sich der Verlauf der mit ThT bzw. ANS gemessenen Fibrillierungskinetiken nicht unterschied, aber die Intensitäten der Fluoreszenzwerte mit ANS sehr viel höher waren als mit ThT, wurden auch im weiteren Verlauf der Arbeit die Fibrillierungskinetiken mit ANS gemessen. Eine erhöhte Intensität von ANS- gegenüber ThT-Fluoreszenzwerten wurde bereits in der Dissertation von Till Scheuermann beschrieben (Scheuermann, 2003).

Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die Intensität sowohl der ANS- als auch der ThT-Fluoreszenz der Fibrillen von Fusionen mit 17 Alaninen stets um ein vielfaches



höher war als die Fluoreszenzintensität der Fusionen mit 10 Alaninen (Abb. 3.17; siehe S. 53, Abb. 3.14).

Abbildung 3.17: ThT-Fluoreszenz der Fibrillen nach einer Inkubation von 256 Tagen. Die Messung der ThT-Fluoreszenz erfolgte bei 20°C und einer Konzentration von 5 μ M in 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5. L3-Linkervarianten in schwarz, L16-Linkervarianten in rot.

Für die direkten Fusionen der Alaninpeptide mit CspB wurde ein derartiger Unterschied der Fluoreszenzintensität nicht beobachtet (Sackewitz *et al.*, 2008). Eine erste Annahme, dass im Fall der Linkervarianten für Fusionen mit 17 Alaninen prozentual mehr Fibrillen vorhanden waren, konnte nicht bestätigt werden. Die Ausbeute an Fibrillen lag bei jeder Fusionsvariante zwischen 50 und 60%. Da für die direkten Fusionsproteine dieser Intensitätsunterschied nicht beobachtet wurde, lässt sich vermuten, dass der Linker in Kombination mit den Alaninen einen Einfluss auf die Bindung der Fluoreszenzfarbstoffe an die Fibrillen hat.

3.3.2 Fibrillierung der Fusionen mit CspB nach Zugabe von Seeds

Während der Fibrillenbildung stellt der Prozess bis zur Nukleation, die sogenannte *lag*-Phase, den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar (Harper & Lansbury, 1997). Die *lag*-Phase kann durch Zugabe von fragmentierten Fibrillen (*Seeds*) zum Fibrillierungsansatz umgangen werden, da sich lösliche Monomere direkt an die *Seeds* anlagern können und so zum Fibrillenwachstum führen. Der Prozess der Fibrillenbildung nach Zugabe von fragmentierten Fibrillen wird als *Seeding* bezeichnet. Um vor allem die Fibrillierung der CspB-Fusionen mit 10 Alaninen zu beschleunigen, wurde getestet, ob die Zugabe von 10Ala-L3/16-CspB führen würde. Es wurden *Seeds* von 10Ala-CspB gewählt, deren Einfluss als heterologe *Seeds* auf die Fibrillierung untersucht wurde. Für die Herstellung der *Seeds* wurde 10Ala-CspB zunächst bei 37°C inkubiert und die Bildung von Fibrillen mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen überprüft (Abb. 3.18 A). Anschließend erfolgte die

Seed-Präparation gemäß 2.2.10.2 (siehe S. 32f). Abbildung 3.18 B zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme der mit Hilfe von Ultraschall erzeugten *Seeds* von Fibrillen von 10Ala-CspB.



Abbildung 3.18: Elektronenmikroskopische Aufvon Fibrillen nahmen (A) und Seeds (B) von 10Ala-CspB. 10Ala-CspB wurde bei einer Konzentration von 0.5 mM und 37°C in 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, 0.1% (w/v) NaN₃, pH 7.5 inkubiert.

Um den Einfluss der *Seeds* auf die Fibrillenbildung von 10Ala-L3-CspB und 10Ala-L16-CspB zu untersuchen, wurden die Fusionen mit 5% (w/w) 10Ala-CspB-*Seeds* versetzt und bei 37°C inkubiert. Die mittels ANS-Fluoreszenz aufgezeichnete Fibrillierungskinetik ist in Abbildung 3.19 dargestellt.



Abbildung 3.19: Seeding der Varianten 10Ala-L3-CspB und 10Ala-L16-CspB mit Seeds der Fibrillen von 10Ala-CspB. Die Inkubation der Fusionsproteine erfolgte in 5 mМ KH₂PO₄, 100 mM NaCl, 0.1% (w/v) NaN₃, pH 7.5 bei 37° und einer Konzentration von 0.5 mM.

Die Zugabe von *Seeds* zur Fibrillierung von 10Ala-L16-CspB führte zu einem raschen Anstieg der ANS-Fluoreszenz (Abb. 3.19, rote Quadrate). Ohne die Zugabe von *Seeds* blieb die ANS-Fluoreszenz über den beobachteten Zeitraum gering. Heterologes *Seeding* von 10Ala-L3-CspB führte nicht zu einem sofortigen Anstieg der ANS-Fluoreszenz (Abb. 3.19, schwarze Quadrate). Demnach sind fragmentierte Fibrillen von 10Ala-CspB in der Lage die Fibrillierung von 10Ala-L16-CspB zu induzieren, nicht aber von 10Ala-L3-CspB. Ein erfolgreiches heterologes Seeding ist weniger abhängig von einer ähnlichen Primärsequenz der untersuchten Proteine sondern eher von einer sehr ähnlichen Struktur des β -Faltblattes in den Fibrillen (O'Nuallain *et al.*, 2004). Vermutlich ist die β -Faltblattstruktur der Fibrillen aus 10Ala-CspB der Struktur von Fibrillen aus 10Ala-L16-CspB ähnlicher als der Struktur von Fibrillen aus 10Ala-L3-CspB.

3.3.3 Charakterisierung der fibrillären Strukturen von Fusionen mit CspB

3.3.3.1 Faltungszustand von CspB in den Fibrillen

In der Arbeit von Sackewitz et al. konnte gezeigt werden, dass CspB in Fibrillen der Fusionen von CspB mit der N-terminalen Domäne von PABPN1 gefaltet vorliegt und in der Lage ist einzelsträngige Nukleinsäuren zu binden (Sackewitz et al., 2008). Im Gegensatz dazu führte die direkte Fusion von Alaninpeptiden mit CspB zur Entfaltung von CspB in den Fibrillen. In der proteolysegeschützten "Kernstruktur" dieser Fibrillen waren neben den Alaninen bis zu 16 Aminosäuren von CspB enthalten (Sackewitz, 2009). Daher wurde erwartet, dass ein Linker von 16 Aminosäuren ausreichen sollte, um den gefalteten Zustand von CspB in den Fibrillen aufrechtzuerhalten. Für die Charakterisierung des Faltungszustandes von CspB in den Fibrillen wurden zunächst Fluoreszenzspektren aufgenommen (Abb. 3.20 A). In den Fibrillen der L3- und L16-Varianten verschob sich das Fluoreszenzmaximum von 352 nm auf ca. 340 nm. Dies deutet darauf hin, dass Trp8 in den Fibrillen in einer weniger polaren Umgebung lokalisiert ist als in den löslichen Fusionsproteinen, da es möglicherweise in die Fibrillen integriert wurde. Ähnliche Fluoreszenz-Blauverschiebungen wurden in der Arbeitsgruppe bereits früher im Zusammenhang mit dem Einbau von Tryptophanen in Fibrillen beobachtet (Rohrberg et al., 2008).

Um den Faltungszustand von CspB in den Fibrillen genau zu bestimmen wurden die Fibrillen nach 2.2.10.5 präpariert (siehe S. 33f), und anschließend mittels Tryptophan-Fluoreszenz die Konzentration der Fibrillenlösung bestimmt (siehe S. 34, 2.2.10.6). Nachfolgend wurde die Nukleinsäurebindung der Proteine analysiert. Wie Abbildung 3.20 B verdeutlicht, kam es nach Zugabe des Oligonukleotids dT7 zu den Fibrillen zu keiner Abnahme der Fluoreszenzintensität.



Abbildung 3.20: Charakterisierung des Faltungszustandes von CspB in den Fibrillen. (A) Fluoreszenzspektren der Fusionsproteine im monomeren und fibrillären Zustand. 10Ala - durchgezogene Linien, 17Ala gestrichelte Linien. L3-Linkervarianten in schwarz, L16-Linkervarianten in rot. (B) dT7-Bindung von CspB in den Fibrillen. 10Ala - Quadrate, 17Ala - Kreise. L3-Linkervarianten in schwarz, L16-Linkervarianten in rot. Die gestrichelte Linie stellt die dT7-Bindungsisotherme von monomerem 10Ala-L3-CspB dar. Alle Messungen erfolgten bei 20°C, einer Proteinkonzentration von 3 μ M in 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5.

Demnach war CspB weder in den Fibrillen der L3-Varianten noch in den Fibrillen der L16-Varianten in der Lage das dT7-Oligonukleotid zu binden. CspB lag in den Fibrillen also entfaltet vor. Diese Ergebnisse zeigen, dass im Gegensatz zur anfänglichen Hypothese auch ein Linker von 16 Aminosäuren nicht ausreichte, um die native Faltung von CspB in den Fibrillen aufrechtzuerhalten.

3.3.3.2 Proteolysegeschützter Bereich der Fibrillen

Amyloide Strukturen besitzen eine hohe Resistenz gegenüber proteolytischem Abbau. Dies ist vermutlich in der Stabilität der *Cross*-β-Struktur begründet. Daher kann durch Proteolyse von Fibrillen und anschließende massenspektrometrische Analyse die Fibrillenkernsequenz bestimmt werden (Baxa *et al.*, 2003; Miake *et al.*, 2002; Sackewitz *et al.*, 2008b; Wilson *et al.*, 2007; Yagi *et al.*, 2008). Die Fibrillen der zuvor beschriebenen Varianten 17Ala-L3-CspB, 10Ala-L3-CspB, 17Ala-L16-CspB und 10Ala-L16-CspB wurden nach 2.2.10.5 präpariert (siehe S. 33f) und 2 h lang mit Proteinase K, einer unspezifischen Protease (Betzel *et al.*, 1988), behandelt. Abbildung 3.21 zeigt ein SDS-Gel der proteolyse-resistenten Fibrillen im Vergleich zum monomeren Protein.

Im Fall der monomeren Fusionsproteine reichte eine Inkubation mit Proteinase K von nur fünf Minuten aus, um die Proteine vollständig abzubauen (Abb. 3.21 A). Im SDS-Gel der Proben mit fibrillärem Protein sind vor der Proteolyse bei allen Varianten mehrere Banden erkennbar (Abb. 3.20 B, 0 h). Bei diesen Banden handelte es sich um die Monomere (bei ca. 10 kDa), oligomere Spezies, die Di-, Tri- oder Tetramere darstellen könnten, und Oligomere mit höherem Molekulargewicht. Diese waren zwischen Sammel- und Trenngel sowie in den Taschen des Sammelgels lokalisiert und blieben auch nach der zweistündigen Proteolyse erhalten, während die Banden mit geringerem Molekulargewicht dann kaum noch nachweisbar waren (Abb. 3.21 B, 2h). Lediglich die Variante 10Ala-L3-CspB zeigt nach der Proteolyse nur noch eine sehr schwache Bande in der Tasche des Gels. Möglicherweise sind die Di-, Tri- und Tetramere vor der Proteolyse dadurch zu erklären, dass diese mit den Fibrillen assoziiert waren und erst im SDS-Gel abgelöst wurden. Zusätzlich zur Proteolyse-Resistenz wiesen die Fibrillen aller Fusionskonstrukte auch eine Resistenz gegenüber SDS auf, da die Fibrillen nicht vollständig in das SDS-PA-Trenngel einwanderten, sondern im Sammelgel zu finden waren (Abb. 3.21 B).



Abbildung 3.21: SDS-PA-Gel von monomeren (A) und fibrillären (B) CspB-Fusionsproteinen vor und nach Proteolyse mit Proteinase K. Coomassie gefärbt. Die Proteolyse erfolgte in einem Massenkonzentrationsverhältnis von 1:50 (Protease : Protein) über einen Zeitraum von bis zu 10 min (monomeres Protein) bzw. 2 h (fibrilläres Protein). Bei der Bande bei ca. 30 kDa handelt es sich um befindliche die im Ansatz Proteinase K (28.9 kDa). Monomeres Protein ist mit einem Stern gekennzeichnet. M - Marker

Für die Bestimmung der proteolyseresistenten Peptide mittels Massenspektrometrie wurde das proteasebehandelte, fibrilläre Material in 6 M des Denaturierungsmittels Guanidiniumthiocyanat solubilisert und die erhaltenen Peptide mittels RP-HPLC und Massenspektrometrie analysiert. Abbildung 3.22 zeigt Ausschnitte der RP-HPLC-Chromatogramme der proteolyseresistenten Fibrillenfragmente aller Fusionsproteine. Die Originalchromatogramme sind im Anhang dargestellt (siehe S. 121, Abb. 8.5).



Abbildung 3.22: Ausschnitte der RP-HPLC-Chromatogramme der mit Proteinase K behandelten und anschließend solubilisierten Fibrillen. (A) 17Ala-L16-CspB. (B) 17Ala-L3-CspB. (C) 10Ala-L16-CspB. (D) 10Ala-L3-CspB. Die Chromatogramme wurden bei einer Wellenlänge von 215 nm aufgezeichnet. Die gekennzeichneten *Peaks* wurden aufgefangen und massenspektrometrisch analysiert.

Die Auftrennung der Peptide mittels RP-HPLC resultierte für die Varianten mit 17 Alaninen überwiegend in *Peaks* mit einer Retentionszeit zwischen 45 und 60 Minuten (Abb. 3.22 A, B). Peptide der Varianten mit 10 Alaninen eluierten ca. 30 Minuten eher (Abb. 3.22 C, D). Dies zeigt, dass die Peptide der proteasebehandelten und solubilisierten Fibrillen der 17Ala-Varianten, wahrscheinlich aufgrund des längeren Alaninpeptides, hydrophober waren als jene mit zehn Alaninresten.

Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse sind in Abbildung 3.23 zusammengefasst. Die Abbildung zeigt die obligat proteolysegeschützte Sequenz A und die erweiterte proteolysegeschützte Sequenz B.

Sequenz A wurde in allen mittels Massenspektrometrie detektierten Peptiden gefunden. Es konnte nie eine proteolytische Spaltung dieses Peptids nachgewiesen werden. Unabhängig von der Länge des Linkers umfasste dieser Bereich immer die zehn bzw. 17 Alanine und benachbarte Glycine (Abb. 3.23, fett gedruckte Aminosäuren). Die Integration der C-terminal der Alaninsequenz gelegenen Glycine in den Fibrillenkern konnte bereits für Fibrillen der N-terminalen Domäne von PABPN1 mit Hilfe von Festkörper-NMR-Analysen festgestellt werden (Sackewitz *et al.*, 2008b).

17Ala-L16-CspB



Abbildung 3.23: Schematische Darstellung der proteolyseresistenten Kernsequenz der Fibrillen. Die obligat geschützte Sequenz A ist fett markiert und die erweiterte geschützte Sequenz B unterstrichen. Die rot markierten Aminosäuren kennzeichnen jeweils die erste und die letzte Aminosäure der Sequenzen A und B.

Segmente, die nur in einigen Peptiden nachgewiesen werden konnten, wurden als erweiterte proteolysegeschützte Sequenz B bezeichnet (Abb. 3.23, unterstrichene Aminosäuren). In dieser Sequenz waren je nach Variante zusätzlich 11 bis 19 Aminosäuren N- und C-terminal von Sequenz A vorhanden. Wie bereits anhand der Fluoreszenzspektren der Fibrillen vermutet (siehe S. 59, Abb. 3.20), befindet sich Trp8 im Fall der L3-Linkervarianten in der Sequenz B. Dies erklärt die starke Blauverschiebung der Fibrillen von 17Ala-L3-CspB und 10Ala-L3-CspB. In den L16-Linkervarianten ist Trp8 nicht direkt innerhalb, aber sehr nah an der Fibrillenkernsequenz lokalisiert. Es sollte erwähnt werden, dass die tatsächliche Fibrillenkernsequenz wahrscheinlich weniger Aminosäuren umfasst als die hier gezeigte Sequenz B. Dies liegt darin begründet, dass Aminosäurereste, die sehr nah an der Fibrillenkernsequenz liegen, möglicherweise für die Protease sterisch nicht zugänglich sind (Miake *et al.*, 2002; Sackewitz *et al.*, 2008b). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die obligat proteolysegeschützte Sequenz A sogar die tatsächliche Fibrillenkernsequenz darstellt, während die zusätzlichen Aminosäuren der Sequenz B die *Cross*- β -Struktur vielleicht relativ dicht gepackt flankieren.

3.3.3.3 Röntgenbeugung von Fibrillen aus 17Ala-L16-CspB

Die Untersuchung durch Röntgenbeugung wurde beispielhaft nur an Fibrillen der Variante 17Ala-L16-CspB durchgeführt. Hierfür wurden die Fibrillen mehrfach mit Wasser gewaschen, lyophilisiert und röntgenographisch vermessen. Abbildung 3.24 zeigt das gemessene Röntgenbeugungsmuster.



Abbildung 3.24: Röntgenbeugungsmuster von Fibrillen aus 17Ala-L16-CspB. Die weißen Pfeile markieren erhaltene Röntgenreflexionen.

Es wurden zwei intensive Reflexionen bei 6.45 und 5.3 Å sowie Reflexionen im Bereich von 4.15 bis 4.85 Å detektiert. Die Reflexion bei 5.3 Å entspricht dem Abstand von β -Faltblättern für Alanin-Seitenketten (Fraser & MacRae, 1973). Dies wurde bereits in Röntgenbeugungsmustern für Fibrillen reiner Poly-Alaninpeptide gezeigt (Shinchuk *et al.*, 2005). Der Abstand der β -Stränge innerhalb der β -Faltblätter erzeugt Reflexionen im Bereich von 4.6 bis 4.8 Å (Sunde *et al.*, 1997). Das Röntgenbeugungsmuster von 17Ala-L16-CspB zeigt Signale im Bereich von 4.15 bis 4.85 Å. Diese Signale könnten durch den Abstand der β -Stränge erzeugt werden. Es besteht allerdings auch die Möglichkeit, dass vor allem der Reflexion bei 4.15 Å durch noch in der Probe vorhandenes Restwasser verursacht wird. Der Bereich mit erhöhter Intensität von 4.15 bis 4.85 Å könnte deshalb auch durch ein Verschwimmen der Signale, erzeugt durch Wasser und dem Abstand der β -Stränge, erzeugt werden. Die Reflexion bei 6.45 Å konnte bisher keiner Struktur in amyloiden Fibrillen zugeordnet werden.

3.3.3.4 Stabilität der Fibrillen gegenüber chemischen Denaturierungsmitteln

Amyloide Fibrillen weisen häufig eine hohe Resistenz gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen auf. Vor allem Poly-Alaninfibrillen konnten nur mit hohen Konzentrationen von sehr starken Denaturierungsmitteln wieder gelöst werden. So zeigten z.B. Fibrillen der N-terminalen Domäne von PABPN1 eine vollständige Resistenz gegenüber der Behandlung mit 6 M Guanidiniumhydrochlorid (GdmCl) (Scheuermann, 2003). Erst mit dem stärkeren Denaturierungsmittel Guanidiniumthiocyanat konnten bei einer Konzentration von 6 M ca. 50% der Fibrillen solubilisiert werden (Lodderstedt *et al.*, 2007). Auch die Fibrillen der Fusionen von N-terminaler Domäne und CspB konnten mit 6 M GdmCl nicht aufgelöst werden (Sackewitz, 2009). Im Gegensatz dazu zeigten Fibrillen der direkten Fusion von zehn Alaninen mit CspB (10Ala-CspB) eine deutlich geringere Stabilität gegenüber GdmCl. Hier wurden bei der vergleichsweise geringen GdmCl-Konzentration von 2 M bereits 10% der Fibrillen solubilisiert. Bei einer Konzentration von 5 M waren keine Fibrillen mehr nachweisbar (Sackewitz, 2009).

Analysen zur Stabilität der Fibrillen der L3- und L16-Linkervarianten erfolgten wie unter 2.2.10.7 beschrieben (siehe S. 34). In Abbildung 3.25 sind die Anteile an fibrillärem und monomeren Protein sowie das Maximum der Tryptophanfluoreszenz gegen die GdmCl-Konzentration aufgetragen. Das Maximum Fluoreszenz verschob sich in den Fibrillen auf ca. 340 nm (siehe S. 59, Abb. 3.20). Demnach sollte sich bei einer Solubilisierung der Fibrillen durch ansteigende GdmCl-Konzentrationen das Maximum wieder zu höheren Wellenlängen verschieben.

Wie bereits für die Fibrillen der direkten Fusionen beschrieben, zeigten auch die Fibrillen der L3- und L16-Varianten nur eine geringe Stabilität gegenüber GdmCl. Mit 5 M GdmCl ließen sich die Fibrillen aller Varianten vollständig solubilisieren. Es konnte eine geringfügig höhere Stabilität der Fibrillen von Fusionskontrukten mit 10 Alaninen gegenüber Fibrillen von Fusionskonstrukten mit 17 Alaninen festgestellt werden (vergleiche Abb. 3.25 C, D mit A, B).



Abbildung 3.25: Stabilität der Fibrillen gegenüber Guanidiniumhydrochlorid. (A) 17Ala-L16-CspB. (B) 17Ala-L3-CspB. (C) 10Ala-L16-CspB. (D) 10Ala-L3-CspB. Der Anteil des fibrillären Proteins ist durch schwarze Quadrate und der des solubilisierten Proteins durch weiße Quadrate dargestellt. Die Maximumsverschiebung der Tryptophanfluoreszenz wird durch rote Quadrate beschrieben.

Während nach der Behandlung mit 1 M GdmCl bereits 20% der Fibrillen aus Fusionen mit 17 Alaninen solubilisiert waren, blieben die Fibrillen der 10Ala-Fusionen bei dieser Denaturierungsmittelkonzentration noch stabil. Die Fibrillen aus 10Ala-L3/16-CspB besaßen also eine ähnliche Stabilität gegenüber GdmCl wie die Fibrillen der direkten Fusion 10Ala-CspB (Sackewitz, 2009). Die Länge des Linkers scheint im Gegensatz zu der Anzahl der Alanine keinen Einfluss auf die Stabilität der Fibrillen gegenüber GdmCl zu haben.

3.3.4 MCspB in den L3- und L16-Varianten verhindert die Fibrillenbildung der Fusionsproteine

Um zu untersuchen, ob die um ca. 8 kJ/mol stabilisierten MCspB-Varianten Fibrillen bilden, wurden auch diese Fusionsproteine in einer Konzentration von 0.5 mM mehrere Wochen lang bei 37°C inkubiert. Die Fibrillenbildung wurde wiederum mittels ANS-Fluoreszenz-Messungen und Elektronenmikroskopie verfolgt. Über einen Zeitraum von mehr als 200 Tagen zeigte keine der MCspB-Varianten einen Anstieg in der ANS-Fluoreszenz (Abb. 3.26, schwarze und rote Symbole). Dies steht in starkem Kontrast gegenüber dem Anstieg der ANS-Fluoreszenz der 10Alanin-Varianten mit CspB (Abb. 3.26, blaue Quadrate). Auch durch zur Kontrolle angefertigte elektronenmikroskopische Aufnahmen konnten keine Fibrillen detektiert werden. Einige *Grids* zeigten allerdings wenige amorphe Aggregate.

Die Stabilisierung von CspB um ca. 8 kJ/mol verhindert demnach die poly-alanininduzierte Fibrillenbildung der Fusionsproteine.



Abbildung 3.26: Fibrillierungskinetiken der Fusionen mit MCspB mit einem Linker von drei (A) bzw. 16 Aminosäuren (B). Die Proteine wurden bei einer Konzentration von 0.5 mM und 37°C in 5 mM KH_2PO_4 , 100 mM NaCl, 0.1% (w/v) NaN₃, pH 7.5 inkubiert. Die Auswertung der ANS-Fluoreszenz erfolgte bei einer Wellenlänge von 480 nm.

Um zu überprüfen, ob MCspB unter Fibrillierungsbedingungen nach mehr als 200 Tagen in den Fusionen noch nativ gefaltet vorlag, wurde die Nukleinsäurebindung der Proteine analysiert (Abb. 3.27). Hierfür wurde die intrinsische Fluoreszenz von 3 μ M Fusionsprotein vor und nach Zugabe eines Überschusses von dT7 ermittelt.



Abbildung 3.27: dT7-Bindung von CspB und MCspB im Fibrillierungsansatz nach 238 Tagen. Die Messungen erfolgten in 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 bei einer Proteinkonzentration von 3 μ M, einer dT7-Konzentration von 5 μ M und 20°C. CspB schwarze Balken, MCspB - graue Balken. Für alle Fusionen mit MCspB wurde auch nach einer Inkubationszeit von 238 Tagen eine starke Fluoreszenzabnahme um ca. 80–90% nach dT7-Zugabe nachgewiesen (Abb. 3.27, graue Balken). Im Gegensatz dazu wurde bei Fusionen mit CspB nur eine Fluoreszenzabnahme von ca. 10% beobachtet (Abb. 3.27, schwarze Balken). Das bedeutet, dass Fusionsproteine mit stabilisiertem MCspB auch nach mehr als 200 Tagen bei 37°C stabil gefaltet und funktionell sind.

3.3.4.1 MCspB verhindert die Fibrillierung auch in Anwesenheit von Seeds

Die Zugabe von *Seeds* aus Fibrillen von 10Ala-CspB führte zu einer kompletten Eliminierung der *lag*-Phase während der Fibrillierung von 10Ala-L16-CspB (siehe S. 56f, 3.3.2). Daher wurde nachfolgend getestet, ob die Zugabe der gleichen *Seeds* (siehe S. 57, Abb. 3.18 B) die Fibrillierung der stabilisierten CspB-Variante 10Ala-L16-MCspB beeinflussen würde (Abb. 3.28).



Abbildung 3.28: Seeding von 10Ala-L16-CspB mit Seeds der Fibrillen von 10Ala-CspB. Die Inkubation der Proteine erfolgte bei einer Konzentration von 0.5 mM und 37°C in 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, 0.1% (*w/v*) NaN₃, pH 7.5.

Im Gegensatz zum sofortigen Anstieg der ANS-Fluoreszenz nach Zugabe von *Seeds* zur Fibrillierung von 10Ala-L16-CspB blieb die Fluoreszenz für die stabilisierte Variante 10Ala-L16-MCspB weiterhin niedrig (vergleiche Abb. 3.28 blaue Quadrate mit roten Quadraten). Offensichtlich verhindert die Doppelmutation auch in Anwesenheit von *Seeds* die Fibrillenbildung der Fusion.

3.4 Fibrillenbildung der Fusionen aus den N-terminalen Domänen von PABPN1 und MCspB

In früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe wurde bereits beschrieben, dass Fusionen der vollständigen N-terminalen Domäne von PABPN1 mit dem Wildtyp des Kälteschockproteins CspB abhängig von der Anwesenheit der Poly-Alaninsequenz fibrilläre Strukturen bilden. In
diesen Fibrillen konnte CspB weiterhin einzelsträngige Nukleinsäuren binden, lag also nativ gefaltet vor (Sackewitz *et al.*, 2008). Diese Tatsache führte zu der Hypothese, dass in den Fusionsvarianten die amyloidogene Sequenz strukturell unabhängig von CspB vorliegt. Um die Hypothese zu überprüfen, wurden Fusionskonstrukte aus den N-terminalen Domänen (ohne, mit zehn bzw. 17 Alaninen) und stabilisiertem MCspB hergestellt und charakterisiert (siehe S. 47ff, 3.2). Die Fibrillenbildung der Varianten wurde analysiert und ist im folgenden Kapitel beschrieben. Wenn die amyloidogene Sequenz tatsächlich unabhängig von CspB vorliegt, sollte die stabilisierende Mutation die Fibrillierung der Fusionsproteine nicht beeinflussen.

3.4.1 Fusionen der N-terminalen Domänen mit MCspB bilden Fibrillen

Für die Untersuchungen zur Fibrillierung wurden die Varianten $\Delta/10/17$ Ala-N-MCspB in 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Fibrillenbildung wurde mit ANS-Fluoreszenzmessungen verfolgt und mit Hilfe der Elektronenmikroskopie bestätigt. Abbildung 3.29 zeigt die Fibrillierungskinetiken für alle drei Fusionsproteine.



Abbildung 3.29: Fibrillierungskinetiken der Fusionen aus N-terminalen Domänen von PABPN1 mit MCspB. Die Proteine inkubierten bei 37°C und einer Konzentration von 0.5 mM in 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, 0.1% (*w/v*) NaN₃, pH 7.5. Die ANS-Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 480 nm ausgewertet.

Zunächst fällt auf, dass die ANS-Fluoreszenz aller Varianten selbst zum Zeitpunkt Null geringfügig höher war als bei den Varianten mit einem Linker von drei bzw. 16 Aminosäuren (siehe S. 53, Abb. 3.14). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Nterminale Domäne keinerlei Tertiärstruktur besitzt und somit im monomeren Zustand einen höheren Anteil an hydrophober Oberfläche besitzt als die L3- bzw. L16-Varianten.

Die ANS-Fluoreszenz von 17Ala-N-MCspB stieg unmittelbar nach Beginn der Inkubation an und befand sich bereits nach ca. zehn Tagen im Plateau (Abb. 3.29, Kreise).

Auch die ANS-Fluoreszenz der Variante mit zehn Alaninen begann bereits nach ca. fünf Tagen zu steigen und war nach ca. 20 Tagen im Plateau (Abb. 3.29, Quadrate).

Für die Variante Δ Ala-N-MCspB konnte neben der bereits leicht erhöhten Grundfluoreszenz kein weiterer Anstieg detektiert werden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten allerdings, dass sich im Ansatz dieser Variante viele amorphe Aggregate bildeten (Abb. 3.30). Dies war unerwartet und konnte für die entsprechende Fusion mit Wildtyp-CspB nicht beobachtet werden (Sackewitz, 2009).



ΔAla-N-MCspB 161 Tage

10Ala-N-MCspB 195 Tage

17Ala-N-MCspB 161 Tage

Abbildung 3.30: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Fusionen $\Delta/10/17$ Ala-N-MCspB. Die Präparation der Grids erfolgte bei einer Proteinkonzentration von 0.5 mM. Die Aufnahmen entstanden bei einer Vergrößerung von 50 000.

Bei den Fusionen mit zehn bzw. 17 Alaninen (10/17Ala-N-MCspB) konnten durch Elektronenmikroskopie fibrilläre Strukturen nachgewiesen werden (Abb. 3.30). Diese unterschieden sich allerdings von den für Fusionen mit Wildtyp-CspB typischen langen Fibrillen. So traten Fibrillen der Variante 10Ala-N-MCspB stets "gehäuft" auf und waren sehr stark assoziiert. Auch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die "gehäuft" auftretenden Fibrillen zusätzlich Aggregate enthielten. Für 17Ala-N-MCspB konnten Fibrillen beobachtet werden, die, im Gegensatz zu Fibrillen der Fusion mit Wildtyp-CspB, nie länger als ca. 500 nm waren.

Die Fibrillenbildung wird durch die Stabilisierung von CspB in den Fusionen aus Nterminaler Domäne und MCspB nicht verhindert. Demzufolge liegt die amyloidogene Sequenz in diesen Fusionen tatsächlich unabhängig von CspB vor. Allerdings unterschieden sich die aus 10/17Ala-N-MCspB und 10/17Ala-N-CspB gebildeten Fibrillen. Weiterhin bildete die Variante Δ Ala-N-MCspB zahlreiche Aggregate, welche für Δ Ala-N-CspB nicht beobachtet werden konnten. Auch wenn die stabilisierende Mutation A46K/S48R die Fibrillierung nicht verhindert, könnten die Unterschiede in der Fibrillenmorphologie auf einen Einfluss von MCspB auf die Fibrillierung hindeuten. Andererseits könnte die Anwesenheit von MCspB in den Fibrillen zu einer anderen Oberfläche führen, als in Fibrillen mit Wildtyp-CspB.

3.4.2 Nachweis von nativem MCspB in den Fibrillen aus 17Ala-N-MCspB

Um zu testen, ob MCspB in der Fusion mit der N-terminalen Domäne nativ vorliegt, wurde die dT7-Bindung getestet. Für die Analyse des Faltungszustandes von MCspB in 17Ala-N-MCspB wurden Fibrillen eines Ansatzes nach 2.2.10.5 präpariert (siehe S. 33), die Konzentration der Fibrillenlösung bestimmt (siehe S. 34, 2.2.10.6) und die Fibrillen für eine Fluoreszenztitration mit dT7 eingesetzt. Abbildung 3.31 stellt die Bindungsisothermen von monomerem und fibrillärem 17Ala-N-MCspB dar.



Abbildung 3.31: Charakterisierung des Faltungszustandes von MCspB in den Fibrillen. dT7-Bindung von MCspB in den Fibrillen. Die gestrichelte Linie stellt die dT7-Bindungsisotherme von monomerem 17Ala-N-MCspB dar. Die Titration wurde bei 20°C in 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 bei einer Proteinkonzentration von 3 μ M durchgeführt.

Wie bereits zuvor gezeigt, ist monomeres 17Ala-N-MCspB in der Lage dT7 zu binden. Während dieser Bindung nahm die Tryptophanfluoreszenz des Proteins nahezu vollständig ab (Abb. 3.31, gestrichelte Linie). Auch bei der Titration von dT7 zu fibrillärem 17Ala-N-MCspB wurde deutlich, dass die Fibrillen weiterhin in der Lage sind dT7 zu binden. Allerdings war die Abnahme der Fluoreszenzintensität geringer (Abb. 3.31, Kreise). Diese Tatsache deutet darauf hin, dass nicht jedes MCspB-Molekül in der Fibrille dT7 binden kann. Diese Vermutung wurde durch die Bindungsstöchiometrie bestätigt. Für monomeres 17Ala-N-MCspB konnte eine Stöchiometrie von 1 : 0.76 (MCspB : dT7) berechnet werden. In den Fibrillen war die Stöchiometrie auf 1 : 0.58 reduziert. Diese verringerte dT7-Bindung wurde bereits in Fibrillen der Fusion 17Ala-N-CspB festgestellt. Auch hier konnten nur ca. die Hälfte aller CspB-Moleküle dT7 binden (Sackewitz, 2009).

Ein Teil des fibrillären Proteins ist demnach in den Fusionen von (M)CspB mit der Nterminalen Domäne in der Lage dT7 zu binden und besitzt nativ gefaltetes (M)CspB. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die gesamte Population von (M)CspB korrekt gefaltet vorliegt, und die unvollständige dT7-Bindung auf einen unzureichenden räumlichen Zugang von dT7 an (M)CspB im fibrillären Protein zurückzuführen ist (Sackewitz, 2009).

Aufgrund der Tatsache, dass Fibrillen von 10Ala-N-MCspB stark "verklebt" waren oder sogar Aggregate aufwiesen, wurde die Aktivität von 10Ala-N-MCspB nicht getestet (siehe S. 69, Abb. 3.30).

3.5 Der Einfluss von Schütteln auf die Fibrillenbildung

In der Literatur wurde bereits mehrfach beschrieben, dass Schütteln bzw. Rühren der Probenlösung einen signifikanten Einfluss auf die Fibrillenbildung von Proteinen hat. So wird z.B. bei A β_{1-40} , Insulin, β_2 -Mikroglobulin und einem Fragment des humanen Prionenproteins eine Verkürzung der lag-Phase bewirkt (Almstedt et al., 2009; Lee et al., 2007; Nielsen et al., 2001; Sasahara et al., 2008). In einigen Fällen wird die Fibrillierung eines Proteins, wie für die PDZ-Domäne einer Tyrosin-Phosphatase oder ein Peptid der humanen prostataspezifischen sauren Phosphatase beobachtet, erst durch Schütteln induziert (Sicorello et al., 2009; Ye et al., 2009).

Da die Fibrillierung der Fusionsproteine mit einem Linker von drei bzw. 16 Aminosäuren mit einer Inkubationszeit von bis zu 200 Tagen sehr lange dauerte (siehe S. 53ff, 3.3.1), wurde untersucht, ob Schütteln die *lag*-Phase dieser Fibrillierungen verkürzen würde. Hierfür wurden die Proben in einem Eppendorf-Thermoschüttler bei 37°C und 500 rpm inkubiert. Diese Geschwindigkeit wurde als Mittel aus den in der Literatur beschriebenen Rotationsgeschwindigkeiten zwischen 18 (Lee *et al.*, 2007) und 960 rpm (Nielsen *et al.*, 2001) gewählt.

3.5.1 Verkürzte lag-Phase der Fibrillierung von Fusionen mit CspB

Der Einfluss von Schütteln wurde mit den L3/16-Linkervarianten getestet. Der Verlauf der Fibrillierung wurde wiederum mittels ANS-Fluoreszenz-Messungen über mehrere Tage verfolgt. Abbildung 3.32 zeigt exemplarische Fibrillierungskinetiken der Fusionen mit Wildtyp-CspB. Die ANS-Fluoreszenz stieg nach ca. 2 - 10 Tagen für alle Varianten relativ zeitgleich an. Es konnte kein Unterschied in den Kinetiken zwischen Varianten mit einem Linker von drei bzw. 16 Aminosäuren festgestellt werden. Entgegen den Erwartungen zeigten auch die Kinetiken der Varianten mit zehn bzw. 17 Alaninen keine Unterschiede (vergleiche Abb. 3.32, Quadrate mit Kreisen). Unerwarteterweise stieg die ANS-Fluoreszenz auch bei den Fusionsproteinen Δ Ala-L3/16-CspB sofort stark an (Abb. 3.32, Dreiecke).



Abbildung 3.32: Fibrillierungskinetiken der Fusionen mit CspB mit einem Linker von drei (A) bzw. 16 Aminosäuren (B). Die Proteine wurden bei einer Konzentration von 0.5 mM und 37°C in 5 mM KH_2PO_4 , 100 mM NaCl, 0.1% (*w/v*) NaN₃, pH 7.5 unter Schütteln (500 rpm) inkubiert. Die ANS-Fluoreszenz wurde bei einer Wellenlänge von 480 nm ausgewertet.

Um zu überprüfen, ob die Probenlösungen Fibrillen oder Aggregate enthielten, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Wie Abbildung 3.33 zeigt, konnten für alle Varianten, sowohl unabhängig von der Länge des Linkers als auch unabhängig von der Alaninsequenz, klar erkennbare Fibrillen nachgewiesen werden. Die Bildung der Fibrillen korrelierte zudem mit der ansteigenden ANS-Fluoreszenz.

Schütteln der Probenlösung beschleunigte demnach die Fibrillierung der CspB-Fusionsproteine mit zehn Alaninen und induzierte auch die Fibrillierung der Varianten ohne Alanine. Da kein zeitlicher Unterschied hinsichtlich des Beginns der Fibrillierung zwischen den verschiedenen Varianten festgestellt werden konnte, muss die Fibrillierung unter dem Einfluss von Schütteln unabhängig von der Poly-Alanin-Sequenz erfolgen. Weiterhin konnte ein drastischer Einfluss des Schüttelns auf die Morphologie der Fibrillen nachgewiesen werden. Die Fibrillen aller Varianten waren im Gegensatz zu den Fibrillen der nicht geschüttelten Ansätze viel länger und meist nicht "verklebt" (vergleiche S. 54 Abb. 3.15 mit Abb. 3.33). Teilweise konnten kurze Bruchstücke in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen nachgewiesen werden, die wahrscheinlich durch das Schütteln entstanden waren (Abb. 3.33 A, 17Ala-L3-CspB).

Die Fibrillen der Varianten Δ Ala-L3/16-CspB konnten meist nur als "Fibrillenbündel" nachgewiesen werden, die bei einer geringeren Vergrößerung besonders deutlich wurden (Abb. 3.34 A). Die einzelnen Fibrillen in diesen Bündeln hatten eine Breite von ca. 5 nm (Abb. 3.34 B).



Abbildung 3.33: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der unter Schütteln inkubierten Fusionen mit Wildtyp-CspB. (A) Fusionen mit einem Linker von drei Aminosäuren. (B) Fusionen mit einem Linker von 16 Aminosäuren. Die Präparation der Grids erfolgte bei einer Proteinkonzentration von 0.5 mM. Die Aufnahmen entstanden bei einer Vergrößerung von 50 000.



Abbildung 3.34: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der unter Schütteln inkubierten Fusionen Δ Ala-L3-CspB und Δ Ala-L16-CspB nach 84 Tagen. (A) 12 000 fache Vergrößerung. (B) 85 000 fache Vergrößerung. Die Präparation der Grids erfolgte bei einer Proteinkonzentration von 0.5 mM.

Da für alle CspB-Fusionsproteine in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen Fibrillen nachgewiesen werden konnten, bestätigte sich die Annahme, dass die Fibrillenbildung der Proteine unter Schütteln unabhängig von der Anwesenheit der Alanine erfolgte. Die Struktur der unter Schütteln entstandenen Fibrillen wich stark von der Struktur der Fibrillen, die unter "konventionellen Bedingungen" (ohne Schütteln) entstanden, ab. Demzufolge lässt sich vermuten, dass sich der Fibrillierungsmechanismus unterscheidet und in den unter Schütteln entstandenen Fibrillen Aminosäuren des Kälteschockproteins integriert sind. Erste Ergebnisse der Diplomarbeit von Tanja Wostradowski zeigten tatsächlich, dass auch Wildtyp-CspB an sich in 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 unter Schütteln Fibrillen bildet, die in elektronenmikroskopischen Aufnahmen eine ähnliche Morphologie wie die Fibrillen der Δ Ala-Varianten besitzen (Abb. 3.35) (Wostradowski, *Diplomarbeit in Vorbereitung*).



Abbildung 3.35: Elektronenmikroskopische Aufnahmen nach 31 Tagen des unter Schütteln inkubierten Kälteschockproteins CspB. 12 000- und 50 000 fache Vergrößerung. Die Grids wurden bei einer Proteinkonzentration von 0.5 mM präpariert.

3.5.2 Charakterisierung der Fibrillen von Fusionen mit CspB

In den nachfolgenden Kapiteln werden die unter Schütteln gebildeten Fibrillen charakterisiert und mit den Fibrillen verglichen, die unter "konventionellen Bedingungen" entstanden waren (siehe S. 52ff, 3.3). Um die Nomenklatur in den weiteren Kapiteln zu vereinfachen, werden die unter "konventionellen Bedingungen" entstandenen Fibrillen im weiteren Verlauf der Arbeit mit Fibrillen vom Typ I bezeichnet. Fibrillen, die sich unter Schütteln bildeten, sind Fibrillen vom Typ II.

3.5.2.1 Entfaltetes CspB in den Fibrillen

Die Tatsache, dass unter Schütteln auch die Fusionen ohne Alanine Fibrillen bildeten, deutete bereits darauf hin, dass CspB in diesen Fibrillen entfaltet vorlag. Um den Faltungszustand von CspB zu bestimmen, wurden die Fibrillen nach 2.2.10.5 präpariert (siehe S. 33), und die Nukleinsäurebindung der Proteine analysiert. In den Fibrillen aller Fusionskonstrukte wurde nur eine sehr geringe Abnahme der Fluoreszenz nach Zugabe von dT7 beobachtet (Abb. 3.36, schwarze und rote Balken). Dies steht in starkem Gegensatz zur Fluoreszenzabnahme nach dT7-Bindung durch monomeres Δ Ala-L3-CspB (Abb. 3.36, blauer Balken). Da CspB in den Typ II - Fibrillen das Oligonukleotid dT7 nicht mehr binden konnte, sollte es auch in diesen Fibrillen, wie bereits zuvor für Fibrillen vom Typ I gezeigt, entfaltet vorliegen (siehe S. 58f, 3.3.3.1).



Abbildung 3.36: Charakterisierung des Faltungszustandes von CspB in Fibrillen vom Typ II. Abnahme der Fluoreszenz nach dT7-Bindung von CspB in den Fibrillen. Die Messungen wurde in 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 bei 20°C, einer Proteinkonzentration von 3 μ M und einer dT7-Konzentration von 5 μ M durchgeführt.

3.5.2.2 Proteolysegeschützter Bereich von Typ II - Fibrillen

Um den proteolysegeschützten Bereich in Typ II - Fibrillen zu bestimmen wurden die Fibrillen 2 h lang mit Proteinase K inkubiert und anschließend auf ein SDS-Gel aufgetragen (Abb. 3.37).



Abbildung 3.37: SDS-PA-Gel von fibrillären CspB-Fusionsproteinen vor und nach Proteolyse mit Proteinase K. Coomassie gefärbt. Die Proteolyse erfolgte in einem Massenkonzentrationsverhältnis von 1:50 (Protease : Protein) über einen Zeitraum von 2 h. Der Stern kennzeichnet monomeres Protein. M - Marker.

Bereits auf den ersten Blick ist erkennbar, dass die Fibrillen der ∆Ala-Varianten im Gegensatz zu den Fibrillen der Varianten mit Alaninen keine Resistenz gegenüber SDS aufwiesen. Selbst vor der Proteolyse waren keine Banden mit höherem Molekulargewicht

feststellbar, die nicht in das Trenngel eingewandert waren. Der größte Teil des Proteins war im Gel als monomere Bande zwischen 10 und 15 kDa erkennbar (Δ Ala-L3/16-CspB,* 0 h). Ein sehr viel geringerer Anteil bildete SDS-stabile Dimere (bei ca. 20 kDa) bzw. Trimere (bei ca. 30 kDa). Nach der zweistündigen Proteolyse war bei beiden Δ Ala-Varianten nur noch eine sehr schwache Bande, die dem Monomer entsprach, feststellbar. Fibrillen der Fusionsproteine mit Alaninen dagegen blieben, wie schon für Fibrillen vom Typ I gezeigt, während der Proteolyse weitgehend stabil und wiesen eine Resistenz gegenüber SDS auf. Da allerdings auch für Fibrillen der AAla-Varianten nach der Zentrifugation nach Proteolyse ein Pellet erhalten wurde, sollten auch diese Fibrillen eine gewisse Resistenz gegenüber Proteinase K besitzen. Das proteasebehandelte Material aller Varianten wurde in 6 M Guanidiniumthiocyanat (GdmSCN) solubilisert und die erhaltenen Peptide mittels RP-HPLC und Massenspektrometrie analysiert.

Da in den RP-HPLC-Chromatogrammen kein bestimmter Bereich festgestellt werden konnte, über den die Peptide von der Säule eluierten, und zudem die Intensität der *Peaks* sehr gering war, sind die Chromatogramme im Anhang dargestellt (siehe S. 122, Abb. 8.6). Lediglich die Peptide der Δ Ala-Varianten eluierten nach ca. 60 Minuten in einem *Peak* mit relativ hoher Intensität. Trotz der teilweise sehr geringen Intensität wurden einzelne *Peaks* aufgefangen und massenspektrometrisch analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.38 dargestellt.

10/17Ala-L3/16-CspB

His- <i>Tag</i> -Ala-Linker-LEGKVKWFNSEKGFGFIEVEGQDDVFKTLEEGQAVSF EIVEG NRGPQAANVTKEA					
His- <i>Tag</i> Ala + $L3/1$	6 CspB				
∆Ala-L3/16-CspB					
His-Tag-Linker-LEGKVKWFNSEKGFGFIEVEGQDDVFKTLEEGQAVSFEIVEGNRGPQAANVTKEA					
His-Tag L3/16	CspB				

Abbildung 3.38: Schematische Darstellung der proteolyseresistenten Sequenz der geschüttelten Fibrillen. Die unterstrichenen Aminosäuren kennzeichnen die mittels Massenspektrometrie nachgewiesene Sequenz. Die fett gedruckten Aminosäuren der Varianten 10/17Ala-L3/16-CspB kennzeichnen den Bereich, bis zu dem Peptide gefunden werden konnten.

Im Gegensatz zu Fibrillen vom Typ I konnte keine definierte proteolysegeschützte Sequenz festgestellt werden. Im Fall der Δ Ala-Varianten wurde unabhängig von der Länge des Linkers neben sehr vielen kurzen Peptiden auch stets das gesamte, intakte Fusionsprotein durch die massenspektrometrischen Analysen gefunden (Abb. 3.38). Für die Varianten mit zehn bzw. 17 Alaninen wurden ebenfalls sehr viele kurze Peptide mit einer molekularen Masse zwischen 700 und 1000 Da gefunden. Diese deckten fast die gesamte Aminosäuresequenz der Proteine ab. Lediglich die letzten 13 bis 18 C-terminalen Aminosäuren waren nach der Proteolyse nicht mehr detektierbar.

Die Ergebnisse bestätigen, dass unter Schütteln entstandene Fibrillen eine andere Morphologie besitzen als Fibrillen vom Typ I. In den Typ I - Fibrillen bestand die proteolysegeschützte Kernsequenz hauptsächlich aus den Alaninen und ca. 15 bis 20 N- und C-terminal davon gelegenen Aminosäuren (siehe S. 62, Abb. 3.23). In den Typ II - Fibrillen waren in allen untersuchten Varianten zusätzlich Bereiche von CspB in die Fibrillen integriert. Zwischen den verschiedenen Varianten mit Alaninen konnten keine Unterschiede in den integrierten Sequenzen gefunden werden. Der bereits unter dem Elektronenmikroskop beobachtete Unterschied zwischen Fibrillen der Varianten in An- und Abwesenheit der Alaninsequenz konnte auch durch die Proteolyseexperimente bestätigt werden. So waren in Fibrillen der Δ Ala-Varianten auch die letzten C-terminalen Aminosäuren, die in Fibrillen der Varianten mit Alaninen nicht proteolysegeschützt waren, im proteolysegeschützten Bereich.

3.5.2.3 Röntgenbeugung von Typ II - Fibrillen aus 17Ala-L16-CspB

Die Untersuchung durch Röntgenbeugung wurde auch für unter Schütteln entstandene Fibrillen beispielhaft an Fibrillen der Variante 17Ala-L16-CspB durchgeführt. Abbildung 3.39 zeigt das gemessene Röntgenbeugungsmuster.



Abbildung 3.39: Röntgenbeugungsmuster von Fibrillen aus 17Ala-L16-CspB. Die weißen Pfeile markieren erhaltene Reflexionen.

Die beiden intensiven Reflexionen bei 6.45 und 5.3 Å, die auch bei den Fibrillen vom Typ I festgestellt wurden, konnten erneut detektiert werden (siehe S. 63, Abb. 3.24). Wie bereits zuvor beschrieben, entspricht die Reflexion bei 5.3 Å dem Abstand von β -Faltblättern

für Alanin-Seitenketten (Fraser & MacRae, 1973). Weiterhin wurden einzelne Reflexionen bei 4.15 und 4.85 Å gemessen. Fibrillen vom Typ I zeigten anstelle der einzelnen Signale einen breiten Bereich mit erhöhter Intensität. Möglicherweise ist der Bereich für Fibrillen vom Typ II besser aufgelöst als in dem Röntgenbeugungsmuster der Fibrillen vom Typ I. Die Reflexion bei 4.85 Å entspricht wahrscheinlich dem Abstand der β -Stränge des Faltblattes in den Fibrillen. Die Reflexion bei 4.15 Å ist vermutlich lösungsmittelbedingt. Der schwache Reflex bei 9.7 Å, der für Fibrillen vom Typ I nicht nachgewiesen werden konnte, korreliert mit dem in der Literatur beschriebenen Abstand von β -Faltblättern in amyloiden Fibrillen (Sunde *et al.*, 1997). Warum für Typ II – Fibrillen sowohl eine Reflexion bei 9.7 Å als auch bei 5.3 Å gemessen werden konnte, blieb unklar. Dies würde bedeuten, dass sowohl β -Faltblätter mit einem Abstand von 5.3 Å in den Fibrillen enthalten wären, die durch die Alanine verursacht werden als auch β -Faltblätter mit einem Abstand von 9.7 Å. Der Unterschied im gemessenen Beugungsmuster zwischen Typ I - und Typ II - Fibrillen deutet ebenfalls darauf hin, dass sich die Fibrillen hinsichtlich ihrer molekularen Struktur voneinander unterscheiden.

3.5.2.4 Vergleichbare Stabilität der Typ I - und Typ II - Fibrillen gegenüber chemischen Denaturierungsmitteln

Nachfolgend wurde untersucht, ob sich Typ II - Fibrillen hinsichtlich der Stabilität von Fibrillen vom Typ I unterscheiden würden (siehe S. 64f, 3.3.3.4). Hierfür wurden die Fibrillen in Puffer mit ansteigenden GdmCl-Konzentrationen inkubiert und anschließend die Konzentrationen an fibrillärem und monomeren Protein sowie das Maximum der Tryptophanfluoreszenz bestimmt (Abb. 3.40).

Typ II - Fibrillen aller Varianten zeigten eine nur geringe Stabilität gegenüber GdmCl. Typ II - Fibrillen der Varianten mit 17 Alaninen konnten ähnlich den Fibrillen vom Typ I bereits mit 1 bis 1.5 M GdmCl teilweise solubilisiert werden (Abb. 3.40 A, B). Nach Behandlung mit 2 M GdmCl waren ca. 50% der Fibrillen aufgelöst. Typ II - Fibrillen der Varianten mit 10 Alaninen zeigten wie Typ I – Fibrillen eine leicht erhöhte Stabilität gegenüber GdmCl. So wurden 50% der Fibrillen erst nach Behandlung mit 3 M des Denaturierungsmittels solubilisiert, während die Inkubation mit 1 M GdmCl noch zu keiner Auflösung der Fibrillen führte (Abb. 3.40 C, D). Eine vollständige Solubilisierung der Fibrillen wurde mit ca. 4 M (17Ala) bzw. 4.5 M GdmCl (10 Ala) erreicht. Bei Fibrillen der Δ Ala-Varianten reichten bereits 3 M GdmCl aus, um die Fibrillen vollständig zu solubilisieren (Abb. 3.40 E, F).



Abbildung 3.40: Stabilität der Typ II - Fibrillen gegenüber Guanidiniumhydrochlorid. (A) 17Ala-L16-CspB. (B) 17Ala-L3-CspB. (C) 10Ala-L16-CspB. (D) 10Ala-L3-CspB. (E) ΔAla-L16-CspB. (F) ΔAla-L3-CspB. Schwarze Quadrate kennzeichnen den Anteil des fibrillären Proteins und weiße Quadrate den Anteil des löslichen Proteins. Die Maximumsverschiebung der Tryptophanfluoreszenz wird durch rote Quadrate dargestellt.

Das Maximum der Tryptophanfluoreszenz verschob sich in den Fibrillen der Fusionen mit Alaninen ähnlich den Fibrillen vom Typ I auf ca. 340 nm (Abb. 3.40 A-D, rote Quadrate). Diese Blauverschiebung war in Fibrillen der Fusionen ohne Alanine noch verstärkt. Hier lag das Maximum der Fluoreszenz bei 332 bzw. 335 nm (Abb. 3.40 E, F, rote Quadrate). Auch diese Tatsache deutet auf einen Unterschied in den Fibrillenstrukturen zwischen Fibrillen der

Varianten mit bzw. ohne Alanine hin, der bereits anhand der elektronenmikroskopischen Aufnahmen vermutet wurde.

Erstaunlich ist, dass die Stabilität der Fibrillen weiterhin von der Anwesenheit und Länge der Alaninsequenz abhängig war, obwohl die Fibrillierung selbst alanin-unabhängig stattfand. Zum einen wäre es denkbar, dass die initiale Fibrillenbildung unabhängig von den Alaninen verläuft, aber die Alanine trotzdem einen Einfluss auf die Struktur der Fibrillen besitzen. Zum anderen besteht auch die Möglichkeit, dass sich der Fibrillierungsmechanismus in Anwesenheit der Alanine von der Fibrillierung der Δ Ala-Varianten grundsätzlich unterscheidet.

3.5.3 Fibrillierung von Fusionen mit MCspB

Wie in Abschnitt 3.3.4 beschrieben, verhindert die Stabilisierung von CspB um ca. 8 kJ/mol die poly-alanin-induzierte Fibrillierung unter "konventionellen Bedingungen" (siehe S. 65ff, 3.3.4). Nachfolgend wurde untersucht, ob die Fibrillenbildung auch dann durch diese Stabilisierung inhibiert werden kann, wenn die Ansätze mit 500 rpm geschüttelt werden. Zunächst wurde wieder mit Hilfe der ANS-Fluoreszenz überprüft, ob sich während der Inkubation der Proben hydrophobe Oberflächen bilden, an die der Fluoreszenzfarbstoff binden kann. Abbildung 3.41 zeigt, dass die ANS-Fluoreszenz auch für alle Fusionen mit MCspB nach ca. fünf bis 15 Tagen über die Zeit anstieg. Dieser Anstieg war unabhängig von der Anwesenheit und Anzahl der Alanine und erfolgte nur wenige Tage später als für Fusionen mit Wildtyp-CspB (vergleiche Abb. 3.41 mit Abb 3.32, siehe S. 72).



Abbildung 3.41: Fibrillierungskinetiken der Fusionen mit MCspB mit einem Linker von drei (A) bzw. 16 Aminosäuren (B). Die Proteine wurden in 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, 0.1% (*w/v*) NaN₃, pH 7.5 bei einer Konzentration von 0.5 mM und 37°C schüttelnd inkubiert. Die Auswertung der ANS-Fluoreszenz erfolgte bei einer Wellenlänge von 480 nm.

Nachfolgend wurde mittels Elektronenmikroskopie untersucht, ob sich in den Ansätzen Fibrillen gebildet hatten (Abb. 3.42). Wie bereits für Fusionen mit Wildtyp-CspB gezeigt (siehe S. 71ff, 3.5.1), konnten auch für alle Fusionsproteine mit MCspB fibrilläre Strukturen nachgewiesen werden. Diese Strukturen waren den Fibrillen, die sich unter Schütteln aus Fusionen mit CspB gebildet hatten, morphologisch sehr ähnlich. Auch hier konnten sowohl lange Fibrillen als auch kurze Fibrillenbruchstücke, die wahrscheinlich durch das Schütteln entstanden waren, beobachtet werden. Die Stabilisierung von CspB um ca. 8 kJ/mol hatte demnach keinen Einfluss auf die Fibrillierung, wenn die Probenlösung mit 500 rpm geschüttelt wurde.



Abbildung 3.42: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Typ II - Fibrillen mit MCspB. (A) Fusionen mit einem Linker von drei Aminosäuren. (B) Fusionen mit einem Linker von 16 Aminosäuren. Die Aufnahmen entstanden bei einer Vergrößerung von 50 000 und die Grids wurden bei einer Proteinkonzentration von 0.5 mM präpariert.

3.5.3.1 Entfaltetes Protein in Typ II - Fibrillen mit MCspB

Da auch bei Fusionen mit MCspB die ∆Ala-Varianten Fibrillen bildeten, wurde vermutet, dass MCspB trotz der stabilisierenden Mutation in die Fibrillen integriert war und demzufolge keinerlei Aktivität mehr besitzen sollte. Um diese Hyptohese zu bestätigen, wurde mit dem Oligonukleotid dT7 die native Struktur getestet. Als Positivkontrolle diente

monomeres ΔAla-L3-MCspB, dessen Tryptophanfluoreszenz nach der Zugabe von dT7 nahezu vollständig gequencht wurde (Abb. 3.43, blauer Balken).

Für alle fibrilläre MCspB-Varianten konnte nach dT7-Zugabe nur eine sehr geringe Fluoreszenzabnahme gemessen werden (Abb. 3.43, schwarze und rote Balken). Demnach lag auch MCspB in den Fibrillen entfaltet vor.



Abbildung 3.43: Charakterisierung des Faltungszustandes von MCspB in Typ II - Fibrillen. Abnahme der Fluoreszenz in 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 nach dT7-Bindung von MCspB in den Fibrillen. Die Messungen erfolgten bei einer dT7-Konzentration von 5 μ M und einer Proteinkonzentration von 3 μ M bei 20°C.

3.5.3.2 Die Stabilität der Typ II - Fibrillen gegenüber chemischen Denaturierungsmitteln bleibt von der Mutation A46K/S48R unbeeinflusst

Im Folgenden wurde untersucht, ob sich die Doppelmutation A46K/S48R in MCspB auf die Stabiliät der Typ II - Fibrillen auswirkte. Auch diese Fibrillen wurden in ansteigenden GdmCl-Konzentrationen inkubiert und anschließend der Anteil an fibrillärem und monomerem Protein sowie das Maximum der Tryptophanfluoreszenz gegen die GdmCl-Konzentration aufgetragen (Abb. 3.44).

Bereits mit 1.5 M GdmCl konnte ein geringer Anteil aller Typ II – Fibrillen mit MCspB solubilisiert werden. Die leicht erhöhte Stabilität der Fibrillen der 10Ala-Varianten fusioniert mit CspB (siehe S. 79, Abb. 3.40 C, D) konnte interessanterweise für die Fibrillen der Fusionen mit MCspB nicht festgestellt werden (Abb. 3.44 C, D). Fibrillen der Fusionen mit MCspB zeigten ebenfalls eine nur geringe Stabilität gegenüber GdmCl. Die Stabilität der Fibrillen scheint also weitgehend unbeeinflusst von der Mutation A46K/S48R zu bleiben.



Abbildung 3.44: Stabilität der unter Schütteln erzeugten Fibrillen gegenüber der Solubilisierung mit Guanidiniumhydrochlorid. (A) 17Ala-L16-MCspB. (B) 17Ala-L3-MCspB. (C) 10Ala-L16-MCspB. (D) 10Ala-L3-MCspB. (E) Δ Ala-L16-MCspB. (F) Δ Ala-L3-MCspB. Der Anteil des löslichen Proteins ist durch weiße und der des fibrillären Proteins durch schwarze Quadrate dargestellt. Die Maximumsverschiebung der intrinsischen Fluoreszenz wird durch rote Quadrate beschrieben.

3.6 Einfluss des His-Tags auf die Fusionsproteine

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Fusionsproteine enthielten, um die Aufreinigung mittels Metallchelat-Affinitätschromatographie zu ermöglichen, einen N-terminalen His-*Tag*. Dieser His-*Tag* bestand neben den sechs Histidinresten zusätzlich aus einer sechs Aminosäuren umfassenden Thrombin-Schnittstelle (LVPRGS). Somit befanden sich am N-

Terminus aller Fusionsproteine 19 zusätzliche Aminosäuren: GSSHHHHHHHSSGLVPRGSH. Um zu überprüfen, ob diese Aminosäuren die Faltung und Stabilität von CspB sowie die Fibrillierung der Fusionsproteine beeinflussen, wurde der His-*Tag* von Δ Ala-L3-CspB, 10Ala-L3-CspB und 17Ala-L3-CspB abgespalten (Abb. 3.45).



Abbildung 3.45: SDS-PA-Gel der L3-CspB-Fusionen vor und nach der Thrombinspaltung. Coomassie gefärbt. (+) Varianten mit His-*Tag*, (-) Varianten ohne His-*Tag*.

Nach der Proteolyse waren nur noch die Aminosäuren Ser und His N-terminal der Alaninsequenz bzw. des Linkers vorhanden. Allerdings war die Abspaltung des *Tags* ineffizient und führte zu großen Verlusten an Protein. So konnte für alle drei Varianten nur ca. ein Drittel des eingesetzten Proteins ohne *Tag* erhalten werden.

3.6.1 Faltung und Stabilität von CspB in den monomeren Fusionsproteinen nach Abspaltung des His-*Tags*

Zunächst wurden mit Hilfe der Fern- und Nah-UV-CD-Spektroskopie Unterschiede in der Sekundär- bzw. Tertiärstruktur zwischen den Fusionsproteinen in An- und Abwesenheit des His-*Tags* analysiert (Abb. 3.46). Die Abspaltung des His-*Tags* führte zu einer Amplitudenzunahme der Fern-UV-CD-Spektren, vor allem der Varianten Δ Ala bzw. 10Ala (Abb. 3.46 A, schwarze Linien). Die Differenzspektren aus dem jeweiligen Spektrum vor und nach der Thrombinspaltung zeigen, dass das Spektrum des His-*Tags* dem Verlauf eines *Random coil* ähnelt (Daten nicht gezeigt). Die Entfernung des His-*Tags* führte demnach zu einem Gesamtstrukturgewinn im Protein. Der Verlauf der Nah-UV-CD-Spektren der verschiedenen Fusionen vor und nach der Thrombinspaltung ist identisch und impliziert eine identische Tertiärstruktur von CspB (vergleiche Abb. 3.46 B, rote Linie mit schwarzen Linien).



Abbildung 3.46: CD-Spektren der L3-CspB-Varianten in An- und Abwesenheit des His-*Tags*. Die Spektren wurden in 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 bei 20°C gemessen. (A) Fern-UV-CD-Spektren. Varianten mit His-*Tag* in rot, Varianten ohne His-*Tag* in schwarz. Δ Ala - durchgezogene Linien, 10Ala - gestrichelte Linien, 17Ala - kurz gestrichelte Linien. (B) Nah-UV-CD-Spektren. Die rote Linie entspricht 17Ala-L3-CspB mit His-*Tag*. Varianten ohne His-*Tag* in schwarz. Die verschiedenen Fusionen wurden nicht farblich unterschieden, da die Spektren nahezu identisch waren.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben (siehe S. 18) und auch für MCspB gezeigt (siehe S. 65ff, 3.3.4), ist die thermodynamische Stabilität ΔG_D des CspB-Fusionspartners relevant für die Fibrillenbildung. Deshalb wurde mit Hilfe von chemisch- und thermischinduzierten Gleichgewichtsübergängen überprüft, ob der His-*Tag* die thermodynamische Stabilität ΔG_D der L3-CspB Fusionsproteine beeinflusst. Abbildung 3.47 zeigt die Harnstoffinduzierten Denaturierungen der Fusionsproteine nach Thrombinspaltung. Alle Entfaltungen waren vollständig reversibel (Daten nicht gezeigt).



Abbildung 3.47: Chemisch-induzierte Denaturierung der L3-CspB-Varianten ohne His-*Tag.* Die Messungen erfolgten in 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 mit variierenden Harnstoffkonzentrationen bei einer Proteinkonzentration von 3 μ M und 20°C. Nach einer Anregung bei 295 nm wurde die Emission bei 345 nm bestimmt.

Tabelle 3.5 stellt die ermittelten thermodynamischen Parameter der Gleichgewichtsübergänge im Vergleich zu den Varianten mit His-*Tag* dar. Nach der Abspaltung des *Tags* von den L3-Varianten mit zehn bzw. 17 Alaninen konnte ein ΔG_D -Wert von ca. 6 kJ/mol ermittelt werden. Dieser Wert stimmt mit dem gemessenen ΔG_D -Wert für die

Varianten mit His-*Tag* überein. Die thermodynamische Stabilität von Δ Ala-L3-CspB ohne *Tag* weicht um ca. 1 kJ/mol leicht vom ΔG_D -Wert der Variante mit His-*Tag* ab. Dieser Unterschied liegt aber im Bereich der Standardabweichungen beider Messwerte und kann demnach vernachlässigt werden. Auch die Übergangsmittelpunkt-Temperaturen der thermischen Entfaltung stimmen zwischen den Varianten mit und ohne *Tag* annähernd überein.

Tabelle 3.5: Thermodynamische Parameter der chemischen und thermischen Entfaltung. Vergleichend dargestellt sind die Parameter für Varianten mit bzw. ohne (Δ His) His-*Tag*.

Fusionsprotein	$\Delta G_{\rm D}$ (kJ/mol)	m (kJ/mol M)	$D_{1/2}(M)$	$T_{\rm m}$ (°C)
17Ala-L3-CspB ∆His	5.9 ± 0.6	4.1 ± 0.3	1.4	36.6 ± 0.2
17Ala-L3-CspB	6.0 ± 0.4	4.0 ± 0.2	1.5	35.6 ± 0.2
10Ala-L3-CspB ∆His	6.3 ± 0.7	3.9 ± 0.3	1.6	37.7 ± 0.3
10Ala-L3-CspB	6.0 ± 0.5	3.5 ± 0.2	1.7	36.7 ± 0.3
ΔAla-L3-CspB ΔHis	8.7 ± 0.8	4.2 ± 0.4	2.1	42.1 ± 0.1
∆Ala-L3-CspB	9.8 ± 0.6	4.3 ± 0.2	2.3	40.0 ± 0.1

Die Daten zeigen, dass der His-*Tag* weder Einfluss auf den Faltungszustand noch auf die thermodynamische Stabilität der L3-CspB-Varianten besitzt. Anschließend wurde untersucht, ob sich der *Tag* auf das Fibrillierungsverhalten der Fusionsproteine auswirkt.

3.6.2 Die *lag*-Phase der Fibrillenbildung bleibt unverändert

Da der *Tag* weder eine Einwirkung auf den Faltungszustand noch die Stabilität der getesteten Varianten besaß, ist anzunehmen, dass auch die *lag*-Phase der Fibrillierung unbeeinflusst vom His-*Tag* blieb. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die Fusionsproteine bei einer Konzentration von 0.5 mM mehrere Wochen lang bei 37°C inkubiert. Abbildung 3.48 zeigt die mit dem Fluoreszenzfarbstoff ANS gemessenen Fibrillierungskinetiken.





Wie bereits für die Fusionen mit His-Tag beobachtet, erfolgte für 17Ala-L3-CspB ΔHis ein sofortiger Anstieg der ANS-Fluoreszenz (Abb. 3.48, Kreise). Die lag-Phase der Variante mit zehn Alaninen betrug ca. 30 Tage, bis auch hier eine ansteigende ANS-Fluoreszenz detektierbar war (Abb. 3.48, Quadrate). Dieser Zeitraum stimmte mit der lag-Phase der Variante ohne His-Tag überein. AAla-L3-CspB AHis zeigte zu keinem Zeitpunkt eine Interaktion mit ANS. Abbildung 3.49 zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen der Ansätze von 10/17Ala-L3-CspB AHis mit kurzen und "verklebten" fibrillären Strukturen, die den Fibrillen der Varianten mit His-Tag stark ähneln (siehe S. 54, Abb. 3.15).



50 000 fach

17Ala-L3-CspB ΔHis 85 000 fach

50 000 fach

85 000 fach

Abbildung 3.49: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Fibrillen aus Fusionen ohne His-Tag. Die Präparation der Grids erfolgte nach 202 Tagen bei einer Proteinkonzentration von 0.5 mM. Die Vergrößerung ist unter den einzelnen Bildern angegeben.

Unter den hier getesteten Bedingungen konnte demnach kein Einfluss des His-Tags auf die Fibrillenbildung der Fusionsproteine festgestellt werden. Zudem wurde bereits in früheren Arbeiten gezeigt, dass der His-Tag weder einen Einfluss auf die Fibrillierung der direkten Fusionen von Alaninpeptiden mit MCspB noch auf die Fibrillenbildung der Nterminalen Domäne von PABPN1 besitzt (Scheuermann et al., 2003; Winter, 2008). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Kinetik der Fibrillenbildung aller der in dieser Arbeit untersuchten Fusionsproteine durch die Anwesenheit des His-Tags unbeeinflusst war. Da allerdings einige Aminosäuren des His-Tags in der erweiterten proteolysegeschützten Sequenz B von Typ I - Fibrillen nachgewiesen wurden, ist nicht auszuschließen, dass der His-Tag die molekulare Struktur der Fibrillen beeinflussen könnte.

4 Diskussion

4.1 Poly-alanin-abhängige Fibrillierung der Linkerfusionen

Die Expansion der Poly-Alanin-Sequenz des nukleären poly-Adenin-bindenden Proteins PABPN1 löst die spät einsetzende Erkrankung okulopharyngeale Muskeldystrophie aus (Brais et al., 1998). Als Merkmal der Krankheit wurden in Muskelfasern intranukleäre, fibrilläre Ablagerungen nachgewiesen, die PABPN1 enthielten (Tomé & Fardeau, 1980; Uyama et al., 2000). In vivo-Studien zur Ablagerung von PABPN1 führten zu widersprüchlichen Ergebnissen. Eine Abhängigkeit der Ablagerung des Proteins von der Alaninsequenz konnte nur in einigen, aber nicht in allen Untersuchungen nachgewiesen werden (Chartier et al., 2006; Fan et al., 2001; Klein et al., 2008; Konopka et al., 2011; Shanmugam et al., 2000). Für die isolierte N-terminale Domäne von PABPN1 konnte in vitro gezeigt werden, dass die Erweiterung der natürlichen Poly-Alanin-Sequenz von zehn auf 17 Alanine zur Bildung extrem stabiler, fibrillärer Strukturen führt. Überraschenderweise fibrillierte in vitro auch die Wildtyp-Variante der N-terminalen Domäne mit zehn Alaninen. Allerdings war bei diesen Fibrillierungen die *lag*-Phase stark verlängert. Für die N-terminale Domäne mit deletierter Alaninsequenz (AAla) konnten keine Fibrillen nachgewiesen werden (Lodderstedt et al., 2007; Scheuermann et al., 2003). Erste Analysen zur Fibrillenbildung des Voll-Längen-Proteins deuteten darauf hin, dass PABPN1 in vitro unabhängig von der Poly-Alanin-Sequenz fibrilliert (Hempel, 2011; Winter et al., Manuskript in Vorbereitung). Dieses Ergebnis war unerwartet und die biochemischen Voraussetzungen für die Fibrillierung werden derzeit analysiert.

Untersuchungen, ob die poly-alanin-abhängige Fibrillierung von einer benachbarten, gefalteten Domäne beeinflusst wird, konnten bislang nicht mit dem Voll-Längen-Protein PABPN1 durchgeführt werden, da weder der Faltungsmechanismus noch die Struktur des gesamten Proteins bekannt ist. Außerdem handelt es sich bei PABPN1 um ein Multidomänen-Protein: Es besteht aus (i) einer N-terminalen Domäne, (ii) einem kurzen α -helikalen Segment, (iii) einer RNA-Binde-Domäne und (iiii) einer C-terminalen Domäne (Nemeth *et al.*, 2005; siehe *Review* Kühn & Wahle, 2004). Die Struktur der RNA-Binde-Domäne konnte durch Röntgenkristallographie aufgeklärt werden (Ge *et al.*, 2008). Die bisher einzigen Untersuchungen zur Faltung des Proteins zeigten einen kooperativen Übergang der isolierten RNA-Binde-Domäne mit einer thermodynamischen Stabilität (Gibbs freie Energie der Denaturierung ΔG_D) von ca. 15 kJ/mol (Scheuermann *et al.*, 2003). Aufgrund der wenigen Ergebnisse zur Faltung und Struktur des Proteins und der Tatsache, dass es sich bei PABPN1

um ein Multi-Domänenprotein handelt, ist es unwahrscheinlich, dass das Protein nach einem Zweizustandsmodell faltet.

Um zu untersuchen, ob die poly-alanin-abhängige Fibrillierung von einer benachbarten, gefalteten Domäne beeinflusst wird, wurde in unserer Arbeitsgruppe die Fibrillierung anhand verschiedener Fusionen von Poly-Alanin-Sequenzen mit einem Modellprotein analysiert. Als Modellprotein wurde das Kälteschockprotein B (CspB) aus *Bacillus subtilis* gewählt, da sowohl die Struktur als auch der Faltungsmechanismus des Proteins gut verstanden ist (Garcia-Mira *et al.*, 2004; Schindelin et al., 1993; Schindler *et al.*, 1995; Schnuchel *et al.*, 1993). CspB faltet nach einem Zweizustandsmodell ohne charakterisierbare Intermediate und eignet sich daher sehr gut, um den Einfluss der thermodynamischen Stabilität ΔG_D einer benachbarten Domäne auf die Fibrillenbildung zu analysieren.

In vorhergehenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe wurden sowohl die Nterminalen Domänen von PABPN1 (ΔAla, 10Ala, 17Ala) als auch zwei verschiedene Alaninpeptide (10Ala, 17Ala) an CspB fusioniert, und die Fibrillierung der Varianten analysiert. Das stabil gefaltete Protein CspB lag in Fibrillen der Fusionen mit der Nterminalen Domäne von PABPN1 nativ gefaltet vor. Im Gegensatz dazu war CspB in Fibrillen der direkten Fusionen mit Alaninpeptiden entfaltet (Sackewitz *et al.*, 2008). Dies deutete darauf hin, dass der Abstand zwischen der Alaninsequenz und CspB von entscheidender Rolle für die Fibrillierung ist. Daher wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Linkern mit drei bzw. 16 Aminosäuren zwischen den Alaninen und CspB auf die Fibrillenbildung untersucht.

4.1.1 Betrachtungen zur lag-Phase der Fibrillierung

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zur Fibrillenbildung unter "konventionellen Bedingungen" (ohne Schütteln) unterstützen die Hypothese, dass Poly-Alanin-Expansionen Proteinmissfaltungen auslösen können: Sowohl die Wildtyp-CspB-Varianten mit drei als auch die Varianten mit 16 Aminsäuren als Linker bildeten nur in Anwesenheit der Alaninsequenz fibrilläre Strukturen. Dabei besaß der Linker einen signifikanten Einfluss auf die *lag*-Phase der Fibrillenbildung. Die *lag*-Phase der Fibrillierung von Fusionen mit einem Linker von 16 Aminosäuren war immer kürzer als die der Varianten mit einem Linker von drei Aminosäuren. Diese Beobachtung war unerwartet, da die L16-Linkervarianten im Gegensatz zu den L3-Varianten durch einen höheren ΔG_D -Wert stabilisiert waren. Für andere fibrillenbildende Proteine und auch für die hier untersuchten Fusionen mit stabilisiertem MCspB konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte thermodynamische Stabilität die *lag*-Phase der Fibrillierung eines Proteins verlängert (Chiti *et al.*, 2000; Espargaró *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010).

Die thermodynamische Stabilität von WT-CspB ist in den verschiedenen Fusionen mit Alaninpeptiden bereits sehr niedrig ($\Delta G_D = 6 - 8 \text{ kJ/mol}$). Im Laufe der Arbeit bestätigten die thermisch-induzierten Gleichgewichtsübergänge, dass je nach Variante bei 37°C ca. 40 - 60% der CspB-Moleküle entfaltet vorlagen. Die N-terminal fusionierten Alanine besitzen aufgrund ihres aliphatischen Charakters bei geringer thermodynamischer Stabilität des benachbarten Fusionsproteins eine starke Tendenz zur Zusammenlagerung, die wahrscheinlich die molekulare Grundlage der poly-alanin-induzierten Proteinmissfaltungen darstellt (Sackewitz, 2009). In dem Anteil der Fusionsproteine, in dem CspB bei 37°C entfaltet vorlag, können sich vermutlich die Alanine gegenüber dem wässrigen Lösungsmittel abschirmen und die Fibrillierung induzieren. Das bedeutet wiederum, dass nicht, wie zunächst in der Dissertation von Mirko Sackewitz vermutet, die Fibrillierung den Verlust der nativen Struktur von CspB zur Folge hatte (Sackewitz, 2009); sondern die Fibrillierung wahrscheinlich nur stattfinden konnte, weil ein gewisser Anteil der CspB-Moleküle bei 37°C bereits entfaltet vorlag. Daher ist es offensichtlich, dass die thermodynamische Stabilität $\Delta G_{\rm D}$ von CspB in den L3/16-Linkervarianten keinen Einfluss auf die *lag*-Phase der Fibrillierung besitzt. Auch der größere Abstand zwischen der amyloidogenen Sequenz und CspB bei den L16-Linkervarianten scheidet als Ursache für die unterschiedlichen Fibrillierungsgeschwindigkeiten aus. Der Abstand sollte nur dann eine Rolle spielen, wenn CspB unter Fibrillierungsbedingungen nativ gefaltet vorliegt.

Eine große Bedeutung kommt vermutlich der unterschiedlichen Primärsequenz der Aminosäuren zwischen Alaninsequenz und CspB in den Linkervarianten zu. Es wird allgemein angenommen, dass die Möglichkeit amyloide Fibrillen zu bilden eine generelle Eigenschaft von Polypeptidketten ist (Chiti *et al.*, 1999). Allerdings deutet die Beobachtung, dass einige Proteine *in vitro* "anfälliger" für Fibrillierungen sind als andere und die Tatsache, dass *in vivo* nur eine sehr geringe Anzahl von Proteinen überhaupt Fibrillen bildet, darauf hin, dass es sequenz-spezifische Elemente geben muss, die die Fibrillierung fördern (siehe *Reviews* Bemporad *et al.*, 2006; Nerelius *et al.*, 2010). Wie bereits in der Einleitung erwähnt, beruht die Bildung amyloider Fibrillen zwar hauptsächlich auf Interaktionen des Polypeptid-Rückgrates, aber auch die Seitenketten können die Fibrillierung beeinflussen (Knowles *et al.*, 2007). So können energetisch begünstigte Seitenketten-Interaktionen, wie z.B. hydrophobe Interaktionen und Wasserstoffbrückenbindungen die *Cross*-β-Struktur zusätzlich stabilisieren

91

(Knowles *et al.*, 2007). Die Primärsequenz der L16-Linkervarianten scheint demnach günstiger für die Fibrillierung zu sein als die Aminosäuren der L3-Linkervarianten. Des Weiteren konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass bereits der Austausch einer einzigen Aminosäure einen deutlichen Effekt auf die *lag*-Phase der Fibrillenbildung haben kann. Der Austausch von nur einem Alanin- zu einem Tryptophanrest führte zu einer stark verkürzten *lag*-Phase der Fibrillenbildung der N-terminalen Domäne von PABPN1 (Rohrberg *et al.*, 2008).

4.1.2 Strukturelle Eigenschaften der Fibrillen

Vor der Entstehung von Fibrillen aus 10/17Ala-L3/16-CspB bildeten sich zunächst in allen Fällen amorphe Strukturen. Diese amorphe Zusammenlagerung der Proteine konnte bereits für die direkten Fusionen 10Ala-CspB und 17Ala-CspB beobachtet werden (Sackewitz, 2009). Es stellte sich die Frage, ob die Fibrillierung unabhängig von der Entstehung der amorphen Strukturen geschieht oder ob sich die Fibrillen aus den Aggregaten bilden. Da das ANS-Fluoreszenzsignal während der Entstehung der fibrillären Strukturen, obwohl bereits Aggregate vorhanden waren, nicht erneut anstieg, könnte ein Zusammenhang amorphen Zusammenlagerung und zwischen der der Fibrillenbildung bestehen. Molekulardynamik-Simulationen der Fibrillierung eines Poly-Alaninpeptides bestehend aus 14 Alaninen unterstützen die Hypothese der Fibrillenbildung aus den amorphen Aggregaten (Nguyen & Hall, 2004). Die Simulationen zeigten, dass direkt nach Inkubationsbeginn der Peptidlösung kleine amorphe Aggregate gebildet wurden, die sich später zu größeren Aggregaten zusammenschlossen. Diese Aggregate wurden in kleine β-Faltblätter, bestehend aus drei bis sechs Peptiden, umgewandelt, die anschließend miteinander assoziierten und Fibrillen bildeten. Das Fibrillenwachstum erfolgte dann durch Anlagerung von Peptiden an die Enden der β-Faltblätter (Nguyen & Hall, 2004).

In dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass sich möglicherweise alle Fibrillen hinsichtlich ihrer Struktur voneinander unterscheiden. Bereits die verschieden langen *lag*-Phasen der Fibrillierung zwischen den Varianten mit L3- bzw. L16-Linker deuteten auf eine mögliche unterschiedliche Fibrillenstruktur hin. Diese Annahme wurde unterstützt durch die Ergebnisse der Untersuchungen zum heterologen *Seeding* von 10Ala-L3/16-CspB mit fragmentierten Fibrillen (*Seeds*) von 10Ala-CspB. Die Zugabe der *Seeds* beschleunigte nur die Fibrillenbildung von 10Ala-L16-CspB, nicht aber die Fibrillierung von 10Ala-L3-CspB. Wetzel und Mitarbeiter zeigten anhand einer *Seeding*-Studie mit diversen Punktmutationen von A β_{1-40} , dass die Spezifität von heterologem *Seeding* weniger durch eine ähnliche Primärsequenz der monomeren Proteine bestimmt wird. Vielmehr spielt die Konformation der amyloiden Fibrille und im Speziellen das Netzwerk der Wasserstoffbrückenbindungen am "wachsenden" Ende der Fibrille eine Rolle (O'Nuallain *et al.*, 2004). Daraus lässt sich schließen, dass sich die Konformationen der Fibrillen von 10Ala-L3-CspB und 10Ala-L16-CspB unterscheiden, da *Seeds* von 10Ala-CspB nur die Fibrillierung von 10Ala-L16-CspB beschleunigten.

Des Weiteren deuteten die Ergebnisse zur Solubilisierung der Fibrillen ebenfalls auf einen strukturellen Unterschied zwischen 10Ala- und 17Ala-Fibrillen hin. Fibrillen aus Fusionen mit zehn Alaninen (10Ala-L3/16-CspB) wiesen eine geringfügig höhere Stabilität gegenüber GdmCl auf als Fibrillen aus Fusionen mit 17 Alaninen (17Ala-L3/16-CspB). Für Fibrillen der N-terminalen Domäne von PABPN1 konnte mittels Rasterkraftmikroskopie bereits ein struktureller Unterschied zwischen den Varianten mit zehn bzw. 17 Alaninen festgestellt werden (Lodderstedt *et al.*, 2007).

4.1.3 Der Faltungszustand von CspB und die Fibrillenkernstruktur

Die Analyse des Faltungszustandes von CspB in den Fibrillen ergab, dass CspB in beiden Linkervarianten entfaltet vorlag. Die anfängliche Hypothese, dass ein Linker von 16 Aminosäuren ausreichen würde, um eine Struktur von CspB in den Fibrillen zu erhalten, erwies sich demnach als falsch. Diese Hypothese stützte sich auf Proteolyse-Experimente mit Fibrillen aus 10Ala-CspB, in denen festgestellt wurde, dass die Fibrillenkernstruktur neben der Alaninsequenz die 16 N-terminalen Aminosäuren von CspB enthielt (Sackewitz, 2009).

Um die Fibrillenkernsequenz der L3- und L16-Linkervarianten zu bestimmen, wurden erneut Proteolyse-Experimente mit anschließender massenspektrometrischer Analyse durchgeführt. Unabhängig davon, ob die Alaninsequenz zehn oder 17 Alanine umfasste, bestand die obligat proteolyseresistente Sequenz A der Fibrillenkernstruktur immer aus den Alaninen und sechs bzw. sieben C-terminal davon gelegenen Aminosäuren (Abb. 4.1).

Im Fall der L3-Linkervarianten befanden sich zusätzlich zur Alaninsequenz und dem Linker 12 bis 14 N-terminale Aminosäuren von CspB in der erweiterten proteolysegeschützen Sequenz B. Das N-terminale Leucin konnte sogar in der obligat proteolysegeschützten Sequenz A nachgewiesen werden. Da die Faltung von CspB auch in den Fusionen nach einem Zweizustandsmodell erfolgte, führte die Integration einiger Aminosäuren von CspB in die Fibrillen zwangsläufig dazu, dass das gesamte Protein entfaltete. Dies erklärt den Funktionsverlust von CspB in den Fibrillen der L3-Fusionsproteine.

17Ala-L16-CspB

Abbildung 4.1: Darstellung der proteolyseresistenten Kernsequenz der Fibrillen. Die rot markierten Aminosäuren kennzeichnen jeweils die erste und die letzte Aminosäure der obligat bzw. erweitert proteolysegeschützten Sequenz.

Fibrillen der L16-Linkervarianten beinhalteten neben den Alaninen und dem Linker eine bis sechs N-terminale Aminosäuren CspB nur von in der erweiterten proteolysegeschützten Sequenz B. Auch hier sollte deshalb CspB entfaltet vorliegen, da diese Aminosäuren in die Fibrillen integriert sein könnten. Wie bereits im Ergebnisteil erwähnt, kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass durch sterische Hinderung der Protease die tatsächliche Fibrillenkernsequenz einige Aminosäuren weniger umfasst als in Proteolyse-Experimenten ermittelt werden konnte (Miake et al., 2002; Sackewitz et al., 2008b). So unterscheidet sich z.B. im Fall von α-Synuclein die durch Proteolyse- bzw. H/D-Austausch-Experimente bestimmten Fibrillenkernstrukturen um 16 Aminosäuren (Del Mar et al., 2005; Miake et al., 2002).

In einer weiteren Arbeit fusionierten Hecht und Mitarbeiter das amyloidogene Peptid A β_{1-42} verbunden über einen Linker von zwölf Aminosäuren N-terminal an GFP (Wurth *et al.*, 2002). Nach Anregung mit blauem Licht fluoresziert korrekt gefaltetes GFP grün (Ward & Bokman, 1982). Die Fusion von A β_{1-42} an GFP führte zur Fibrillenbildung des Fusionsproteins, wobei die Fluoreszenz von GFP verhindert wurde. Die Fibrillierung von A β_{1-42} behinderte trotz des Linkers die Faltung von GFP (Wurth *et al.*, 2002). Die durch H/D-Austausch-Experimente ermittelte 3D-Struktur für Fibrillen von nicht-fusioniertem A β_{1-42} zeigte, dass die Reste 18 – 26 sowie 31- 42 die beiden β -Stränge der Kernregion der Fibrillen bilden (Lührs *et al.*, 2005). Leider gibt es keine publizierten Ergebnisse zur Ermittlung der

Kernsequenz der Fibrillen für Fusionen mit GFP. Da GFP in diesen Fusionen allerdings ungefaltet vorlag, ist entweder die Fibrillenkernsequenz auf den Linker und einige Aminosäuren von GFP erweitert oder die "dicht gepackte" *Cross*- β -Struktur des N-terminal fibrillierten A β_{1-42} behindert trotz des Linkers von zwölf Aminosäuren sterisch die Faltung von GFP. Eine entsprechende sterische Behinderung der Faltung von CspB, ohne dass tatsächlich Aminosäuren von CspB in die Fibrillen integriert sind, wäre auch in den Fibrillen der L16-Linkerfusionen denkbar.

Welche Anteile von CspB könnten nun in Fibrillen der L16-Linkervarianten integriert sein? Die L16-Fusionsproteine besitzen an Position sieben und 15 des Linkers ein Prolin. MacArthur und Thornton untersuchten 1021 Proline in Proteinen und stellten dabei fest, dass nur 11% der Proline in β-Faltblättern, meist in den endständigen β-Strängen, vorkommen (MacArthur & Thornton, 1991). Dies lässt sich damit erklären, dass der ø Torsionswinkel von Prolin in einer Peptidbindung ca. -65° beträgt und nicht mit β-Faltblättern kompatibel ist (Li et al., 1996). Daher werden Proline als sogenannte β-Faltblatt "breaker" bezeichnet (Chou & Fasman, 1974, 1974b). Der Effekt von Prolin als starker β-Faltblatt "breaker" wird in vielen Fibrillierungsstudien offensichtlich, in denen Mutationen zu Prolinen die Fibrillierung z.B. der Proteine A β_{1-40} , Amylin, α -Synuclein und β_2 -Mikroglobulin stark verzögerte oder sogar verhinderte (Chiba et al., 2003; Waxman et al., 2009; Westermark et al., 1990; Wood et al., 1995). Es ist deshalb eher unwahrscheinlich, dass die beiden Proline an Position sieben und 15 des Linkers von 10/17Ala-L16-CspB direkt in der Cross-β-Struktur lokalisiert sind. Allerdings lässt sich nicht ausschließen, dass Pro 7 die Cross-ß-Struktur flankiert. Festkörper-NMR-Analysen von Fibrillen der N-terminalen Domäne von PABPN1 zeigten zudem nur die Integration der Alanine und einiger Glycine in die Fibrillenkernsequenz (Sackewitz et al., 2008b). Dieses Ergebnis untermauert die Annahme, dass auch in den L16-Linkervarianten die Proline nicht direkt in der Cross-B-Struktur lokalisiert sind. Somit wäre es möglich, dass die Inaktivität von CspB in den Fibrillen auf eine sterische Behinderung der Faltung von CspB durch die Fibrillierung zurückzuführen ist.

Analysen zur Aktivität von CspB in den Fibrillen durch Testen der Substratbindung sind jedoch mit dem Risiko behaftet, dass CspB in den Fibrillen möglicherweise zwar korrekt gefaltet, aber für das Substrat unzugänglich ist. Die Tatsache, dass das Maximum der Tryptophanfluoreszenz in den Fibrillen der L16-Linkervarianten auf ca. 340 nm verschoben war, deutet allerdings darauf hin, dass CspB tatsächlich entfaltet vorliegt.

4.1.4 Einfluss der stabilisierenden Mutation in CspB auf die poly-alanininduzierte Fibrillenbildung

Die Bildung von amyloiden Fibrillen *in vitro* wird durch partiell denaturierende Bedingungen wie z.B einen niedrigen pH-Wert, erhöhte Temperatur oder Zugabe von Denaturierungsmitteln gefördert. Durch diese Bedingungen wird der native Zustand eines Proteins destabilisiert und es entsteht ein erhöhter Anteil an zumindest partiell entfalteten Konformationen, welche Voraussetzung für die Fibrillenbildung sind (siehe *Review* Chiti & Dobson, 2006; Jahn & Radford, 2005). In Übereinstimmung damit korreliert die Destabilisierung einer ganzen Reihe von Proteinen durch Punktmutationen mit der erhöhten Tendenz der Proteine zu fibrillieren (Acylphosphatase, B1-Domäne des IgG-Bindeprotein G, Lysozym, SH3-Domäne von α -Spektrin, Transthyretin, variable Region der leichten Ketten von Immunglobulin) (Booth *et al.*, 1997; Chiti *et al.*, 2000; Espargaró *et al.*, 2008; Hammarström *et al.*, 2002; Hurle *et al.*, 1994; Ramírez-Alvarado *et al.*, 2000)

Die in dieser Arbeit beschriebene Stabilisierung von CspB um ca. 8 kJ/mol in den L3/16-Linkervarianten führte zu einer vollständigen Inhibierung der poly-alanin-induzierten Fibrillierung der Fusionsproteine. Dieser hemmende Einfluss von MCspB auf die Fibrillenbildung konnte bereits für die direkten Fusionen 10Ala-MCspB und 17Ala-MCspB beobachtet werden (Winter, 2008).

Die in MCspB vorhandene Doppelmutation A46K/S48R verbessert die stabilisierenden Kontakte zwischen β -Strang 4 und β -Strang 1 des Proteins (Max *et al.*, 2007). Dies bewirkt, dass MCspB in den Fusionen im Gegensatz zu WT-CspB auch bei 37°C gefaltet vorlag. Eine Fibrillierung der Fusionsproteine mit MCspB wurde wahrscheinlich dadurch verhindert, dass Poly-Alanine, entgegen der anfänglichen Annahme, nicht in der Lage sind die Entfaltung einer stabil gefalteten Domäne zu induzieren. Die Tatsache, dass die Stabilisierung auch die Fibrillierung der L16-Linkervarianten inhibierte, unterstreicht, dass ein Linker von 16 Aminosäuren nicht ausreicht, um die Fibrillenbildung von der gefalteten Domäne zu entkoppeln. CspB liegt demnach auch bei einem Linker dieser Länge nicht strukturell unabhängig von der amyloidogenen Sequenz vor.

Wird der Abstand zwischen der amyloidogenen Sequenz und MCspB wie in den Varianten 10/17Ala-N-MCspB auf die N-terminale Domäne von PABPN1 erweitert, findet trotz stabilisiertem MCspB eine Fibrillierung der Fusionsproteine statt. Ähnlich der Fusionen aus N-terminaler Domäne von PABPN1 mit Wildtyp-CspB lagen in Fusionen mit MCspB ca. 50% der MCspB-Moleküle nativ gefaltet vor. MCspB ist in diesen Varianten strukturell unabhängig von den Konformationen der Alaninsequenz. Das bedeutet, dass die

96

Stabilisierung einer Domäne die Fibrillierung nur dann verhindert, wenn diese Domäne für die Fibrillenbildung zumindest teilweise entfalten muss.

Trotz dieser Tatsache scheint stabil gefaltetes MCspB sogar bei einer Entfernung von ca. 100 Aminosäuren zur Alaninsequenz den Fibrillierungsmechanismus zu beeinflussen, da elektronenmikroskopische Aufnahmen morphologische Unterschiede zwischen den Fibrillen aus 10/17Ala-N-CspB und 10/17Ala-N-MCspB zeigten. Andererseits könnte MCspB die Fibrillenoberfläche verändern, wodurch sich die Morphologie der Fibrillen von Fusionen mit MCspB von denen mit WT-CspB unterscheiden würden. Über die zugrunde liegenden molekularen Prozesse kann jedoch derzeit kaum spekuliert werden, da im Moment keine weiteren Informationen aus anderen Untersuchungen zum Einfluss einer von der amyloidogenen Sequenz entfernt liegenden gefalteten Domäne vorhanden sind.

4.2 Aktives Protein in amyloiden Fibrillen

Sowohl in Fibrillen der Fusionen aus N-terminaler Domäne mit WT-CspB (Sackewitz *et al.*, 2008), als auch in Fusionen mit MCspB konnte aktives Protein nachgewiesen werden. Daraus lässt sich schließen, dass die Fibrillenbildung nicht zwangsläufig zur Entfaltung und zum Funktionsverlust eines Proteins führen muss. Aktives Protein konnte bisher auch noch in Fibrillen anderer Proteine nachgewiesen werden (Baxa *et al.*, 2002; Krzewska *et al.*, 2007, Sambashivan *et al.*, 2005)

Ein Beispiel ist das aus Saccharomyces cerevisiae stammende Prionenprotein Ure2p. Es besteht aus einer fibrillenbildenden N-terminalen Domäne und einer C-terminalen welche durch Komplexbildung einem Transkriptionsfaktor Domäne, mit den Stickstoffmetabolismus kontrolliert (Wickner, 1994). In Fibrillen aus Fusionen der Nterminalen Domäne von Ure2p mit Barnase, Carbonischer Anhydrase, Glutathion-S-Transferase und GFP blieben die fusionierten Proteine weiterhin gefaltet und aktiv (Baxa et al., 2002). Allerdings verhinderte die Fibrillierung des Voll-Längen-Proteins die Komplexbildung der C-terminalen Domäne mit dem Transkriptionsfaktor (Baxa et al., 2002). Das bedeutet, die Fibrillierung führte zur Inaktivierung der natürlichen C-terminalen Domäne. Zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen war noch nicht bekannt, dass sich die Fibrillen der Nterminalen Prionen-Domäne von Ure2p von denen des Voll-Längen-Proteins unterscheiden. Während die N-terminale Domäne typische amyloide Fibrillen mit einer Cross-β-Struktur bildet, weisen Fibrillen des Voll-Längen-Proteins, die sich unter physiologischen Bedingungen bildeten, keine derartige Cross-β-Struktur auf. Wahrscheinlich ist die Fibrillenbildung auf nicht-native inter- bzw. intramolekulare Interaktionen zwischen Ure2pMonomeren, gefolgt von einer konformationellen Umlagerung des Proteins, zurückzuführen. Auch die C-terminale Domäne von Ure2p ist wahrscheinlich in die Fibrillen integriert (Bousset *et al.*, 2004). Das bedeutet, dass sich in den Untersuchungen von Baxa *et al.* die fibrilläre Struktur von Ure2p vermutlich stark von der Struktur der Fusionsproteine mit der Nterminalen Domäne unterscheidet.

Ein zweites Beispiel ist das Prionenprotein Sup35p, welches eine Rolle bei der Translations-Termination spielt. Das Protein besteht aus einer fibrillenbildenden N-terminalen (123 Aminosäuren) und einer katalytischen C-terminalen Domäne. Beide Domänen sind durch eine 129 Aminosäuren umfassende mittlere Domäne getrennt. Für Fibrillen aus Sup35p konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass die C-terminale, katalytische Domäne in Fibrillen immer noch in der Lage ist GTP zu hydrolysieren (Krzewska *et al.*, 2007). Trotz dieser *in vitro* nachgewiesenen Aktivität führte die Fibrillierung von Sup35p *in vivo* zum Überlesen von UAA-Stopp-Codons durch die C-terminale Domäne (Kawai-Noma *et al.*, 2010).

In einer weiteren Arbeit integrierten Eisenberg und Mitarbeiter eine aus zehn Glutaminen bestehende Poly-Glutamin-Sequenz in einen *Loop* von RNaseA und zeigten, dass diese Fusion Fibrillen bildete und die Fibrillen besaßen aktive RNaseA (Sambashivan *et al.*, 2005). Diese Aktivität beruhte allerdings auf einem *Domain Swapping* der beiden Domänen von RNAseA (Sambashivan *et al.*, 2005).

All diese Beispiele zeigen, dass gefaltetes, aktives Protein in amyloiden Fibrillen vorkommen kann. Allerdings konnte bisher noch für kein natürlich vorkommendes fibrilläres Protein Aktivität *in vivo* nachgewiesen werden. Die Publikation zur Fibrillenbildung der N-terminalen Domäne von Ure2p und des Voll-Längen-Proteins verdeutlicht, dass sich, auch wenn in bestimmten Fusionen Aktivitäten gemessen werden können, keine Rückschlüsse darauf ziehen lassen, ob auch das natürlich vorkommende Wildtyp-Protein in den Fibrillen aktiv ist (Baxa *et al.*, 2002). Ähnlich zur Fibrillierung von Ure2p deuteten erste Ergebnisse zur Fibrillierung von PABPN1 darauf hin, dass das Voll-Längen-Protein in den Fibrillen keine Aktivität besitzt (Winter *et al.*, *Manuskript in Vorbereitung*), obwohl CspB in Fusionen mit der N-terminalen Domäne von PABPN1 gefaltet und aktiv vorlag (Sackewitz *et al.*, 2008).

4.3 Fibrillierung unter dem Einfluss von Schütteln

Bereits 1991 wurde gezeigt, dass die *lag*-Phase der Fibrillierung von Insulin durch Schütteln drastisch verkürzt werden kann (Sluzky *et al.*, 1991). Die Autoren stellten fest, dass Schütteln die Denaturierung von Insulin beeinflusst und schlossen auf einen Einfluss der

97

Interaktion von Insulin mit unpolaren Oberflächen, wie der Luft-Wasser-Grenzschicht (Sluzky *et al.*, 1991). Auch später wurde postuliert, dass ein kontinuierliches Aussetzen monomerer Proteine der Luft-Wasser-Grenzschicht destabilisierend für Proteine ist, da das Protein in der Grenzschicht schneller (partiell) denaturiert und partiell gefaltete Intermediate bildet, die ausschlaggebend für die Fibrillierung sind (Almstedt *et al.*, 2009; Nielsen *et al.*, 2001). In der Tat konnten White und Mitarbeiter zeigen, dass die Tertiärstruktur von β -Lactoglobulin an der Luft-Wasser-Grenzfläche sehr viel weniger stabil ist als in Lösung (Perriman *et al.*, 2007).

Des Weiteren wird die Verkürzung der *lag*-Phase, die durch Schütteln verursacht wird, auf den erhöhten Stoffaustausch in der Lösung und die Fragmentierung der Fibrillen zurückgeführt (Collins *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2007b; Serio *et al.*, 2000). Assoziationsreaktionen zwischen Monomeren und Oligomeren sowie zwischen Oligomeren und Fibrillen sind durch den Stoffaustausch in der Lösung begrenzt. Ein schnelleres Vermischen der Lösung durch z.B. Schütteln bewirkt einen erhöhten Stoffaustausch und somit eine höhere Kollisionsrate zwischen den einzelnen Spezies (Lee *et al.*, 2007b, Serio *et al.*, 2000). Weiterhin ist die Fibrillerung durch die Anzahl der aktiven Fibrillenenden limitiert, an die sich Monomere anlagern können. Durch Schütteln werden Scherkräfte in der Lösung erhöht, wodurch die Fibrillen brechen und mehr Enden erzeugt werden, die als *Seeds* wirken (Collins *et al.*, 2004).

Mittlerweile konnte in einer ganzen Reihe von Untersuchungen an z.B. α -Synuclein, einem Peptid der humanen prostataspezifischen sauren Phosphatase, einer verkürzten Variante des humanen Prionenproteins, der PDZ-Domäne einer Tyrosin-Phosphatase, β 2-Mikroglobulin, Glucagon, Lysozym, Sup35p oder A β_{1-40} gezeigt werden, dass Schütteln oder Rühren der Proteinlösung die *lag*-Phase der Fibrillierung stark verkürzt bzw. die Fibrillierung induziert (Almstedt *et al.*, 2009; Collins *et al.*, 2004; De Jong *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007; Lieu *et al.*, 2007; Pronchik *et al.*, 2010; Sasahara *et al.*, 2008; Sicorello *et al.*, 2009; Ye *et al.*, 2009).

Auch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass Schütteln die Bildung von Fibrillen der L3/16-Linkervarianten mit Alaninpeptiden beschleunigt. Bemerkenswerterweise konnte sogar bei Varianten ohne Alanine die Fibrillierung durch Schütteln induziert werden. Unter diesen Fibrillierungsbedingungen hatten die Alanine keinen Einfuss mehr auf den Beginn der Fibrillierung. Die Proteine waren wahrscheinlich so stark destabilisiert, dass die relativ langsame Fibrillierung, die durch Alanine induziert wird, in den Hintergrund trat. Die starke, durch Schütteln erreichte, Destabilisierung der Varianten wurde vor allem in den Fusionen mit MCspB deutlich. Auch diese Varianten bildeten nach nur kurzer Inkubationszeit Fibrillen, und es konnte keine hemmende Wirkung der Stabilisierung von CspB auf die Fibrillierung festgestellt werden.

Des Weiteren besaßen unter Schütteln entstandene Typ II - Fibrillen der Fusionen mit CspB, verglichen mit Typ I – Fibrillen, eine bereits unter dem Elektronenmikroskop sichtbare, andersartige Struktur. Eine unterschiedliche Morphologie konnte auch für unter Schütteln und nicht unter Schütteln entstandene Fibrillen von A β_{1-40} gezeigt werden (Lee *et al.*, 2007). Die unterschiedlichen Strukturen wurden damit erklärt, dass unter Schütteln intermolekulare Umlagerungen bevorzugt werden, um hydrophobe Oberflächen abzuschirmen. Diese Umlagerungen gehen mit der Fibrillierung des Proteins einher. Wird der Fibrillierungsansatz nicht geschüttelt, werden langsamere intramolekulare Interaktionen bevorzugt. Diese unterschiedlichen Interaktionen führen zu verschiedenen Intermediaten und somit auch zu verschiedenen fibrillären Strukturen (Lee *et al.*, 2007).

Generell ist bekannt, dass minimal geänderte Fibrillierungsbedingungen die Kinetik der Fibrillierung beeinflussen und zu einer anderen Fibrillenmorphologie führen können (siehe *Reviews* Chiti & Dobson, 2006; Pedersen *et al.*, 2010). Dies konnte z.B. für die Fibrillierung von Lysozym in Anwesenheit von unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen gezeigt werden (Fujiwara *et al.*, 2003). Für die N-terminale Domäne von PABPN1 wurde publiziert, dass z.B. Arginin, Polyethylenglycol und Doxycyclin die Kinetik der Fibrillenbildung stark beeinflussen können (Lodderstedt *et al.*, 2008). Barstar, ein kleines Protein, welches die Ribonuklease Barnase inhibiert, bildete unterschiedliche Fibrillen, je nachdem, ob die Fibrillierung durch erhöhte Temperatur oder die Zugabe von Trifluoroethanol ausgelöst wurde (Kumar & Udgaonkar, 2009). Im Fall von Glucagon unterschied sich die Struktur der Fibrillen in Anwesenheit von unterschiedlichen Salzen und sogar dann, wenn nur die Proteinkonzentration in den Fibrillierungsansätzen geändert wurde (Andersen *et al.*, 2010; Jeppesen *et al.*, 2010).

Auch in dieser Arbeit konnte abhängig von den Fibrillierungsbedingungen eine unterschiedliche Fibrillenstruktur beobachtet werden. Fibrillen, die unter Schütteln entstanden, waren länger und auch weniger "verklebt" als Fibrillen, die sich unter "konventionellen Bedingungen" bildeten. Diese Tatsache, zusammen mit der Beobachtung, dass die Fibrillierung unter Schütteln alanin-unabhängig war, impliziert, dass die Alaninsequenz in Fibrillen vom Typ II nicht die Kernstruktur bildet.

Tanja Wostradowski konnte in ihrer Diplomarbeit zeigen, dass auch Wildtyp-CspB unter Schütteln Fibrillen bildet (Wostradowski, *Diplomarbeit in Vorbereitung*). Daher ist davon auszugehen, dass auch bei allen N-terminalen Fusionskonstrukten der CspB-Anteil fibrilliert. Dass CspB in der Lage ist unter bestimmten Bedingungen Fibrillen zu bilden, ist nicht weiter überraschend, da bereits früher ein Peptid der ersten 22 N-terminalen Aminosäuren von CspB in 10% Acetonitril fibrilliert werden konnte (Groß *et al.*, 1999; Wilkins *et al.*, 2000). Weiterhin bildet auch das Haupt-Kälteschockprotein CspA aus *Escherichia coli* amyloide Fibrillen (Alexandrescu & Rathgeb-Szabo, 1999). CspA weist mit CspB eine Sequenzidentität von 61% auf (Willimsky *et al.*, 1992).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten durch Proteolyse-Experimente keine Hinweise auf eine wenige Aminosäuren umfassende Fibrillenkernsequenz von Typ II - Fibrillen erhalten werden. Es wurde stets nahezu das gesamte Fusionsprotein in den Fibrillen gefunden. H/D-Austausch-Experimente mit Fibrillen von CspA zeigten in ähnlicher Weise, dass alle Amidprotonen des fibrillären Proteins vor einem Lösungsmittelaustausch geschützt sind (Alexandrescu, 2001). Diese Ergebnisse stützen die Annahme, dass grundsätzlich das gesamte Protein in Fibrillen integriert werden kann.

Obwohl die Fibrillierung unter Schütteln unabhängig von der Anwesenheit der Poly-Alaninsequenz erfolgte, scheinen die Alanine einen Einfluss auf die Fibrillenstruktur zu besitzen. So waren Fibrillen der Varianten Δ Ala-L3/16-CspB sehr viel stärker assoziiert als Fibrillen der analogen Fusionen mit Alaninen. Weiterhin waren Fibrillen ohne Alanine nicht stabil gegenüber dem Detergens Natrium-Dodecylsulfat. Eine ähnliche Beobachtung machten bereits Simonelig und Mitarbeiter bei Untersuchungen zur Ablagerung von PABPN1 in *Drosophila melanogaster* (Chartier *et al.*, 2006). Sie zeigten, dass die Poly-Alanin-Sequenz nicht zwingend notwendig ist um Muskeldefekte in der Fliege zu induzieren. Allerdings konnten auch sie einen Einfluss der Alanine feststellen, da in Anwesenheit der Alaninsequenz der pathologische Phänotyp verstärkt war (Chartier *et al.*, 2006).

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die poly-alanin-abhängige Fibrillierung in Anwesenheit einer stabil gefalteten Domäne anhand von verschiedenen Fusionen mit dem Kälteschockprotein B (CspB) untersucht. Vorhergehende Arbeiten hatten bereits gezeigt, dass Fusionen aus den N-terminalen Domänen von PABPN1 mit Wildtyp-CspB Fibrillen bildeten, in denen die native Struktur von CspB erhalten blieb. Im Gegensatz dazu lag CspB in Fibrillen aus direkten Fusionen von Alaninpeptiden mit CspB entfaltet vor. Diese Ergebnisse führten zu der Fragestellung, welcher Abstand zwischen einer amyloidogenen Sequenz und einer gefalteten Domäne notwendig ist, um die Aktivität der Domäne in den Fibrillen zu erhalten. Es sollte weiterhin geklärt werden, ob die thermodynamische Stabilität ΔG_D von CspB die Fibrillenbildung auch dann beeinflussen kann, wenn die amyloidogene Sequenz strukturell unabhängig von der gefalteten Domäne vorliegt. Zur Beantwortung dieser Fragen wurden Fusionsproteine mit CspB hergestellt, in denen die Länge des amyloidogenen Peptides und die Länge des Linkers zwischen dem Alaninpeptid und CspB variierte. Anschließend wurde in diesen Varianten und in den Fusionen mit den N-terminalen Domänen der Fusionspratner CspB durch die Mutation A46K/S48R stabilisiert.

- Die Poly-Alanin-Sequenz war f
 ür die Fibrillenbildung der Wildtyp-CspB-Fusionen mit L3- bzw. L16-Linker unter "konventionellen Bedingungen" zwingend erforderlich. Die *lag*-Phase der Fibrillierung der L16-Linkervarianten war immer k
 ürzer als die der L3-Linkervarianten. Dies lag wahrscheinlich nicht in der unterschiedlichen Stabilit
 ät, sondern in den verschiedenen Prim
 ärsequenzen der Linker begr
 ündet.
- 2. Thermisch-induzierte Entfaltungen der monomeren Fusionsproteine zeigten, dass bei 37°C ein gewisser Anteil der CspB-Moleküle bereits entfaltet vorlag. Das bedeutet, dass nicht wie zu Beginn der Arbeit vermutet, die Fibrillierung den Verlust der nativen Struktur von CspB zur Folge hatte, sondern die Fibrillierung wahrscheinlich nur stattfinden konnte, weil ein Teil der CspB-Moleküle bereits entfaltet vorlag.
- CspB war in den Fibrillen beider Linkervarianten entfaltet. In den L3-Linkervarianten waren die ersten N-terminalen Aminosäuren von CspB in die Fibrillenkernstruktur integriert. Diese Integration führte zur Entfaltung des gesamten Proteins. Die

Inaktivität von CspB in Fibrillen der L16-Linkervarianten beruhte wahrscheinlich nicht auf einer Integration von CspB in die Fibrillenkernstruktur. Vielmehr ist es möglich, dass die Faltung von CspB durch die Fibrillierung der N-terminalen Aminosäuren der Polypeptidkette sterisch behindert wurde.

- 4. Die Stabilisierung von CspB um ca. 8 kJ/mol führte unter "konventionellen Bedingungen" zu einer vollständigen Inhibierung der Fibrillenbildung der Fusionsproteine. Diese Inhibierung ist darauf zurückzuführen, dass das stabilisierte MCspB unter Fibrillierungsbedingungen bei 37°C nativ gefaltet vorlag.
- 5. Die Fusionen aus N-terminaler Domäne von PABPN1 und MCspB bildeten in Anwesenheit der Alaninsequenz trotz erhöhter thermodynamischer Stabilität Fibrillen, in denen die gefaltete Konformation von MCspB erhalten blieb. In diesen Varianten ist MCspB demnach strukturell unabhängig von der Alaninsequenz. Allerdings scheint MCspB trotz der Entfernung zur amyloidogenen Sequenz die Fibrillierung zu beeinflussen, da sich Fibrillen der Fusionen mit MCspB von Fibrillen der Fusionen mit CspB morphologisch unterscheiden. Eine weitere Möglichkeit für die verschiedenen Fibrillenmorphologien stellt eine veränderte Fibrillenoberfläche durch den Fusionspartner MCspB dar.
- 6. Die Änderung der Fibrillierungsbedingungen durch Schütteln der Probenlösung führte dazu, dass die Fibrillenbildung unabhängig von der Alaninsequenz und auch unabhängig von der thermodynamischen Stabilität ΔG_D von CspB stattfand. Das bedeutet, dass Aussagen zur Fibrillierung eines Proteins immer nur auf die untersuchten Bedingungen zutreffen und nicht auf andere übertragen werden können.

6 Abkürzungen

6.1 Allgemeine Abkürzungen

Å	Angström $(1\text{\AA} = 0.1 \text{ nm})$	nm	Nanometer
Αβ	Amyloid-β-Peptid	NMR	Nuclear Magnetic Resonance
ACN	Acetonitril	NTA	Nitrilotri-Essigsäure
ANS	1-Anilino-8-naphthalensulfon-säure	N-terminal	Amino-terminal
APS	Ammoniumperoxodisulfat	OD _{600nm}	Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 600 nm
ARX	Aristaless related Homeobox	OPMD	Okulopharyngeale Muskeldystrophie
AU	Arbitrary Units	PABPN1	nukleäres Poly-Adenin-bindendes
hn	Decompose	DACE	Protein I Delyeenviewid Cel Elektronherese
op histori		PAGE	Polyaci ylanid-Gel-Elektropholese
bldest.	bidestilliertes wasser	PCK	Polymerasekettenreaktion
CD	Circulardichroismus	PDB	Protein Database
CsgA	Major Curlin Subunit	PEG	Polyethylenglykol
CspB	Kälteschockprotein B aus <i>Bacillus</i> subtilis	рН	Pondus Hydrogenii
C-terminal	Carboxy-terminal	PHOX2B	Paired Mesoderm Homeobox Protein 2B
Da	Dalton	Pmel17	Melanocyte Protein 17
DNA	deoxvribonucleic acid	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
dT7	Oligonukleotid mit der Sequenz 5'- TTTTTTT-3'	polyA	poly-Alanin
6	molarer Extinktionskoeffizient	nolvO	poly-Glutamin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	PRMT	Protein Argining N-Mathyltransferase
EDIA	Elektrononmikroskon	$(m) \mathbf{P} \mathbf{N} \mathbf{A}$	(massanger) wibowyalaja gaid
	folgon do Soito/n		(messenger) ribonucieic ucia
FOXL2	Forknead Box Protein L2	RP- HPLC	Reversea Phase-High Performance
CdmCl	Guanidiniumhudraahlarid	рт	Doumtomporatur
CdmSCN	Guanidiniumthioguanat		Round related Transportion factor
CED	Guandinumunocyanat	KUNA2	Natrium de de extention jucior
GFP	Green Fluorescent Protein	SDS	
Groes	Heat Shock 10 kDa Protein 1	SH-3	Sarcoma-homology 3
HE1-s	Heterokaryon Incompatibility	SOX3	Sex determining region-related high mobility group-box
His-Tag	Histidin-Tag	Sup35p	Suppressor Protein 35
HOXA13	Homeobox Protein A13	SV	Säulenvolumen
HOXD13	Homeobox Protein D13	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Hsp	Hitzeschockprotein	TFA	Trifluoressigsäure
IPTG	Isopropy-β-D-thiogalactopyranosid	ThT	Thioflavin T
J	Joule	TOF	Time of Flight
Κ	Kelvin	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
kb	Kilobasenpaare	Ure2p	Ureidosuccinate Protein 2
L3	Peptidlinker mit der Sequenz GGG	UV	ultraviolett
L16	Peptidlinker mit der Sequenz GGRGSGPGRRRHLVPG	V	Volt
LB	Lysic broth	v/v	volume per volume
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption	w/v	weight per volume
	Ionisation		
(n/u)M	(nano/micro) Molar	w/w	weight ner weight
MCsnB	A46K/S48R-Mutante des	WT	Wildtyn
терь	Kälteschockproteins B	** 1	
MW	molecular weight	Y-Box	Transkriptions-Regulations-Element
MWCO	molecular weight cut off	ZIC2	Zinc finger protein 2
	~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~ ~		~ ~ .
6.2 Abkürzungen für Fusionsproteine

∆Ala-N-CspB	N-terminale Domäne von PABPN1-∆Ala fusioniert mit CspB
10Ala-N-CspB	N-terminale Domäne von Wildtyp-PABPN1 fusioniert mit CspB
17Ala-N-CspB	N-terminale Domäne von PABPN1-(+7)Ala fusioniert mit CspB
ΔAla-N-MCspB	N-terminale Domane von PABPNI- Δ Ala fusioniert mit MCspB
10Ala-N-MCspB	N-terminale Domäne von Wildtyp-PABPN1 fusioniert mit MCspB
17Ala-N-MCspB	N-terminale Domäne von PABPN1-(+7)Ala fusioniert mit MCspB
10Ala-CspB	N-terminal um 10Alanine erweitertes CspB
17Ala-CspB	N-terminal um 17Alanine erweitertes CspB
10Ala-MCspB	N-terminal um IOAlanine erweitertes MCspB
17Ala-MCspB	N-terminal um 17Alanine erweitertes MCspB
AAla-L3-CspB	N-terminal um 3 Aminosäuren erweitertes CspB
10Ala-L3-CspB	N-terminal um 10Alanine und 3 Aminosäuren erweitertes CspB
17Ala-L3-CspB	N-terminal um 17Alanine und 3 Aminosäuren erweitertes CspB
ΔAla-L3-MCspB	N-terminal um 3 Aminosauren erweitertes MCspB
10Ala-L3-MCspB	N-terminal um 10Alanine und 3 Aminosäuren erweitertes MCspB
17Ala-L3-MCspB	N-terminal um 17Alanine und 3 Aminosäuren erweitertes MCspB
AAla-L16-CspB	N-terminal um 16 Aminosäuren erweitertes CspB
10Ala-L16-CspB	N-terminal um 10 Alanine und 16 Aminosäuren erweitertes CspB
17Ala-L16-CspB	N-terminal um 17 Alanine und 16 Aminosäuren erweitertes CspB
	iv terminar and 177 damie and 107 dimiosauren erweitertes espis
Δ Ala-L16-MCspB	N-terminal um 16 Aminosäuren erweitertes MCspB
10Ala-L16-MCspB	N-terminal um 10Alanine und 16 Aminosäuren erweitertes MCspB
17Ala-L16-MCspB	N-terminal um 17Alanine und 16 Aminosäuren erweitertes MCspB
17Ala-L16-MCspB	N-terminal um 17Alanine und 16 Aminosäuren erweitertes MCspB

7 Literaturverzeichnis

- Albrecht AN, Kornak U, Böddrich A, Süring K, Robinson PN, Stiege AC, Lurz R, Stricker S, Wanker EE, Mundlos S (2004): A molecular pathogenesis for transcription factor associated poly-alanine tract expansions. *Hum Mol Genet* 13(20): 2351-59
- Albrecht AN, Mundlos S (2005): The other trinucleotide repeat: polyalanine expansion disorders. *Curr Opin Genet Dev* 15(3): 285-93
- Alexandrescu AT (2001): An NMR-based quenched hydrogen exchange investigation of model amyloid fibrils formed by cold shock protein A. *Pac Symp Biocomput* 6: 67-78
- Alexandrescu AT, Rathgeb-Szabo K (1999): An NMR investigation of solution aggregation reactions preceding the misassembly of acid-denatured cold shock protein A into fibrils. J Mol Biol 291(5): 1191-206
- Almstedt K, Nyström S, Nilsson KP, Hammarström P (2009): Amyloid fibrils of human prion protein are spun and woven from morphologically disordered aggregates. *Prion* 3(4): 224-35
- Andersen CB, Hicks MR, Vetri V, Vandahl B, Rahbek-Nielsen H, Thøgersen H, Thøgersen IB, Enghild JJ, Serpell LC, Rischel C, Otzen DE (2010): Glucagon fibril polymorphism reflects differences in protofilament backbone structure. J Mol Biol 397 (4): 932-46
- Anfinsen CB (1973): Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181(4096): 223-230
- Bader R, Seeliger MA, Kelly SE, Ilag LL, Meersman F, Limones A, Luisi BF, Dobson CM, Itzhaki LS (2006): Folding and fibril formation of the cell cycle protein Cks1. J Biol Chem 281(27): 18816-24
- Bagriantsev SN, Kushnirov VV, Liebman SW (2006): Analysis of amyloid aggregates using agarose gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 412: 33-48
- Balbirnie M, Grothe R, Eisenberg DS (2001): An amyloid-forming peptide from the yeast prion Sup35 reveals a dehydrated β-sheet structure for amyloid. *Proc Natl Acad Sci* 98(5): 2375-80
- Bao YP, Cook LJ, O'Donovan D, Uyama E, Rubinsztein DC (2002): Mammalian, yeast, bacterial, and chemical chaperones reduce aggregate formation and death in a cell model of oculopharyngeal muscular dystrophy. *J Biol Chem* 277(14): 12263-69
- Bauer PO, Nukina N (2009): The pathogenic mechanisms of polyglutamine diseases and current therapeutic strategies. *J Neurochem* 110(6): 1737-65
- Baxa U, Speransky V, Steven AC, Wickner RB (2002): Mechanism of inactivation on prion conversion of the Saccharomyces cerevisiae Ure2 protein. *Proc Natl Acad Sci* 99(8): 5253-60
- Baxa U, Taylor KL, Wall JS, Simon MN, Cheng N, Wickner RB, Steven AC (2003): Architecture of Ure2p prion filaments: the N-terminal domains form a central core fiber. *J Biol Chem* 278(44): 43717-27
- Bemporad F, Calloni G, Campioni S, Plakoutsi G, Taddei N, Chiti F (2006): Sequence and structural determinants of amyloid fibril formation. *Acc Chem Res* **39(9)**: 620-27
- Betzel C, Bellemann M, Pal GP, Bajorath J, Saenger W, Wilson KS (1988): X-ray and modelbuilding studies on the specificity of the active site of proteinase K. Proteins 4(3): 157-64
- Bitan G, Kirkitadze MD, Lomakin A, Vollers SS, Benedek GB, Teplow DB (2003): Amyloid β-protein (Aβ) assembly: Aβ₄₀ and Aβ₄₂ oligomerize through distinct pathways. *Proc Natl Acad Sci* 100(1): 330-35
- Bitan G, Lomakin A, Teplow DB (2001): Amyloid β-Protein Oligomerization: Prenucleation interactions revealed by photo-induced cross-linking of unmodified proteins. *J Biol Chem* 276(37): 35176-84

- Blondelle SE, Forood B, Houghten RA, Pérez-Payá E (1997): Polyalanine-based peptides as models for self-associated beta-pleated-sheet complexes. *Biochemistry* 36(27): 8393-400
- Bocharova OV, Breydo L, Parfenov AS, Salnikov VV, Baskakov IV (2005): In vitro conversion of full-length mammalian prion protein produces amyloid form with physical properties of PrP(Sc). *J Mol Biol* 346(2): 645-59
- Booth DR, Sunde M, Bellotti V, Robinson CV, Hutchinson WL, Fraser PE, Hawkins PN, Dobson CM, Radford SE, Blake CC, Pepys MB (1997): Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis. *Nature* 385(6619): 787-93
- Bousset L, Redeker V, Decottignies P, Dubois S, Le Maréchal P, Melki R (2004): Structural characterization of the fibrillar form of the yeast Saccharomyces cerevisiae prion Ure2p. *Biochemistry* 43(17): 5022-5032
- Brais B, Bouchard JP, Xie YG, Rochefort DL, Chrétien N, Tomé FM, Lafrenière RG, Rommens JM, Uyama E, Nohira O, Blumen S, Korczyn AD, Heutink P, Mathieu J, Duranceau A, Codère F, Fardeau M, Rouleau GA (1998): Short GCG expansions in the *PABP2* gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nat Genet* 18(2): 164-67
- Brinkmann U, Mattes RE, Buckel P (1989): High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the *dnaY* gene product. *Gene* 85(1): 109-14.
- Brown L, Paraso M, Arkell R, Brown S (2005): In vitro analysis of partial loss-of-function ZIC2 mutations in holoprosencephaly: alanine tract expansion modulates DNA binding and transactivation. *Hum Mol Genet* 14(3): 411-20
- Butko P, Buford JP, Goodwin JS, Stroud PA, McCormick CL, Cannon GC (2001): Spectroscopic evidence for amyloid-like interfacial self-assembly of hydrophobin Sc3. *Biochem Biophys Res Commun* 280(1): 212-15
- Calamai M, Taddei N, Stefani M, Ramponi G, Chiti F (2003): Relative Influence of hydrophobicity and net charge in the aggregation of two homologous proteins. *Biochemistry* 42(51): 15078-83
- Caporini MA, Bajaj VS, Veshtort M, Fitzpatrick A, MacPhee CE, Vendruscolo M, Dobson CM, Griffin RG (2010): Accurate determination of interstrand distances and alignment in amyloid fibrils by magic angle spinning NMR. *J Phys Chem B* 114(42): 13555-61
- Chapman MR, Robinson LS, Pinkner JS, Roth R, Heuser J, Hammar M, Normark S, Hultgren SJ (2002): Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science* 295(5556): 851-55
- Chartier A, Benoit B, Simonelig M (2006): A Drosophila model of oculopharyngeal muscular dystrophy reveals intrinsic toxicity of PABPN1. *EMBO J* 25(10): 2253-62
- Chen S, Berthelier V, Hamilton JB, O'Nuallain B, Wetzel R (2002): Amyloid-like features of polyglutamine aggregates and their assembly kinetics. *Biochemistry* **41**(23): 7391-99
- Chiba T, Hagihara Y, Higurashi T, Hasegawa K, Naiki H, Goto Y (2003): Amyloid fibril formation in the context of full-length protein: effects of proline mutations on the amyloid fibril formation of beta2-microglobulin. *J Biol Chem* 278(47): 47016-24
- Chirita CN, Congdon EE, Yin H, Kuret J (2005): Triggers of full-length tau aggregation: a role for partially folded intermediates. *Biochemistry* 44(15): 5862-72
- Chiti F, Dobson CM (2006): Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. Annu Rev Biochem 75: 333-66
- Chiti F, Stefani M, Taddei N, Ramponi G, Dobson CM (2003): Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates. *Nature* 424(6950): 805-8

- Chiti F, Taddei N, Bucciantini M, White P, Ramponi G, Dobson CM (2000): Mutational analysis of the propensity for amyloid formation by a globular protein. *EMBO J* 19(7): 1441-49
- Chiti F, Webster P, Taddei N, Clark A, Stefani M, Ramponi G, Dobson CM (1999): Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Proc Natl Acad Sci* 96(7): 3590-94
- Chou PY, Fasman GD (1974): Conformational parameters for amino acids in helical, β-sheet, and random coil regions calculated from proteins. *Biochemistry* 13(2): 211-22
- Chou PY, Fasman GD (1974b): Prediction of protein conformation. *Biochemistry* 13(2): 222-45
- Claessen D, Rink R, de Jong W, Siebring J, de Vreugd P, Boersma FGH, Dijkhuizen L, Woesten HAB (2003): A novel class of secreted hydrophobic proteins is involved in aerial hyphae formation in Streptomyces coelicolor by forming amyloid-like fibrils. *Genes Dev* 17(14): 1714-26
- Cohen AS, Calkins E (1959): Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of divers origins. *Nature* 183(4669): 1202-03
- Collins SR, Douglass A, Vale RD, Weissman JS (2004): Mechanism of prion propagation: Amyloid growth occurs by monomer addition. *PLoS Biol* 2(10): e321
- Conway KA, Harper JD, Lansbury PT (2000): Fibrils formed in vitro from α-Synuclein and two mutant forms linked to parkinson's disease are typical amyloid. *Biochemistry* 39(10): 2552-63
- Coustou V, Deleu C, Saupe S, Begueret J (1997): The protein product of the *het-s* heterokaryon incompatibility gene of the fungus *Podospora anserina* behaves as a prion analog. *Proc Natl Acad Sci* 94(18): 9773-78
- Damaschun G, Damaschun H, Fabian H, Gast K, Kröber R, Wieske M, Zirwer D (2000): Conversion of yeast phosphoglycerate kinase into amyloid-like structure. *Proteins* 39(3): 204-11
- Dames J (2009): Rekombinante Herstellung, Reinigung und biophysikalische Charakterisierung von Proteinfusionen für Studien zur Fibrillenbildung. *Diplomarbeit*, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Daude N, Ng V, Watts JC, Genovesi S, Glaves JP, Wohlgemuth S, Schmitt-Ulms G, Young H, McLaurin J, Fraser PE, Westaway D (2010): Wild-type Shadoo proteins convert to amyloid-like forms under native conditions. *J Neurochem* 113(1): 92-104
- De Jong KL, Incledon B, Yip CM, DeFelippis MR (2006): Amyloid fibrils of Glucagon characterized by high-resolution atomi force microscopy. *Biophys J* 91(5): 1905-14
- Del Mar C, Greenbaum EA, Mayne L, Englander SW, Woods VL Jr (2005): Structure and properties of alpha-synuclein and other amyloids determined at the amino acid level. *Proc Natl Acad Sci* 102(43): 15477-82
- Dobson CM (2004): Principles of protein folding, misfolding and aggregation. Semin Cell Dev Biol 15: 3-16
- Dueholm MS, Petersen SV, Sønderkær M, Larsen P, Christiansen G, Hein KL, Enghild JJ, Nielsen JL, Nielsen KL, Nielsen PH, Otzen DE (2010): Functional amyloid in *Pseudomonas. Mol Microbiol* 77(4): 1009-20
- Eaglestone SS, Cox BS, Tuite MF (1999): Translation termination efficiency can be regulated in Saccharomyces cerevisiae by environmental stress through a prion-mediated mechanism. *EMBO J* 18(7): 1974-81
- Eanes ED, Glenner GG (1968): X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *J Histochem Cytochem* 16(11): 673-77
- Epstein CJ, Golberger RF, Anfinsen CB (1963): Genetic control of tertiary protein structure studies with model systems. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 28: 439-49

- Espargaró A, Castillo V, de Groot NS, Ventura S (2008): The in vivo and in vitro aggregation propensities of globular proteins correlate with their conformational stability: the SH3 case. *J Mol Biol* 378(5): 1116-31
- Fairbanks G, Steck TL, Wallach DF (1971): Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10(13): 2606-17
- Fan X, Dion P, Laganiere J, Brais B, Rouleau GA (2001): Oligomerization of polyalanine expanded PABPN1 facilitates nuclear protein aggregation that is associated with cell death. *Hum Mol Genet* 10(21): 2341-51
- Fändrich M (2007): On the structural definition of amyloid fibrils and other polypeptide aggregates. *Cell Mol Life Sci* 64(16): 2066-78
- Fändrich M, Dobson CM (2002): The behaviour of polyamino acids reveals an inverse side chain effect in amyloid structure formation. *EMBO J* 21(21): 5682-90
- Fändrich M, Fletcher MA, Dobson CM (2001): Amyloid fibrils from muscle myoglobin. *Nature* 410(6825): 165-66
- Fink AL (2005): Natively unfolded proteins. Curr Opin Struct Biol 15(1): 35-41
- Forood B, Pérez-Payá E, Houghten RA, Blondelle SE (**1995**): Formation of an extremely stable polyalanine β-sheet macromolecule. *Biochem Biophys Res Commun* **211(1)**: 7-13
- Fowler DM, Koulov AV, Alory-Jost C, Marks MS, Balch WE, Kelly JW (2006): Functional amyloid formation within mammalian tissue. *PloS Biol* 4(1): e6
- Fowler DM, Koulov AV, Balch WE, Kelly JW (2007): Functional amyloid from bacteria to humans. *Trends Biochem Sci* 32(5): 217-24
- Fraser RDB, MacRae TP (1973): Conformation in fibrous proteins and related synthetic polypeptides. Academic Press, New York.
- Friedreich N, Kekulé A (1859): Zur Amyloidfrage. Virchows Arch path Anat 16(1): 50-65
- Fu H, Grimsley GR, Razvi A, Scholtz JM, Pace CN (2009): Increasing protein stability by improving beta-turns. *Proteins* 77(3): 491-98
- Fujiwara S, Matsumoto F, Yonezawa Y (2003): Effects of salt concentration on association of the amyloid protofilaments of hen egg white lysozyme studied by time-resolved neutron scattering. J Mol Biol 331(1): 21-28
- Garcia-Mira MM, Boehringer D, Schmid FX (2004): The folding transition state of the cold shock protein is strongly polarized. *J Mol Biol* 339(3): 555-69
- Garcia-Mira MM, Schmid FX (2006): Key role of coulombic interactions for the folding transition state of the cold shock protein. *J Mol Biol* 364(3): 458-68
- Gast K, Modler AJ, Damaschun H, Kröber R, Lutsch G, Zirwer D, Golbik R, Damaschun G (2003): Effect of environmental conditions on aggregation and fibril formation of barstar. *Eur Biophys J* 32(8): 710-23
- Ge H, Zhou D, Tong S, Gao Y, Teng M, Liu L (2008): Crystal structure and possible dimerization of the single RRM of human PABPN1. *Proteins* 71(3): 1539-45
- Geddes AJ, Parker KD, Atkins EDT, Beighton E (1968): "Cross-β" conformation in proteins. *J Mol Biol* 32(2): 343-58
- Gill SC, von Hippel PH (1989): Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* 182(2): 319-26
- Giri H, Bhattacharyya NP, Basak S (2007): pH-dependent self-assembly of polyalanine peptides. *Biophys J* 92(1): 293-302
- Goers J, Permyakov SE, Permyakov EA, Uversky VN, Fink AL (2002): Conformational prerequisites for alpha-lactalbumin fibrillation. *Biochemistry* 41(41): 12546-51
- Graumann P, Marahiel MA (1994): The major cold shock protein of *Bacillus subtilis* CspB binds with high-affinity to the ATTGG- and CCAAT sequences in single stranded oligonucleotides. *FEBS Lett* 338(2):157-60

- Greenwald J, Riek R (2010): Biology of amyloid: Structure, function and regulation. *Structure* 18(10): 1244-60
- Groß M, Wilkins DK, Pitkeathly MC, Chung EW, Higham C, Clark A, Dobson CM (1999): Formation of amyloid fibrils by peptides derived from the bacterial cold shock protein CspB. *Protein Sci* 8(6): 1350-57
- Guijarro JI, Sunde M, Jones JA, Campbell ID, Dobson CM (1998): Amyloid fibril formation by an SH3 domain. *Proc Natl Acad Sci* 95(8): 4224-28
- Hammarström P, Jiang X, Hurshman AR, Powers ET, Kelly JW (2002): Sequence-dependent denaturation energetics: a major determinant in amyloid disease diversity. *Proc Natl Acad Sci* 99(Suppl 4): 16427-32
- Harper JD, Lansbury PT Jr. (1997): 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
- (2011): Rekombinante Expression, Reinigung Μ und biophysikalische Hempel Charakterisierung von Varianten des nukleären Poly(A)-Bindeproteins 1. Diplomarbeit, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Herczenik E, Gebbink MF (2008): Molecular and cellular aspects of protein misfolding and disease. *Faseb J* 22(7): 2115-33
- Higurashi T, Yagi H, Mizobata T, Kawata Y (2005): Amyloid-like fibril formation of cochaperonin GroES: nucleation and extension prefer different degrees of molecular compactness. *J Mol Biol* 351(5): 1057-69
- Hunger K, Beckering CL, Wiegeshoff F, Graumann PL, Marahiel MA (2006): Cold-induced putative DEAD box RNA helicases CshA and CshB are essential for cold adaptation and interact with cold shock protein B in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 188(1): 240-48
- Hurle MR, Helms LR, Li L, Chan W, Wetzel R (1994): A role for destabilizing amino acid replacements in light-chain amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci* 91(12): 5446-50
- Iconomidou VA, Vriend G, Hamodrakas SJ (2000): Amyloids protect the silkmoth oocyte and embryo. *FEBS Lett* **479(3)**: 141-5
- Jahn TR, Radford SE (2005): The Yin and Yang of protein folding. FEBS J 272(23): 5962-70
- Jeppesen MD, Hein K, Nissen P, Westh P, Otzen DE (2010): A thermodynamic analysis of fibrillar polymorphism. *Biophys Chem* 149(1-2): 40-46
- Kawai-Noma S, Pack CG, Kojidani T, Asakawa H, Hiraoka Y, Kinjo M, Haraguchi T, Taguchi H, Hirata A (2010): In vivo evidence for the fibrillar structures of Sup35 prions in yeast cells. J Cell Biol 190(2): 223-31
- Kayed R, Bernhagen J, Greenfield N, Sweimeh K, Brunner H, Voelter W, Kapurniotu A (1999): Conformational transitions of islet amyloid polypeptide (IAPP) in amyloid formation in vitro. J Mol Biol 287(4): 781-96
- Kayed R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, Glabe CG (2003): Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300(5618): 486-89
- Kayed R, Sokolov Y, Edmonds B, McIntire TM, Milton SC, Hall JE, Glabe CG (2004): Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases. J Biol Chem 279(45): 46363-66
- Khurana R, Coleman C, Ionescu-Zanetti C, Carter SA, Krishna V, Grover RK, Roy R, Singh S (2005): Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils. *J Struct Biol* 151: 229-238
- Kirschner DA, Inouye H, Duffy LK, Sinclair A, Lind M, Selkoe DJ (1987): Synthetic peptides homologous to β protein from Alzheimers disease forms amyloid-like fibrils. *Proc Natl Acad Sci* 84: 6953-57

- Klein AF, Ebihara M, Alexander C, Dicaire MJ, Sasseville AM, Langelier Y, Rouleau GA, Brais B (2008): PABPN1 polyalanine tract deletion and long expansions modify its aggregation pattern and expression. *Exp Cell Res* 314(8): 1652-66
- Knowles TP, Fitzpatrick AW, Meehan S, Mott HR, Vendruscolo M, Dobson CM, Welland ME (2007): Role of intermolecular forces in defining material properties of protein nanofibrils. *Science* 318(5858): 1900-1903
- Konno T, Murata K, Nagayama K (1999): Amyloid-like aggregates of a plant protein: a case of a sweet-tasting protein, monellin. *FEBS Lett* **454(1-2)**: 122-26
- Konopka CA, Locke MN, Gallagher PS, Pham N, Hart MP, Walker CJ, Gitler AD, Gardner RG (2011): A yeast model for polyalanine-expansion aggregation and toxicity. *Mol Biol Cell* [Epub ahead of print: doi:10.1091/mbc.E11-01-0037]
- Krzewska J, Tanaka M, Burston SG, Melki R (2007): Biochemical and functional analysis of the assembly of full-length Sup35p and its prion-forming domain. J Biol Chem 282(3): 1679-86
- Kühn U, Wahle E (2004): Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1678(2-3): 67-84
- Kumar S, Udgaonkar JB (2009): Structurally distinct amyloid protofibrils form on separate pathways of aggregation of a small protein. *Biochemistry* **48(27)**: 6441-49
- Kumar S, Udgaonkar JB (2010): Mechanisms of amyloid fibril formation by proteins. *Curr Sci* 98(5): 639-56
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-85
- Lai Z, Colón W, Kelly JW (1996): The acid-mediated denaturation pathway of transthyretin yields a conformational intermediate that can self-assemble into amyloid. *Biochemistry* 35(20): 6470-82
- Lavoie H, Debeane F, Trinh QD, Turcotte JF, Corbeil-Girard LP, Dicaire MJ, Saint-Denis A, Pagé M, Rouleau GA, Brais B (2003): Polymorphism, shared functions and convergent evolution of genes with sequences coding for polyalanine domains. *Hum Mol Genet* 12(22): 2967-79
- Lee CC, Nayak A, Sethuraman A, Belfort G, McRae GJ (2007b): A three-stage kinetic model of amyloid fibrillation. *Biophys J* 92(10): 3448-58
- Lee S, Fernandez EJ, Good TA (2007): Role of aggregation conditions in structure, stability, and toxicity of intermediates in the Abeta fibril formation pathway. *Protein Sci* 16(4): 723-32
- Lee S, Mahler B, Toward J, Jones B, Wyatt K, Dong L, Wistow G, Wu Z (2010): A single destabilizing mutation (F9S) promotes concerted unfolding of an entire globular domain in γS-Crystallin. *J Mol Biol* 399(2): 320-30
- LeVine H (1993): Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's Disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci* 2(3): 404-10
- Li SC, Goto NK, Williams KA, Deber CM (1996): Alpha-helical, but not beta-sheet, propensity of proline is determined by peptide environment. *Proc Natl Acad Sci* 93(13): 6676-81
- Lieu VH, Wu JW, Wang SS, Wu CH (2007): Inhibition of amyloid fibrillization of hen eggwhite lysozymes by rifampicin and p-benzoquinone. *Biotechnol Prog* 23(3): 698-706
- Liu G, Prabhakar A, Aucoin D, Simon M, Sparks S, Robbins KJ, Sheen A, Petty SA, Lazo ND (2010): Mechanistic Studies of Peptide Self-Assembly: Transient α-helices to stable β-sheets. *J Am Chem Soc* 132(51): 18223-32
- Liu WT, Lin SC, Chou WI, Liu TH, Pan RL, Tzou DL, Hua TE, Chang MD (2008): Identification and characterization of a novel fibril forming peptide in fungal starch binding domain. *Biochem Biophys Res Commun* 377(3): 966-70

- Lodderstedt G (2007): *In vitro*-Analysen zur Fibrillenbildung der N-terminalen Domäne des nukleären Poly(A)-bindenden Proteins, PABPN1. *Dissertation*, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Lodderstedt G, Hess S, Hause G, Scheuermann T, Scheibel T, Schwarz E (2007): Effect of oculopharyngeal muscular dystrophy-associated extension of seven alanines on the fibrillation properties of the N-terminal domain of PABPN1. *FEBS J* 274(2): 346-55
- Lodderstedt G, Sachs R, Faust J, Bordusa F, Kühn U, Golbik R, Kerth A, Wahle E, Balbach J, Schwarz E (2008): Hofmeister salts and potential therapeutic compounds accelerate *in vitro* fibril formation of the N-terminal domain of PABPN1 containing a diseasecausing alanine extension. *Biochemistry* 47(7): 2181-89
- Lohman TM, Bujalowski W (1991): Thermodynamic methods for model-independent determination of equilibrium binding isotherms for protein-DNA interactions: Spectroscopic approaches to monitor binding. *Methods Enzymol* 208: 258-90
- Lopez MM, Yutani K, Makhatadze GI (1999): Interactions of the major cold shock protein of *Bacillus subtilis* CspB with single-stranded DNA templates of different base composition. J Biol Chem 274(47): 33601-8
- Lührs T, Ritter C, Adrian M, Riek-Loher D, Bohrmann B, Döbeli H, Schubert D, Riek R (2005): 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils. *Proc Natl Acad Sci* 102(48): 17342-47
- MacArthur MW, Thornton JM (1991): Influence of proline residues on protein conformation. *J Mol Biol* 218(2): 397-412
- Martin A, Kather I, Schmid FX (2002): Origins of the high stability of an in vitro-selected cold-shock protein. *J Mol Biol* 318(5): 1341-49
- Max KEA, Wunderlich M, Roske Y, Schmid FX, Heinemann U (2007): Optimized variants of the cold shock protein from in vitro selection: Structural basis of their high thermostability. *J Mol Biol* 369(4): 1087-97
- Max KEA, Zeeb M, Bienert R, Balbach J, Heinemann U (2006): T-rich single strands bind to a preformed site on the bacterial cold shock protein *Bs*-CspB. *J Mol Biol* 360(3): 702-14
- McDuff FO, Doucet A, Beauregard M (2004): Low concentration of guanidine hydrochloride induces the formation of an aggregation-prone state in alpha-urease. *Biochem Cell Biol* 82(2): 305-13
- McMurray CT (2010): Mechanisms of trinucleotide repeat instability during human development. *Nat Rev Genet* 11: 786-99
- Meinhardt J, Sachse C, Hortschansky P, Grigorieff N, Fändrich M (2009): Abeta(1-40) fibril polymorphism implies diverse interaction patterns in amyloid fibrils. *J Mol Biol* 386(3): 869-77
- Miake H, Mizusawa H, Iwatsubo T, Hasegawa M (2002): Biochemical characterization of the core structure of alpha-synuclein filaments. *J Biol Chem* 277(21): 19213-19
- Miller JS, Kennedy RJ, Kemp, DS (2002): Solubilized, spaced polyalanines: a context-free system for determing amino acid alpha-helix propensities. *J Am Chem Soc* 124(6): 945-62
- Missmahl HP, Hartwig M (1953): Polarisationsoptische Untersuchungen an der Amyloidsubstanz. Virchows Arch path Anat 324(4): 489-508
- Modler AJ, Gast K, Lutsch G, Damaschun G (2003): Assembly of amyloid protofibrils via critical oligomers a novel pathway of amyloid formation. *J Mol Biol* 325(1): 135-48
- Moumné L, Dipietromaria A, Batista F, Kocer A, Fellous M, Pailhoux E, Veitia RA (2008): Differential aggregation and functional impairment induced by polyalanine expansions in FOXL2, a transcription factor involved in cranio-facial and ovarian development. *Hum Mol Genet* 17(7): 1010-19

- Myers JK, Pace CN, Scholtz JM (1995): Denaturant *m* values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Sci* 4(10): 2138-48
- Naiki H, Hashimoto N, Suzuki S, Kimura H, Nakakuki K, Gejyo F (1997): Establishment of a kinetic model of dialysis-related amyloid fibril extension *in vitro*. *Amyloid* 4(4): 223-32
- Naito A, Kamihira M, Inoue R, Saitô H (2004): Structural diversity of amyloid fibril formed in human calcitonin as revealed by site-directed 13C solid-state NMR spectroscopy. *Magn Reson Chem* 42(2): 247-57
- Nasrallah IM, Minarcik JC, Golden JA (2004): A polyalanine tract expansion in Arx forms intranuclear inclusions and results in increased cell death. *J Cell Biol* 167(3): 411-16
- Nelson R, Sawaya MR, Balbirnie M, Madsen AØ, Riekel C, Grothe R, Eisenberg D (2005): Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature* **435**(7043): 773-78
- Nemeth A, Krause S, Blank D, Jenny A, Jenö P, Lustig A, Wahle E (1995): Isolation of genomic and cDNA clones encoding bovine poly(A) binding protein II. *Nucl Acids Res* 23(20): 4034-41
- Nerelius C, Fitzen M, Johansson J (2010): Amino acid sequence determinants and molecular chaperones in amyloid fibril formation. *Biochem Biophys Res Commun* 396(1): 2-6
- Nguyen HD, Hall CK (2004): Molecular dynamics simulations of spontaneous fibril formation by random-coil peptides. *Proc Natl Acad Sci* 101(46): 16180-85
- Nielsen L, Khurana R, Coats A, Frokjaer S, Brange J, Vyas S, Uversky VN, Fink AL (2001): Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: elucidation of the molecular mechanism. *Biochemistry* **40(20)**: 6036-46
- O'Nuallain B, Williams AD, Westermark P, Wetzel R (2004): Seeding specificity in amyloid growth induced by heterologous fibrils. *J Biol Chem* 279(17): 17490-499
- Pace CN (1986): Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods Enzymol* 131: 266-80
- Pajot P (1976): Fluorescence of proteins in 6 M guanidine hydrochloride. A method for the quantitative determination of tryptophan. *Eur J Biochem* 63(1): 263-69
- Pavlov NA, Cherny DI, Heim G, Jovin TM, Subramaniam V (2002): Amyloid fibrils from the mammalian protein prothymosin alpha. *FEBS Lett* **517(1-3)**: 37-40
- Pearson CE, Edamura KN, Cleary JD (2005): Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nat Rev Genet* 6: 729-42
- Pedersen JS, Andersen CB, Otzen DE (2010): Amyloid structure-one but not the same: the many levels of fibrillar polymorphism. *FEBS J* 277(22): 4591-601
- Pérez-Payá E, Forood B, Houghten RA, Blondelle SE (1996): Structural characterization and 5'-mononucleotide binding of polyalanine beta-sheet complexes. *J Mol Recognit* 9(5-6): 488-93
- Perl D, Müller U, Heinemann U, Schmid FX (2000): Two exposed amino acid residues confer thermostability on a cold shock protein. *Nat Struct Biol* 7(5): 380-83
- Perriman AW, Henderson MJ, Holt SA, White JW (2007): Effect of the air-water interface on the stability of β-Lactoglobulin. *J Phys Chem* 111(48): 13527-37
- Petkova AT, Ishii Y, Balbach JJ, Antzutkin ON, Leapman RD, Delaglio F, Tycko R (2002): A structural model for Alzheimer's beta-amyloid fibrils based on experimental constraints from solid state NMR. *Proc Natl Acad Sci* 99(26): 16742-47
- Petkova AT, Yau WM, Tycko R (2006): Experimental constraints on quaternary structure in Alzheimer's β-amyloid fibrils. *Biochemistry* **45**(2): 498-512
- Pronchik J, He X, Giurleo JT, Talaga DS (2010): In vitro formation of amyloid from alpha-Synuclein is dominated by reactions at hydrophobic interfaces. J Am Chem Soc 132(28): 9797-803

- Quintas A, Vaz DC, Cardoso I, Saraiva MJM, Brito RMM (2001): Tetramer dissociation and monomer partial unfolding precedes protofibril formation in amyloidogenic Transthyretin variants. *J Biol Chem* 276(29): 27207-13
- Ramírez-Alvarado M, Merkel JS, Regan L (2000): A systematic exploration of the influence of the protein stability on amyloid fibril formation *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci* 97(16): 8979-84
- Rohrberg J, Sachs R, Lodderstedt G, Sackewitz M, Balbach J, Schwarz E (2008): Monitoring fibril formation of the N-terminal domain of PABPN1 carrying an alanine repeat by tryptophan fluorescence and real-time NMR. *FEBS Lett* **582(11)**: 1587-92
- Rubinstein A, Lyubchenko YL, Sherman S (2009): Dynamic properties of pH-dependent structural organization of the amyloidogenic beta-protein (1-40). *Prion* 3(1): 31-43
- Sackewitz M (2009): Untersuchungen zur Fibrillenbildung unter Berücksichtigung einer benachbarten gefalteten Domäne. *Dissertation*, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Sackewitz M, Scheidt HA, Lodderstedt G, Schierhorn A, Schwarz E, Huster D (2008b): Structural and dynamical characterization of fibrils from a disease-associated alanine expansion domain using protolysis and solid state NMR spectroscopy. J Am Chem Soc 130(23): 7172-73
- Sackewitz M, von Einem S, Hause G, Wunderlich M, Schmid FX, Schwarz E (2008): A folded and functional protein domain in an amyloid-like fibril. *Prot Sci* 17(6): 1044-54
- Sambashivan S, Liu Y, Sawaya MR, Gingery M, Eisenberg D (2005): Amyloid-like fibrils of ribonuclease A with three-dimensional domain-swapped and native-like structure. *Nature* 437(7056): 266-69
- Sasahara K, Yagi H, Sakai M, Naiki H, Goto Y (2008): Amyloid nucleation triggered by agitation of beta2-microglobulin under acidic and neutral pH conditions. *Biochemistry* 47(8): 2650-60
- Sawaya MR, Sambashivan S, Nelson R, Ivanova MI, Sievers SA, Apostol MI, Thompson MJ, Balbirnie M, Wiltzius JJ, McFarlane HT, Madsen AØ, Riekel C, Eisenberg D (2007): Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers. *Nature* 447(7143): 453-7
- Schellman JA (1978): Solvent denaturation. Biopolymers 5(17): 1305-22
- Scheuermann T (2003): Untersuchungen zum Einfluss von Polyalaninsequenzen auf die Bildung amyloider Fibrillen von PABPN1. *Dissertation*, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Scheuermann T, Schulz B, Blume A, Wahle E, Rudolph R, Schwarz E (2003): Trinucleotide expansions leading to an extended poly-L-alanine segment in the poly (A) binding protein PABPN1 cause fibril formation. *Prot Sci* 12(12): 2685-92
- Schindelin H, Marahiel MA, Heinemann U (1993): Universal nucleic acid-binding domain revealed by crystal structure of the *B. subtilis* major cold-shock protein. *Nature* 364(6433): 164-68
- Schindler T, Herrler M, Marahiel MA, Schmid FX (1995): Extremely rapid protein folding in the absence of intermediates. *Nat Struc Biol* 2(8): 663-73
- Schindler T, Schmid FX (1996): Thermodynamic properties of an extremely rapid protein folding reaction. *Biochemistry* 35: 16833-42
- Schnuchel A, Wiltscheck R, Czisch M, Herrler M, Willimsky G, Graumann P, Marahiel MA, Holak TA (1993): Structure in solution of the major cold-shock protein from *Bacillus* subtilis. Nature 364(6433): 169-71
- Schröder K, Graumann P, Schnuchel A, Holak TA, Marahiel MA (1995): Mutational analysis of the putative nucleic acid-binding surface of the cold-shock domain, CspB, revealed an essential role of aromatic and basic residues in binding of single-stranded DNA containing the Y-box motif. *Mol Microbiol* 16(4): 699-708

- Serio TR, Cashikar AG, Kowal AS, Sawicki GJ, Moslehi JJ, Serpell L, Arnsdorf MF, Lindquist SL (2000): Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant. *Science* 289(5483): 1317-21
- Serpell LC, Sunde M, Benson MD, Tennent GA, Pepys MB, Fraser PE (2000): The protofilament substructure of amyloid fibrils. *J Mol Biol* 300(5): 1033-39
- Shanmugam V, Dion P, Rochefort D, Laganière J, Brais B, Rouleau GA (2000): PABP2 polyalanine tract expansion causes intranuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Ann Neurol* **48(5)**: 798-802
- Shao J, Diamond MI (2007): Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy. *Hum Mol Genet* 16 Spec No.2: R115-23
- Shinchuk LM, Sharma D, Blondelle SE, Reixach N, Inouye H, Kirschner DA (2005): Poly-(L-alanine) expansions form core beta-sheets that nucleate amyloid assembly. *Proteins* 61(3): 579-89
- Shoubridge C, Cloosterman D, Parkinson-Lawerence E, Brooks D, Gécz J (2007): Molecular pathology of expanded polyalanine tract mutations in the Aristaless-related homeobox gene. *Genomics* 90(1): 59-71
- Sicorello A, Torrassa S, Soldi G, Gianni S, Travaglini-Allocatelli C, Taddei N, Relini A, Chiti F (2009): Agitation and high ionic strength induce amyloidogenesis of a folded PDZ domain in native conditions. *Biophys J* 96(6): 2289-98
- Sideras K, Gertz MA (2009): Amyloidosis. Adv Clin Chem 47: 1-44
- Sluzky V, Tamada JA, Klibanov AM, Langer R (1991): Kinetics of insulin aggregation in aqueous solutions upon agitation in the presence of hydrophobic surfaces. *Proc Natl* Acad Sci 88(21): 9377-81.
- Soong R, Brender JR, Macdonald PM, Ramamoorthy A (2009): Association of highly compact type II diabetes related islet amyloid polypeptide intermediate species at physiological temperature revealed by diffusion NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc* 131(20): 7079-85
- Srisailam S, Wang HM, Kumar TK, Rajalingam D, Sivaraja V, Sheu HS, Chang YC, Yu C (2002): Amyloid-like fibril formation in an all beta-barrel protein involves the formation of partially structured intermediate(s). *J Biol Chem* 277(21): 19027-36
- Sunde M, Blake CC (1997): The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. *Adv Protein Chem* 50: 123-59
- Sunde M, Serpell LC, Bartlam M, Fraser PE, Pepys MB, Blake CC (1997): Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J Mol Biol* 273(3): 729-39
- Tanford C (1968): Protein denaturation. Adv Protein Chem 23: 121-282
- Tavanez JP, Bengoechea R, Berciano MT, Lafarga M, Carmo-Fonseca M, Enguita FJ (2009): Hsp70 chaperones and type I PRMTs are sequestered at intranuclear inclusions caused by polyalanine expansions in PABPN1. *PLoS One* 4(7): e6418
- Taylor KL, Cheng N, Williams RW, Steven AC, Wickner RB (1999): Prion domain initiation of amyloid formation in vitro from native Ure2p. *Science* 283(5406): 1339-43
- Teng PK, Eisenberg D (2009): Short protein segments can drive a non-fibrillizing protein into the amyloid state. *Protein Eng Des Sel* 22(8): 531-36
- Tomé FM, Fardeau M (1980): Nuclear inclusions in oculopharyngeal dystrophy. Acta Neuropathol 49(1): 85-87
- Trochet D, Hong SJ, Lim JK, Brunet JF, Munnich A, Kim KS, Lyonnet S, Goridis C, Amiel J (2005b): Molecular consequences of PHOX2B missense, frameshift and alanine expansion mutations leading to autonomic dysfunction. *Hum Mol Genet* 14(23): 3697-708
- Trochet D, O'Brien LM, Gozal D, Trang H, Nordenskjöld A, Laudier B, Svensson PJ, Uhrig S, Cole T, Niemann S, Munnich A, Gaultier C, Lyonnet S, Amiel J (2005): PHOX2B

genotype allows for prediction of tumor risk in congenital central hypoventilation syndrome. *Am J Hum Genet* **76(3)**: 421-26

- Tycko R (2006): Molecular structure of amyloid fibrils: insights from solid-state NMR. *Q Rev Biophys* **39(1):** 1-55
- Utsch B, McCabe CD, Galbraith K, Gonzalez R, Born M, Dötsch J, Ludwig M, Reutter H, Innis JW (2007): Molecular characterization of HOXA13 polyalanine expansion proteins in hand-foot-genital syndrome. *Am J Med Genet A* 143A(24): 3161-68
- Uversky VN (2008): Amyloidogenesis of natively unolded proteins. *Curr Alzheimer Res* 5(3): 260-87
- Uversky VN (2010): Mysterious oligomerization of the amyloidogenic proteins. *FEBS J* 227(14): 2940-53
- Uversky VN, Fink AL (2004): Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. *Biochim Biophys Acta* 1698(2): 131-53
- Uversky VN, Li J, Fink AL (2001): Evidence for a partially folded intermediate in α-Synuclein fibril formation. *J Biol Chem* 276(14): 10737-44
- Uyama E, Tsukahara T, Goto K, Kurano Y, Ogawa M, Kim YJ, Uchino M, Arahata K (2000): Nuclear accumulation of expanded PABP2 gene in oculopharyngeal muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 23(10): 1549-54
- Vetri V, Canale C, Relini A, Librizzi F, Militello V, Gliozzi A, Leone M (2007): Amyloid fibrils formation and amorphous aggregation in concanavalin A. *Biophys Chem* 125(1): 184-90
- Vilar M, Chou HT, Lührs T, Maji SK, Riek-Loher D, Verel R, Manning G, Stahlberg H, Riek R (2008): The fold of alpha-synuclein fibrils. *Proc Natl Acad Sci* 105(25): 8637-42
- Virchow R (1854): Über eine im Gehirn und Rückenmark des Menschen aufgefundene Substanz mit der chemischen Reaktion der Cellulose. Virchows Arch path Anat 6(1): 135-138
- Vogel T, Schleiden MJ (1839): Über das Amyloid, eine neue Pflanzensubstanz. Annalen der Physik 122(2): 327-329
- von Einem S (2006): Untersuchungen zum Einfluss der Proteinumgebung auf die poly-L-Alanin-vermittelte Fibrillenbildung. *Diplomarbeit*, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Wahle E (1991): A novel poly(A)-binding protein acts as a specificity factor in the second phase of messenger RNA polyadenylation. *Cell* 66(4): 759-68
- Walsh DM, Hartley DM, Kusumoto Y, Fezoui Y, Condron MM, Lomakin A, Benedek GB, Selkoe DJ, Teplow DB (1999): Amyloid β-protein fibrillogenesis: Structure and biological activity of protofibrillar intermediates. *J Biol Chem* 274(36): 25945-25952
- Walsh DM, Lomakin A, Benedek GB, Condron MM, Teplow DB (1997): Amyloid β-protein fibrillogenesis: Detection of a protofibrillar intermediate. J Biol Chem 272(35): 22364-72
- Ward WW, Bokman SH (1982): Reversible denaturation of Aequorea green-fluorescent protein: physical separation and characterization of the renatured protein. *Biochemistry* 21(19): 4535-40
- Wasmer C, Lange A, Van Melckebeke H, Siemer AB, Riek R, Meier BH (2008): Amyloid fibrils of the HET-s(218-289) prion form a beta solenoid with a triangular hydrophobic core. *Science* 319(5869): 1523-26
- Waxman EA, Mazzulli JR, Giasson BI (2009): Characterization of hydrophobic residue requirements for alpha-synuclein fibrillization. *Biochemistry* 48(40): 9427-36
- Westermark P, Benson MD, Buxbaum JN, Cohen AS, Frangione B, Ikeda S, Masters CL, Merlini G, Saraiva MJ, Sipe JD (2005): Amyloid. toward terminology clarification. Report from the nomenclature committee of the international society of amyloidosis. *Amyloid* 12(1): 1-4

- Westermark P, Engström U, Johnson KH, Westermark GT, Betsholtz C (1990): Islet amyloid polypeptide: pinpointing amino acid residues linked to amyloid fibril formation. *Proc Natl Acad Sci* 87(13): 5036-40
- Westermark P, Lundmark K, Westermark GT (2009): Fibrils from designed non-amyloidrelated synthetic peptides induce AA-amyloidosis during inflammation in an animal model. *PloS One* **4(6)**: e6041
- Wickner RB (1994): [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 264(5158): 566-69
- Wilkins DK, Dobson CM, Groß M (2000): Biophysical studies of the development of amyloid fibrils from a peptide fragment of cold shock protein B. *Eur J Biochem* 267(9): 2609-16
- Willimsky G, Bang H, Fischer G, Marahiel MA (1992): Characterization of cspB, a Bacillus subtilis inducible cold shock gene affecting cell viability at low temperatures. J Bacteriol 174(20): 6326-35
- Wilson LM, Mok YF, Binger KJ, Griffin MD, Mertens HD, Lin F, Wade JD, Gooley PR, Howlett GJ (2007): A structural core within apolipoprotein C-II amyloid fibrils identified using hydrogen exchange and proteolysis. *J Mol Biol* 366(5): 1639-51
- Winter R (2008): Fibrillenbildung von Polyalanin-CspB-Fusionen: Einfluss einer thermodynamisch stabilisierten CspB-Variante. *Diplomarbeit*, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Winter R, Ihling C, Kühn U, Hause G, Schwarz E: Polyalanine independent conformational conversion of the nuclear poly(A) binding protein. *Manuskript in Vorbereitung*.
- Wong J, Farlie P, Holbert S, Lockhart P, Thomas PQ (2007): Polyalanine expansion mutations in the X-linked hypopituitarism gene SOX3 result in aggresome formation and impaired transactivation. *Front Biosci* 12: 2085-95
- Wood SJ, Wetzel R, Martin JD, Hurle MR (1995): Prolines and amyloidogenicity in fragments of the Alzheimer's peptide beta/A4. *Biochemistry* 34(3): 724-30
- Wostradowski T: Institut für Biochemie und Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. *Diplomarbeit in Vorbereitung*.
- Wunderlich M, Martin A, Schmid FX (2005): Stabilization of the cold shock protein CspB from *Bacillus subtilis* by evolutionary optimization of coulombic interactions. *J Mol Biol* 347(5): 1063-76
- Wurth C, Guimard NK, Hecht MH (2002): Mutations that reduce aggregation of the Alzheimer's Abeta42 peptide: an unbiased search for the sequence determinants of Abeta amyloidogenesis. J Mol Biol 319(5): 1279-90
- Yagi H, Sato A, Yoshida A, Hattori Y, Hara M, Shimamura J, Sakane I, Hongo K, Mizobata T, Kawata Y (2008): Fibril formation of hsp10 homologue proteins and determination of fibril core regions: differences in fibril core regions dependent on subtle differences in amino acid sequence. J Mol Biol 377(5): 1593-606
- Ye Z, French KC, Popova LA, Lednev IK, Lopez MM, Makhatadze GI (2009): Mechanism of fibril formation by a 39-residue peptide (PAPf39) from human prostatic acidic phosphatase. *Biochemistry* 48(48): 11582-91
- Zeeb M, Max KEA, Weininger U, Löw C, Sticht H, Balbach J (2006): Recognition of T-rich single-stranded DNA by the cold shock protein *Bs*-CspB in solution. *Nucleic Acids Res* 34(16): 4561-71
- Zucker-Franklin D, Franklin EC (1970): Intracellular localization of human amyloid by fluorescence and electron microscopy. *Am J Pathol* **59(1)**: 23-41

8 Anhang

Aminosäuresequenzen der Fusionen

Gezeigt sind die Aminosäuresequenzen der verschiedenen Fusionen, wobei CspB blau hervorgehoben ist. Bei den rot markierten Aminosäuren handelt es sich um Alanin an Position 46 und Serin an Position 48 des CspB. Diese beiden Aminosäuren sind in der stabilisierten Mutante des CspB (MCspB-A46K/S48R) zu einem Lysin bzw. Arginin mutiert.

17Ala-N-MCspB

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAGGRGSGPGRRRHLVPGAGGEAGEGAPGGAGDYGNG LESEELEPEELLLEPEPEPEPEPEPEPEPRPRAPPGAPGPGSGAPGSQEEEEEPGLVEGDPGDGAIEDPELEAIKAR MLEGKVKWFNSEKGFGFIEVEGQDDVFVHFSAIQGEGFKTLEEGQKVRFEIVEGNRGPQAANVTKEA

10Ala-N-MCspB

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMAAAAAAAAAAAAAGAGGRGSGPGRRRHLVPGAGGEAGEGAPGGAGDYGNGLESEELE PEELLLEPEPEPEPEPEPEPEPPRPRAPPGAPGPGPGSGAPGSQEEEEEPGLVEGDPGDGAIEDPELEAIKARMLEGKVK WFNSEKGFGFIEVEGQDDVFVHFSAIQGEGFKTLEEGQKVRFEIVEGNRGPQAANVTKEA

$\Delta Ala-N-MCspB$

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMAGGRGSGPGRRRHLVPGAGGEAGEGAPGGAGDYGNGLESEELEPEELLLEPEPEP EPEEEPPRPRAPPGAPGPGPGSGAPGSQEEEEEPGLVEGDPGDGAIEDPELEAIKARMLEGKVKWFNSEKGFGFIE VEGQDDVFVHFSAIQGEGFKTLEEGQKVRFEIVEGNRGPQAANVTKEA

17Ala-L16-CspB

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAGGRGSGPGRRRHLVPGLEGKVKWFNSEKGFGFIEV EGQDDVFVHFSAIQGEGFKTLEEGQ<mark>A</mark>VSFEIVEGNRGPQAANVTKEA

10Ala-L16-CspB

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMAAAAAAAAAAAAGAAGGRGSGPGRRRHLVPGLEGKVKWFNSEKGFGFIEVEGQDDVF VHFSAIQGEGFKTLEEGQ<mark>A</mark>VSFEIVEGNRGPQAANVTKEA

$\Delta Ala-L16-CspB$

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMAGGRGSGPGRRRHLVPGLEGKVKWFNSEKGFGFIEVEGQDDVFVHFSAIQGEGFK TLEEGQ<mark>AVS</mark>FEIVEGNRGPQAANVTKEA

17Ala-L3-CspB

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAGGGLEGKVKWFNSEKGFGFIEVEGQDDVFVHFSAI QGEGFKTLEEGQ<mark>A</mark>V<mark>S</mark>FEIVEGNRGPQAANVTKEA

10Ala-L3-CspB

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMAAAAAAAAAAAAGAAGGGLEGKVKWFNSEKGFGFIEVEGQDDVFVHFSAIQGEGFKT LEEGQ<mark>A</mark>V<mark>S</mark>FEIVEGNRGPQAANVTKEA

$\Delta Ala-L3-CspB$

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMAGGGLEGKVKWFNSEKGFGFIEVEGQDDVFVHFSAIQGEGFKTLEEGQAVSFEIV EGNRGPQAANVTKEA

UV-Spektren

Um Nukleinsäurekontaminationen auszuschließen, wurden für alle Fusionsproteine UV-Spektren von 240 - 340 nm aufgenommen (Abb. 8.1). Die Verhältnisse A₂₈₀/A₂₆₀ der L3/16-Linkervarianten von ca. 1.2 lassen zunächst Nukleinsäurekontaminationen in den Proteinlösungen vermuten. Allerdings wurden diese Werte bereits in früheren Arbeiten mit CspB gemessen (Winter, 2008; Dames, 2009). Sie sind wahrscheinlich auf den hohen Phenylalaninanteil im CspB zurückzuführen, da diese Aminosäure ein Absorptionsmaximum bei 257 nm aufweist (Dames, 2009). Eventuell in der Proteinlösung enthaltene Aggregate konnten durch den Abfall der Absorption auf Null bei 320 nm ausgeschlossen werden.





Abbildung 8.1: UV-Spektren der rekombinanten Fusionen. (A) Fusionen mit einem Linker von drei bzw. 16 Aminosäuren und CspB. (B) Fusionen mit einem Linker von drei bzw. 16 Aminosäuren und MCspB. (C) Fusionen aus N-terminalen Domänen und MCspB. Die Spektren wurden in 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 gemessen. L3-Linkervarianten in schwarz, L16-Linkervarianten in rot, Fusionen mit N-terminalen Domänen in blau. Δ Ala durchgezogenen Linie, 10Ala - gestrichelte Linie, 17Ala - kurz gestrichelte Linie.

Fluoreszenzspektren

Abbildung 8.2 zeigt die Spektren der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz aller in dieser Arbeit hergestellten, rekombinanten Fusionsproteine unter nativen und denaturierenden Bedingungen.





Abbildung 8.2: Fluoreszenzspektren der Fusionsproteine unter nativen und denaturierenden Bedingungen. (A) Fusionen mit einem Linker von drei bzw. 16 Aminosäuren und CspB. (B) Fusionen mit einem Linker von drei bzw. 16 Aminosäuren und MCspB. (C) Fusionen aus N-terminalen Domänen und MCspB. Die Messungen wurden in 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 (mit oder ohne 6 M GdmCl) bei 20°C und einer Proteinkonzentration von 3 μ M durchgeführt. Die Anregung erfolgte bei 295 nm. L3-Linkervarianten in schwarz, L16-Linkervarianten in rot, Fusionen mit N-terminalen Domänen in blau. Δ Ala durchgezogenen Linie, 10Ala - gestrichelte Linie, 17Ala - kurz gestrichelte Linie.

Reversibilität der chemisch-induzierten Entfaltung

Die chemisch-induzierte Entfaltung der Fusionsproteine war stets reversibel und für die jeweiligen Rückfaltungen wurden identische Kurven ermittelt. Abbildung 8.3 zeigt die Rückfaltung für Fusionen mit einem Linker von drei bzw. 16 Aminosäuren. Die Rückfaltungen für Fusionen mit den N-terminalen Domänen von PABPN1 sind in Abbildung 8.4 aufgeführt.



Abbildung 8.3: Chemisch-induzierte Renaturierung der Fusionen mit CspB und MCspB. (A) Fusionen mit einem Linker von drei Aminosäuren. (B) Fusionen mit einem Linker von 16 Aminosäuren. Die Messungen erfolgten bei 20°C in 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 mit variierenden Harnstoffkonzentrationen bei einer Proteinkonzentration von 3 μ M. Die Emission wurde bei 345 nm nach einer Anregung bei 295 nm bestimmt.



Abbildung 8.4: Chemisch-induzierte Renaturierung der Fusionen aus N-terminalen Domänen und MCspB. Die Renaturierungen wurden bei 20°C und einer Proteinkonzentration von 3 μ M in 5 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7.5 mit variierenden Harnstoffkonzentrationen gemessen. Nach einer Anregung bei 295 nm wurde die Emission bei 345 nm bestimmt.

HPLC-Chromatogramme der Fibrillen-Peptide

Für die Bestimmung der proteolyseresistenten Peptide wurde das proteasebehandelte Material zunächst in 6 M des Denaturierungsmittels GdmSCN solubilisert und die erhaltenen Peptide mittels RP-HPLC analysiert. Abbildung 8.5 zeigt die Original-Chromatogramme der proteolyseresistenten Fibrillenfragmente der Fusionsproteine.



Abbildung 8.5: RP-HPLC-Chromatogramme der mit Proteinase K behandelten und solubilisierten Fibrillen. (A) 17Ala-L16-CspB. (B) 17Ala-L3-CspB. (C) 10Ala-L16-CspB. (D) 10Ala-L3-CspB. Die Chromatogramme wurden bei einer Wellenlänge von 215 nm aufgezeichnet. Der *Peak* nach ca. 5 Minuten wurde durch das in der Probe vorhandene GdmSCN verursacht und nicht durch eluierende Peptide. Die stark ansteigende Basislinie ist auf den Acetonitril-Gradienten zurückzuführen.



In Abbildung 8.6 sind die Chromatogramme der proteolyseresistenten Fragmente von Typ II -Fibrillen dargestellt.

Abbildung 8.6: RP-HPLC-Chromatogramme der mit Proteinase K behandelten und solubilisierten Typ II -Fibrillen. (A) 17Ala-L16-CspB. (B) 17Ala-L3-CspB. (C) 10Ala-L16-CspB. (D) 10Ala-L3-CspB. (E) ΔAla-L16-CspB. (F) ΔAla-L3-CspB. Die Aufzeichnung der Chromatogramme erfolgte bei einer Wellenlänge von 215 nm. Der *Peak* nach ca. 5 Minuten wurde durch das in der Probe vorhandene GdmSCN verursacht. Die stark ansteigende Basislinie ist auf den Gradienten zurückzuführen.

Lebenslauf

Zur Person

Name	Anja Buttstedt
Geburtsdatum	06. Januar 1983
Geburtsort	Sebnitz
Familienstand	ledig

Schulbildung

09/93-06/02	Europaschule Gymnasium Stephaneum in Aschersleben
06/02	Abitur

Studium

10/02-09/07	Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
	Diplomarbeit am Institut für Biotechnologie bei Prof. Dr. E. Schwarz
09/07	Studienabschluss als Diplom-Biologin

Promotion

Seit 10/07Promotionsstudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg am
Institut für Biotechnologie bei Prof. Dr. E. Schwarz

Publikationen

Peer-review Zeitschriften

Barbezier N, Chartier A, Bidet Y, <u>Buttstedt A</u>, Voisset C, Galons H, Blondel M, Schwarz E, Simonelig M (2011): PABPN1 toxicity and aggregation in oculopharyngeal muscular dystrophy involve the protein folding activity of rRNA and are reduced by 6-aminophenanthridine and guanabenz. *EMBO Mol Med* 3(1): 35-49

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

Hauburger A, von Einem S, Schwaerzer GK, <u>Buttstedt A</u>, Zebisch M, Schräml M, Hortschansky P, Knaus P, Schwarz E (2009): The pro-form of BMP-2 interferes with BMP-2 signalling by competing with BMP-2 for IA receptor binding. *FEBS J* 276: 6386-6398

Andere Zeitschriften

Buttstedt A, Paoletti F, Schwarz E (2011): Wachstumsfaktoren der Cystin-Knoten-Familie und ihre Pro-Formen. *BIOspektrum* 2: 150-153

Präsentationen

Poster

GRK 1026: 2nd International Meeting: Conformational transitions in macromolecular interactions (März 2011). Halle, Deutschland

Conférences Jacques Monod: Protein misfolding and assembly in ageing and disease (Juni 2010). Roscoff, Frankreich

FASEB Summer Research Conference: Amyloid fibril formation and protein misfolding (Juli 2009). Snowmass, CO, USA

ASBMB Annual Meeting, Session: Protein aggregation and amyloid diseases (April 2009). New Orleans, LA, USA

International Bunsen Discussion Meeting: Structure of amyloid fibrils and mechanism of amyloid formation (Februar 2009). Halle, Deutschland

20th Protein Faltertage: FOLDING *in vitro*, FOLDING *in vivo* and FOLDING *h.c.* (September 2008). Wittenberg, Deutschland

Vorträge

21st Protein Faltertage (**Oktober 2010**). Regensburg, Deutschland

halbjährliche Vorträge bei GRK-Treffen (GRK 1026)

Danksagung

Frau Elisabeth Schwarz danke ich für die wunderbare Zeit in ihrer Arbeitsgruppe, die vor über fünf Jahren mit dem Satz "Mal sehen, wen wir mit dir noch belasten können!" begann. Danke für die Betreuung der Arbeit, die ständige Diskussionsbereitschaft und die Unterstützung!

Mein ganz besonderer Dank gilt den herausragenden Fibrillen der Arbeitsgruppe: Mirko Sackewitz und Reno Winter. Mirko danke ich für seine grandiose Pionierarbeit mit der Fibrillierung des Kälteschockproteins, für die geduldige Beantwortung all meiner "Miiiiirko,…..ich hab' da mal "ne Frage"-Fragen und für eine wunderbare Zusammenarbeit gerade zu Beginn meiner Promotion. Reno danke ich dafür, dass er übergangslos und ohne sich zu wehren Mirkos Platz eingenommen hat. Ich werde dich, die Notduschen und unsere Tanzeinlage zum Medi-Fasching nie vergessen.

Der weltbesten TA Christiane Harnisch danke ich für all die wunderbare Zuarbeit im Labor. Natürlich vergesse ich auch die "*Bonies*" Anja Hauburger, Sabrina von Einem, Tino Thieme und Silke Kuhfahl nicht. Danke für eine tolle Zusammenarbeit und ein super Laborklima.

Vielen Dank weiterhin an die gesamte immer mal wieder wechselnde Besatzung des Labors 262 für tolle Kaffeepausen und chaotische Freitage.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die sich so viel besser mit manchen Dingen auskennen:

Herrn Gerd Hause danke ich für viele Stunden seinen Lebens, in denen er mit mir tausende elektronenmikroskopische Bilder aufnahm.

Bei Angelika Schierhorn und vor allem Christian Ihling bedanke ich mich für die massenspektrometrischen Analysen.

Michael Kovermann danke ich für seine Geduld mit mir am stopped-flow-Spektrometer.

Michael Schöpfel danke ich für die Aufnahmen der Röntgenbeugungsmuster.

Bei Herrn Franz X. Schmid bedanke ich mich für seine Diskussionsbereitschaft und sein aufmunterndes Nicken während meines Vortrages bei den Faltertagen.

Allen Mitgliedern des GRK 1026 möchte ich für eine tolle Zeit und vor allem wunderbare *Meetings* danken. Vielen Dank an Martina Richter aber vor allem Mechtild Wahle (bei der ich nun mal groß geworden bin) für eine tolle Organisation.

Dank auch an meine Freunde! Ich danke euch für die tolle Zeit, die vielen Feiern, Grillabende, Serienabende, Urlaube, Umzüge und all die Dinge, die euch unvergesslich werden lassen. Ein Extra-Dank geht natürlich an "meine" Mädels Kati und Claudi und meinen Freund Silvio - danke vor allem für die emotionale Unterstützung und den Prosecco ©.

Mein Dank gilt auch meiner Familie; ihr habt mich immer unterstützt und an mich geglaubt.

Eidesstattliche Erklärung

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

Ich versichere weiterhin, dass die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt wurde. Die den genutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Anja Buttstedt

Halle, Juni 2011

Übersicht über die Fusionsproteine aus CspB mit amyloidogenen Sequenzen



CspB - WT des Kälteschockproteins aus Bacillus subtilis

MCspB - A46K/S48R Variante des Kälteschockproteins aus Bacillus subtilis

17Ala - Fusionen mit 17 Alaninen

10Ala - Fusionen mit 10 Alaninen

 Δ Ala - Fusionen ohne Alanine

L3 - Fusionen mit einem Linker von 3 Aminosäuren zwischen den Alaninen und CspB

L16 - Fusionen mit einem Linker von 16 Aminosäuren zwischen den Alaninen und CspB